

MANOEL TEIXEIRA SOUZA JUNIOR

USO DE UM cDNA DE GAMA-ZEINA MARCADO COM BIO-  
TINA NA CARACTERIZAÇÃO DE GENOTIPOS  
DE MILHO (*Zea mays* L.).

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS  
1991

MFN27057

MANOEL TEIXEIRA SOUZA JUNIOR

USO DE UM cDNA DE GAMA-ZEINA MARCADO COM BIOTINA NA CARACTERIZAÇÃO DE GENOTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.).

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS

1991

DEPARTAMENTO

INSTITUTO DE AGRICULTURA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFPA

MARCEL NUXEIRA SOUZA JUNIOR

USO DE UM  $\phi$ DNA DE GAMA-ZEINA MARCADO COM BIODATA NA CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.)

Investigação apresentada à Escola Superior de Agricultura Lavras como parte dos requisitos de curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre em Ciências.



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LAVRAS - MINAS GERAIS

1991

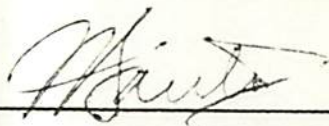
USO DE UM cDNA DE GAMA-ZEÍNA MARCADO COM BIOTINA NA CARACTERIZAÇÃO  
DE GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.).

APROVADA:



Edilson Paiva (Orientador)

PhD., Chefe Adjunto Técnico do CNPMS/EMBRAPA.



João Bosco dos Santos

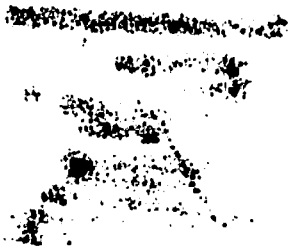
Dr., Professor Adjunto ESAL.



Maurílio Alves Moreira

PhD., Professor Adjunto UFV.





A meu pai, Manoel Teixeira Souza,

Pelo exemplo de coragem e perseverança.

**OFEREÇO**

A minha mãe, Salete

A minha esposa, Vânia

Ao meu filho, Nathan.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, particularmente ao Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical - CNPMF, pela oportunidade de conclusão deste curso de pós-graduação; e ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS, pela oportunidade de realização deste trabalho nas suas dependências.

A Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela oportunidade concedida.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Edilson Paiva pelos exemplos edificantes, pela orientação, amizade e confiança demonstradas.

Aos professores do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas de ESAL, pelos ensinamentos ministrados.

A minha tia M<sup>a</sup> das Dores e aos meus irmãos M<sup>a</sup> de Fátima, M<sup>a</sup> Auxiliadora e Rogério Alexandre pelo carinho, apoio e estímulos constantes.

Aos amigos, Brauliro e Rosana Leal, Carlos Antonio Sousa, Cláudio Brondani, Israel Calori, João Flávio Veloso, José Avelino Santos Rodrigues, José Eduardo, Miguel Reis, Nátia Elen Auras e Oscar Vigzarra pelo companheirismo, convívio e apoio.

Aos funcionários da Biblioteca da ESAL, pelo atendimento e correção das referências bibliográficas.

As cidades de Lavras e Sete Lagoas pela acolhida e momentos vividos.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>04</b>
2.1. Proteínas do milho e sua caracterização	04
2.2. Melhoramento da qualidade nutritiva do milho	12
2.3. Sonda de DNA marcada com biotina	16
2.4. Isolamento e purificação de DNA genômico	22
2.5. O pUC8 e o ciclo biológico do bacteriófago M13	24
2.6. Marcação via "Nick-translation"	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1. Cultivares	29
3.2. Obtenção do fragmento $\gamma$ ZM5 marcado com biotina	32
3.3. Obtenção do M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcado com biotina	34
3.4. Avaliação dos nucleotídeos marcados	42
3.5. Isolamento, purificação e quantificação de DNA	43
3.6. "Southern-blot"	47
3.7. DNA de <i>Rhizobium sp.</i> e o fragmento PCQ15	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>72</b>
<b>6. RESUMO</b>	<b>74</b>

**7. SUMARY**

76

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

77

## 1. INTRODUÇÃO

Os cereais fornecem a maior parte da energia da dieta humana, assim como são fontes da maior parte das proteínas consumida nos países subdesenvolvidos (SHEWRY *et alii*, 1981; TSAI, 1983; DOLL, 1984). O milho contribui com 15,4% da produção mundial de proteína vegetal, o que representa cerca de 42 milhões de toneladas; sendo superado somente pelo trigo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988).

Em geral, a maior parte das proteínas dos grãos dos cereais pertence ao grupo das prolaminas, proteínas solúveis em álcool, ricas em prolina e glutamina, e deficientes em lisina e triptofano. As outras frações proteicas dos cereais são quantitativamente insuficientes para suprir as necessidades do homem e dos animais monogástricos (DOLL, 1984).

Entretanto, com a obtenção das variedades QPM (Milho de Qualidade Proteica), que associam alta qualidade proteica com características agronômicas adequadas, grande perspectiva se abre para a utilização do milho como solução do problema de subnutrição nestes países.

Concomitantemente ao processo de obtenção das

variedades QPM por um programa de melhoramento genético clássico, observou-se um considerável aumento nos estudos que buscavam conhecer os mecanismos que produzem o aumento do conteúdo relativo de lisina e triptofano no endosperma do milho.

Análises eletroforéticas das proteínas do milho já são utilizadas em rotina como ferramentas de auxílio à seleção em programas de melhoramento de milho de alto valor nutritivo, bem como, em programas que visam obtenção de resistência a insetos. Por outro lado, técnicas de identificação, purificação e determinação da sequência de aminoácidos de algumas proteínas do grão de milho geram informações que possibilitam o isolamento das sequências de DNA que servem de código para suas sínteses (GERALGHTY *et alii*, 1981; HU & MESSING, 1982; WANG & ESEN, 1986; PAIVA, 1988).

Fragmentos de DNA estão sendo utilizados para uma série de estudos, dentre eles: estudo de segregação, quantificação de cópias de genes amplificados e mapeamento cromossômico (BECKMANN & SOLLER, 1986; WHITE & LALOUEL, 1988). Estudos a nível de ácidos nucleicos com alfa, beta e gama-zeínas (prolaminas do milho) estão sendo realizados visando obter informações quanto ao número de proteínas que fazem parte destes grupos, e as diferenças a nível de estrutura primária entre proteínas de um mesmo grupo.

Segundo PAIVA *et alii* (1990) e WALLACE *et alii* (1990), para se ter um alto conteúdo de lisina e triptofano, associado com dureza do grão, o genótipo também tem que ter um alto teor de gama-zeína.

O objetivo do presente estudo foi viabilizar o uso

de um cDNA da proteína gama-zeína, como sonda marcada com biotina, em "Southern-blot" de genótipos de milho com diferentes teores desta fração proteica.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Proteínas do Milho e sua Caracterização

As proteínas do grão de milho podem ser sequencialmente separadas, de acordo com sua solubilidade, em quatro frações: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (OSBORNE & MENDEL, 1914). A fração albumina é composta por proteínas solúveis em água. Juntamente com as albuminas são extraídos os aminoácidos livres que estão presentes em pequenas quantidades na maioria das espécies. As globulinas são proteínas solúveis em soluções salinas diluídas; apresentando uma composição polipeptídica afim às albuminas. Albuminas e globulinas são proteínas metabólicas, isto é, enzimas; sendo sintetizadas no início do desenvolvimento do grão (MURPHY & DALBY, 1971; MISRA *et alii*, 1975; TSAI, 1979; SHEWRY *et alii*, 1981). A terceira fração extraída é composta por proteínas solúveis em soluções de álcool e água, as prolaminas; e se constitui na maior das quatro frações, em termos de quantidade. A última fração é composta por proteínas solúveis somente na presença de solução alcalina diluída ou na presença de ácidos, as

glutelinas (WOLF *et alii*, 1967 e 1969).

O endosperma representa em torno de 85% do peso seco de todo o grão de milho, na maturidade; e contém aproximadamente 70% de toda a proteína do mesmo. As quatro frações proteicas, albumina, globulina, prolamina e glutelina, constituem em torno de 3%, 3%, 60% e 34%, respectivamente, das proteínas do endosperma, quando o milho é cultivado sob adubação nitrogenada adequada (HANSEL *et alii*, 1973).

As prolaminas dos cereais são caracterizadas pelo alto conteúdo de prolina e glutamina, daí o nome prolamina; e um baixo teor de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. O baixo conteúdo destes dois aminoácidos essenciais é basicamente o responsável pela baixa qualidade proteica dos cereais (SHEWRY *et alii*, 1981; LARKINS, 1988; SHOTWELL & LARKINS, 1989).

SHEWRY *et alii* (1981) consideram ser mais válido classificar as proteínas do grão somente em dois grupos, tendo como base as suas funções; estes dois grupos seriam as proteínas de reserva e as proteínas que têm função estrutural e/ou metabólica.

As prolaminas são frequentemente citadas com um nome comum que é derivado do gênero do cereal de origem; no caso do milho - *Zea mays* L. - as prolaminas são designadas zeínas (TSAI, 1983). As zeínas fornecem aminoácidos, nitrogênio e esqueletos carbônicos para o desenvolvimento das plântulas (SHOTWELL & LARKINS, 1989).

KODRZYCKI *et alii* (1989) demonstraram que genes codificando zeínas são regulados a nível da transcrição; não

existindo evidências da transcrição de nenhum gene em tecidos como foliar e de raiz.

A extração e purificação das zeínas têm sido assunto de diversas investigações desde a sua descoberta por Gorham em 1822. Esta fração proteica é uma mistura de diversos grupos de proteínas com comportamento similar quanto à solubilidade (ESEN, 1986).

Somente na década de 70, com o desenvolvimento de procedimentos mais eficientes para a separação e caracterização de proteínas, é que a validade da classificação proposta por OSBORNE & MENDEL (1914) foi questionada e buscou-se modificá-la. Muitos procedimentos de extração têm sido publicados, todos baseados na solubilização das zeínas com solventes orgânicos. De uma maneira geral, estes procedimentos sofrem duas limitações. Primeiro, a extração dos vários tipos de zeínas é incompleta, de forma que elas são extraídas em frações múltiplas; e, segundo, dependendo da presença ou ausência de agentes redutores, várias proteínas podem ou não vir a ser extraídas pelo mesmo solvente. Como consequência, a nomenclatura é complexa e confusa (SHEWRY *et alii*, 1981; PAIVA *et alii*, 1990; WALLACE *et alii*, 1990).

As prolaminas da maioria dos cereais são misturas complexas de proteínas, onde algumas podem estar ligadas entre si por pontes dissulfídicas; formando complexos proteicos de alto peso molecular. Diferenças na solubilidade e no potencial de algumas proteínas de se ligar por pontes dissulfídicas ou de se associar com outras proteínas, têm dificultado o isolamento e a caracterização das prolaminas por métodos químicos tradicionais. Porém, a análise de clones de cDNA correspondentes a mRNA's e



genes de prolaminas têm possibilitado a dedução da estrutura primária destes polipeptídeos (SHOTWELL & LARKINS, 1989).

Usando clones de DNA isolados de "biblioteca de genes" ou a partir de mRNA's de zeínas, PARK *et alii* (1980) demonstraram que as zeínas podem ser classificadas em diversas famílias. Esta heterogeneidade genética das zeínas pode ser explicada pelo fato das mesmas não apresentarem atividades catalíticas e, portanto, existir menos pressão de seleção contra este tipo de proteína.

Em ESEN (1986 e 1987) são relatados estudos na procura de um procedimento que possibilitasse a separação das zeínas em frações compostas por polipeptídeos únicos e distintos. Embora os resultados mostrem que a extração de zeínas, sequencialmente com álcool e álcool contendo um agente redutor, não produz frações com composição polipeptídica distinta; ele descreve um procedimento que separa as zeínas em três frações de solubilidade distinta e que são denominadas alfa, beta e gama-zeína (TABELA 1).

Para propor essa nomenclatura ESEN (1987) baseou-se em evidências quanto à solubilidade, composição de aminoácidos, tamanho, heterogeneidade de carga, estrutura primária, ocorrência nos corpos proteicos, propriedades cromatográficas e relações imunológicas das três frações descritas.

Outra nomenclatura que cabe salientar é a descrita em LOPES (1989) e WALLACE *et alii* (1990), que divide as zeínas em quatro frações distintas estruturalmente: alfa-zeína (PM 19 e 22 KD); beta-zeína (PM 14 KD); gama-zeína (PM 16 e 27 KD); e delta-zeína (PM 10 KD). Embora com pesos moleculares diferentes,

**TABELA 1** Classificação das zeínas quanto à solubilidade, segundo procedimento proposto por ESEN (1987).

Zeínas	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
% da zeína total.	78-85	10-15	5-10
Peso Molecular dos polipeptídeos	10, 21 e 25	17 e 18	27
Propanol 50-95%, v/v	Sol*		
Propanol 30-85%, v/v		Sol.	
Propanol 90%, v/v		Ins**	
Propanol 30%, v/v + 30mM NaOAc (pH 6,0)	Ins.	Sol.	Sol.
Propanol 0-80%, v/v + agente redutor			Sol.

\* Solúvel/\*\* Insolúvel.

os materiais de PM 14, 16, 19 e 22 KD descritos por WALLACE et alii (1990), são os mesmos materiais de PM 17, 18, 21 e 25 KD relatados por ESEN (1987), respectivamente.

Todas as três frações,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -zeína, são extremamente heterogêneas quando separadas por focussão isoelétrica (IEF). A fração alfa-zeína apresenta acima de 25, a beta apresenta acima de 20, e a gama em torno de 14 a 16 componentes de IEF ou variantes de carga. As sub-frações PM 19 e 22 KD, componentes da fração alfa-zeína, apresentaram 4 e 5 bandas principais, respectivamente (WILSON & LARKINS, 1984; WANG & ESEN, 1986).

Não se sabe se cada um dos componentes de IEF representa o produto de um gene estrutural separado. Desde que as zeínas consistem de um grupo de proteínas hidrofóbicas, ricas em amida, fatores tais como: agregação, desaminação, pontes dissulfídicas e modificações pós-tradução podem contribuir para heterogeneidade de cargas (TSAI, 1983).

A análise da composição de aminoácidos das frações  $\alpha$ ,  $\beta$  (PM 17 KD) e  $\gamma$ , revela um conteúdo de prolina de 10, 8 e 25%, respectivamente. Do mesmo modo, o conteúdo de glutamina é, respectivamente, 20, 19 e 16%. Todas são essencialmente isentas de lisina e triptofano. Embora todas as três frações sejam ricas em prolina, glutamina e aminoácidos hidrofóbicos; em geral, cada uma tem uma composição única que as distingue entre si. Por exemplo, o alto teor de prolina (25%) e histidina (8%) da gama-zeína; o alto teor de metionina (10%) e tirosina (8%) da beta-zeína; e o alto teor de leucina (20%) e fenilalanina (6%) da alfa-zeína (ESEN, 1987).

Para a alfa-zeína, o tamanho das proteínas processadas varia de 210 a 245 aminoácidos; sendo que todas elas têm altos conteúdos de glutamina (25%), leucina (20%), alanina (15%) e prolina (11%), e nenhuma foi identificada que contenha lisina. Uma característica importante que distingue a alfa-zeína é a presença de uma sequência de 20 aminoácidos repetida em série na região central da proteína (GERALGHTY *et alii*, 1981; PEDERSEN *et alii*, 1982). MARKS *et alii* (1985) sugere que este evento de duplicação explique uma possível origem das PM 22 KD a partir de um gene de PM 19 KD.

WILSON & LARKINS (1984) usaram clones de cDNA de três classes de zeínas de alto peso molecular (PM 15, 19 e 22 KD) como sondas para quantificação de locos em "Southern-blots" de DNA genômico. O número total de locos encontrado codificando para PM 22, 19 e 15 KD, assumindo que não tenha ocorrido hibridação cruzada e em condições de baixa severidade, foi de 24, 54 e 2 a 3 locos, respectivamente.

A fração gama-zeína está distribuída na periferia dos corpos proteicos (LUDELIV *et alii*, 1984). Esta fração serve como uma reserva de nutrientes, mas também deve ter uma função estrutural nos corpos proteicos. WANG & ESEN (1986) lançam como hipótese a participação da fração gama-zeína como esqueleto ou revestimento na superfície interna da membrana dos corpos proteicos, onde ela forma uma rede por ligações dissulfídicas consigo ou com outras proteínas ricas em cisteínas, facilitando o empacotamento de proteínas dentro dos corpos proteicos.

Ao transferir banda de gama-zeína de um gel de IEF para um filtro de nitrocelulose e reagir com um anticorpo

específico para  $\gamma$ -zeína, WANG & ESEN (1986) observaram que ocorreu reação com todas as variantes de carga. Acredita-se que as variantes de carga são, pelo menos em parte, um artefato resultante de interação de  $\gamma$ -zeína e reagentes químicos utilizados no processo, ou com ela própria, dando agregados devido ligações covalentes e não-covalentes.

A fração gama-zeína é formada por uma única banda difusa nos géis de poliacrilamida. A presença de duas bandas, com polipeptídeos de tamanho distintos, dentro da fração gama-zeína é evidente em alguns géis (ESEN, 1987).

PRAT *et alii* (1985) reconheceu cinco regiões distintas e consecutivas na sequência de aminoácidos da fração gama-zeína: um segmento NH<sub>2</sub>-terminal de 11 aminoácidos, uma região com um hexapeptídeo "Pro Pro Pro Val His Leu" repetido oito vezes em sequência, uma sequência alternante Pro-x entre os resíduos 70-91, uma região rica em cisteína entre os resíduos 92 e 148, e um segmento COOH-terminal rico em Gln.

O sequenciamento da região NH<sub>2</sub>-terminal de um clone de  $\gamma$ -zeína, por ESEN (1985) e WANG & ESEN (1986), confirmou mais uma vez a existência do hexapeptídeo "Pro Pro Pro Val His Leu" repetido oito vezes em sequência, além de um octapeptídeo "Gln Pro his Pro Cys Pro Cys Gln" repetido duas vezes.

Enquanto a fração  $\gamma$ -zeína é estruturalmente distinta tanto da  $\alpha$  quanto da  $\beta$ -zeína; ela apresenta duas regiões internas homólogas ao PM 15 KD. Essas regiões de homologia provavelmente possibilitam uma pequena taxa de reação cruzada entre PM 15 KD e um anti-soro específico para  $\gamma$ -zeína (SHOTWELL & LARKINS, 1989). Além de possibilitar a ocorrência de hibridação

cruzada em "Southern-blots" sob condições não severas.

## 2.2. Melhoramento da Qualidade Nutritiva do Milho

Em decorrência do alto teor de zeína no endosperma do grão do milho, as variedades tradicionalmente plantadas são de baixa qualidade nutritiva. Isto fez com que as zeínas se tornassem o centro de atenção em programas de melhoramento da qualidade nutritiva do milho.

A busca por variabilidade devido a mutações nos locos estruturais foi um dos caminhos propostos para o melhoramento da qualidade nutritiva do milho. Com isso, iniciou-se uma procura por variedades comerciais, linhagens exóticas e espécies relacionadas que apresentassem zeínas com lisina (SHEWRY *et alii*, 1981). Hoje se sabe que este caminho não foi logrado devido ao fato de que genes codificando para zeínas com lisina não são comuns (LARKINS, 1988). Para utilizar processos de melhoramento convencional, isto é, recombinação e seleção, seria necessário que todos os componentes codificados por uma família multigênica apresentassem algum teor de lisina (SHEWRY *et alii*, 1981).

Outro caminho proposto foi o uso de mutagênese para a produção de linhagens nas quais o aumento do teor de lisina resultasse de mutações nos genes que codificassem para zeínas. O fracasso deste caminho se deu devido à necessidade de se mutar grande parte dos componentes de uma família multigênica; visto que a mudança de um ou poucos componentes certamente teria o aumento do conteúdo de lisina diluído a um nível que não

permitiria sua detecção pelos procedimentos de seleção (SHEWRY *et alii*, 1981).

O primeiro resultado positivo na busca pelo aumento da qualidade nutritiva do milho se deu com a identificação, por MERTS, BATES & NELSON (1964), de um alelo mutante recessivo - Opaco 2 (O<sub>2</sub>) - que, quando em homozigose, a linhagem apresenta um teor de lisina no endosperma duas vezes maior que o encontrado nos materiais tradicionalmente plantados. Este alelo, como muitos outros identificados desde então, é oriundo de mutação espontânea em loco que não codifica para zeínas.

O aumento do conteúdo de lisina é sempre seguido por uma redução do conteúdo de prolaminas. Estas mudanças são normalmente devido ao efeito de genes únicos; sendo que nenhum destes genes mutantes tenha um efeito direto na síntese de lisina ou outro aminoácido. Portanto, o aumento do valor nutricional é devido à redução do conteúdo de zeínas, com aumento percentual das outras proteínas ricas em lisina. A maioria dos genes mutantes selecionados são melhor denominados "mutantes de baixo teor de prolamina" que "mutantes de alto teor de lisina" (DOLL, 1984).

Animados com a descoberta desse alelo, melhoristas de milho de todas as partes do mundo começaram a transferi-lo para as variedades elites de milho comercialmente utilizadas. Porém, os grãos desses milhos que haviam recebido o alelo opaco-2 apresentaram, ligado ao aumento da qualidade nutritiva, uma série de características agronômicas desfavoráveis, dentre elas: produção de 8 a 15% menos que as variedades tradicionais, maior suscetibilidade a doenças e pragas devido ao grão ser mole,

menor tamanho e densidade do grão (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988).

Porém, foi possível modificar esses efeitos e produzir os genótipos QPM, que associam altos teores de lisina e triptofano com alta produtividade, aparência tradicional e dureza do grão. Esse trabalho foi inicialmente desenvolvido pelo CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo), no México; e baseou-se no uso combinado de dois sistemas genéticos envolvendo o gene opaco-2 e modificadores genéticos deste gene (VASAL *et alii*, 1982; VASAL, 1984).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, dois foram os novos caminhos propostos para aumentar a qualidade nutritiva do milho: isolar genes de zeínas, modificá-los *in vitro* e reinserir os mesmos no genoma; modificar a expressão dos genes existentes para aumentar a síntese daquelas proteínas com composição aminoacídica desejável.

O fato da fração zeína ser a mais abundante no endosperma do milho tem permitido o estudo dos elementos moleculares envolvidos neste sistema específico de proteína (mRNA e genes), bem como de vários passos de regulação na transcrição e tradução de mRNA de zeínas (TSAI, 1983).

LARKINS (1987) estudou a possibilidade de inserir trincas de nucleotídeos que codificarão para lisina em polipeptídeos de  $\alpha$ -zeína, sem afetar a síntese, mobilização e armazenamento a nível de corpos proteicos. Resultados preliminares indicam que a adição de uma única trinca não tem afetado a dinâmica desta proteína; porém, não se sabe se um número maior afetará a mesma; o que é de se esperar. A adição de



uma ou mais trincas de nucleotídeos depende basicamente do local onde as mesmas irão ser inseridas, isto é, se numa região vital ou não para a proteína.

A modificação de um ou poucos genes de proteínas de reserva poderá não ser suficiente para alterar significativamente a composição de aminoácidos do grão. Isto devido ao fato das frações proteicas, que compõem as zeínas, serem codificadas em sua maioria por famílias multigênicas. Portanto, para se ter um impacto significativo na qualidade nutritiva, o gene modificado terá que ser expressado a um nível muito maior que qualquer outro gene de proteína de reserva (SHEWRY *et alii*, 1981).

Da mesma forma que os genótipos Oz, os QPM's apresentam baixos teores de alfa e beta-zeína em comparação com os milhos normais. O gene mutante opaco-2 não afeta significativamente a expressão de genes de  $\gamma$ -zeína ao nível de RNA. Existe uma alta correlação entre o nível de modificação de um QPM e a quantidade de  $\gamma$ -zeína; quanto menos melhorado o QPM, menos  $\gamma$ -zeína o mesmo contém (WALLACE *et alii*, 1990).

A quantidade de triptofano e lisina presente no endosperma dos milhos QPM é, pelo menos, duas vezes maior que a encontrada nos milhos normais; um terço menos que a encontrada nos mutantes opaco-2 e aproximadamente igual à encontrada nos mutantes floury-2. O conteúdo de  $\gamma$ -zeína, medido por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay), nos milhos QPM é duas vezes maior que nos genótipos opaco-2 e floury-2. Isto leva a crer que para ter um alto conteúdo de lisina e triptofano, associado com endosperma duro, o genótipo deve também ter um alto teor de  $\gamma$ -zeína (PAIVA *et alii*, 1990; WALLACE *et alii*, 1990).

### 2.3. Sonda de DNA Marcada com Biotina

O uso da tecnologia de sondas de DNA cresceu vertiginosamente nos últimos anos. Este crescimento se deu principalmente na área médica, onde esta tecnologia já é largamente utilizada a nível de diagnose de doenças infecciosas, genéticas e adquiridas; além de veículo de avançados estudos básicos a nível da tecnologia de DNA recombinante. Na área vegetal, o uso desta tecnologia ainda não se fez sentir de uma maneira tão forte como na área médica; porém, muito tem sido feito para o desenvolvimento de procedimentos de diagnose de doenças de plantas, além de buscar aprofundamento cada vez maior a nível da tecnologia de DNA recombinante, visando capacitar o melhoramento vegetal com ferramentas de apoio ao mesmo, tais como: transferência gênica e seleção via marcadores genéticos (RFLP's).

A marcação das sondas, utilizadas nos estudos com a tecnologia de sondas de DNA, tem sido realizada na maioria dos casos com isótopos radioativos. Quatro tipos de isótopos radioativos são frequentemente utilizados, são eles:  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{131}\text{I}$  e  $^3\text{H}$ . Destes, o  $^{32}\text{P}$ , que emite raios  $\beta$ , é o mais utilizado. A alta energia da partícula específica do isótopo ( $>10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) leva a uma sensibilidade de detecção extremamente alta (DYKES *et alii*, 1986; SHELDON *et alii*, 1986; MALCOLM & FIGUEIREDO, 1988).

Porém, o uso do  $^{32}\text{P}$  apresenta uma série de desvantagens: a) a limitada meia-vida apresentada por este isótopo (10-14 dias), o que elimina a possibilidade de produzir "kits" de sondas estáveis; b) a extrema precaução, quanto à

segurança que deve ser seguida para o manuseio do mesmo, chega a ser incômoda; c) a dificuldade de se dispor do material remanescente em decorrência do baixo, mas sempre presente risco radioativo; d) o alto custo do material e a dificuldade de compra do mesmo, visto que todo ele é importado; e) as limitações da quantidade permitida para utilização; f) a necessidade de equipamento especial; e g) a necessidade de 1-5 dias para o adequado desenvolvimento do processo de detecção (BECKMANN & SOLLER, 1986; DYKES *et alii*, 1986; SHELDON *et alii*, 1986; MALCOLM & FIGUEIREDO, 1988; MEDEIROS *et alii*, 1989; TAKAHASHI *et alii*, 1989).

Como contra-partida a todas essas limitações ao uso de isótopos radioativos, o desenvolvimento de marcadores de sonda não radioativos tornou-se prioritário para a solução destes problemas e para que a tecnologia de sondas de DNA possa ser aplicada rotineiramente em estudos a nível de genética humana, animal e vegetal. A biotina (vitamina H) apresenta uma série de características que a torna um candidato ideal para a marcação de sondas de DNA; tais como a especificidade e a persistência da interação biotina e avidina - uma glicoproteína do ovo com 68 KD -, apresentando uma das maiores constantes de ligação conhecida ( $K_d = 10^{-15}$ ) (LANGER *et alii*, 1981 e 1982).

O uso de sondas marcadas com biotina foi primeiramente descrito por Davidson e colaboradores (SHELDON *et alii*, 1986) em aplicações que não requerem a sensibilidade necessária para os atuais experimentos a nível de "Southern-blots". Neste trabalho eles ligaram quimicamente a biotina ao RNA, via citocromo c ou pontes poliamínicas, e usaram

estes complexos RNA-biotina como sondas em hibridação *in situ* (LANGER *et alii*, 1981). Embora este procedimento tenha sido satisfatório para Davidson e colaboradores, um procedimento mais simples e mais geral se fazia necessário. Foi tendo como base este pressuposto, e acreditando que a biotina ligada diretamente a um nucleotídeo funcionaria mais adequadamente como um eficiente substrato para polimerização de sondas de DNA marcadas, que Langer e colaboradores iniciaram estudos visando a síntese enzimática de polinucleotídeos marcados com biotina.

Dos trabalhos de LANGER *et alii* (1981 e 1982) obteve-se a síntese de análogos de dUTP e UTP, que contêm uma molécula de biotina ligada covalentemente à posição c-5 da pirimidina por uma cadeia de átomos de carbono de tamanho variável. Estes nucleotídeos são eficientes substratos para polimerização de DNA ou RNA *in vitro*. Além do mais, polinucleotídeos polimerizados com nucleotídeos marcados com biotina mostraram características de desnaturação e reassociação que foram compatíveis com o uso dos polinucleotídeos como sondas. O que sugere que estes possam ser utilizados, em conjunto com reagentes apropriados de imuno-fluorescência, de afinidade ou de imuno-histoquímica, para detectar ou localizar sequências específicas em cromosomas, células, cortes citológicos e "blots".

O fato da avidina se ligar aleatoriamente ao DNA e à cromatina, levou ao desenvolvimento de um sistema de detecção alternativo. Este sistema utiliza a estreptavidina, um análogo da avidina, que é isolado a partir da *Streptomyces avidini*, e que exibe ligação específica à biotina no nucleotídeo marcado sem se ligar aleatoriamente ao DNA e à cromatina. A estreptavidina é uma

proteína de 60 KD, com quatro sítios de ligação para a biotina e similar constante de ligação, quando comparada com a avidina (LANGER *et alii*, 1982; UPDYKE & NICOLSON, 1985).

Embora o uso de polinucleotídeos marcados com biotina apresentasse uma série de vantagens quando comparado com a marcação com isótopos radioativos; isto é, considerável diminuição do tempo requerido para determinar os sítios de hibridação, estabilidade química das sondas marcadas por mais de dois anos e melhor a 4°C, resultados reproduzíveis mesmo após longo tempo de armazenamento das sondas marcadas, e menor coloração não-específica; a grande desvantagem dessas sondas marcadas com biotina era a falta de sensibilidade necessária para a detecção de genes de cópia única com menos de 2 Kb. Porém, os métodos até então utilizados eram protótipos, o que possibilitou o estudo buscando alternativas, tanto a nível do processo de marcação, quanto a nível do processo de detecção, que elevassem o grau de sensibilidade de até então (LANGER *et alii*, 1982; LEARY *et alii*, 1983; MANUELIDIS, 1985; DYKES *et alii*, 1986).

O uso de sondas de fita simples específica, obtidas por polimerização da fita sense do DNA do bacteriófago M13, tem se mostrado como um mecanismo bastante eficiente no aumento da eficiência de hibridação, quando comparado com sondas advindas de "Nick-translation". A construção deste tipo de sonda se torna possível pela existência de uma sequência única que se posiciona no lado 5' do sítio múltiplo de clonagem; esta sequência é utilizada como um "primer" que orienta a síntese da fita complementar sem que o inserto seja copiado (HU & MESSING, 1982; MEDEIROS *et alii*, 1988 e 1989; MACEDO *et alii*, 1989).

As razões teóricas do aumento da sensibilidade devido ao uso de sondas específicas clonadas em M13 são descritas por HU & MESSING (1982) e SHELDON *et alii* (1986). Dentre outras, cabe salientar que, devido ao fato da região de hibridação das sondas clonadas em M13 serem de fita simples, elas podem hibridar com o DNA alvo mais eficientemente. Somente uma fita da sequência específica está presente na sonda, impossibilitando a hibridação entre os segmentos de fita simples da sonda e evitando a concorrência com a hibridação a nível de DNA alvo. A fita sense do DNA M13 tem em torno de 7 Kb de comprimento, enquanto as sondas oriundas de "Nick-translation" geralmente têm menos de 1 Kb, o que torna o sistema que utiliza o M13 teoricamente possível de acomodar um número maior de nucleotídeos marcados com biotina (HU & MESSING, 1982; SHELDON *et alii*, 1986).

Por causa do genoma do bacteriófago M13 não ser inserido dentro de uma estrutura pré-determinada, não existe um limite rigoroso para o tamanho do DNA de fita simples que será envolto pela capa proteica. O tamanho da capa proteica, que envolve o ssDNA M13, varia de acordo com a quantidade de DNA que ela contém (MANIATIS *et alii*, 1989).

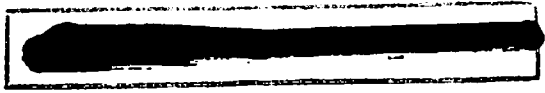
O bacteriófago M13 gera grande quantidade de moléculas de DNA que carrega a sequência de uma das fitas do fragmento de DNA inserido. Este DNA de fita simples e circular serve como molde para gerar sondas de DNA marcadas com biotina em uma das fitas (HU & MESSING, 1982; MEDEIROS *et alii*, 1988 e 1989; MACEDO *et alii*, 1989; MANIATIS *et alii*, 1989).

A única limitação do sistema de produção de sonda utilizando o M13 é que o DNA alvo não deve conter a fita (-) do

gene *lacZ*. A razão desta limitação é o fato da fita (+) do gene *lacZ*, que fica próxima à região onde foi inserido o inserto, também não ter sido duplicada (HU & MESSING, 1982).

TAKAHASHI *et alii* (1989) descreve um sistema alternativo de marcação de DNA usando biotina. Este sistema tem como base o uso de hexanucleotídeos aleatórios que são utilizados como "primer's" na síntese de DNA marcado; segundo os autores foi obtido um limite de sensibilidade abaixo de  $20 \times 10^{-18}$  g.

Buscando o aumento da sensibilidade da tecnologia de sondas de DNA marcadas com biotina, muitos autores buscaram desenvolver métodos colorimétricos que possibilitassem uma visualização com resolução e sensibilidade superior à encontrada nos métodos de detecção via autorradiografia. A utilização da alta constante de ligação da estreptavidina com a biotina, conjuntamente com técnicas padrões de coloração baseadas nos uso da fosfatase alcalina ou peroxidase, mostrou ser um importante sistema que possibilita a detecção da sonda marcada com biotina, após a hibridação com o DNA alvo. A maneira pela qual esta reação de detecção deveria proceder, para que fosse obtido um alto grau de resolução, foi a preocupação seguinte. Dos processos estudados o que utiliza o conjugado Estreptavidina-Fosfatase alcalina apresenta uma sensibilidade em torno de 50 vezes superior à sensibilidade obtida com os reagentes imunológicos ou de afinidade previamente utilizados. Este sistema já tem possibilitado a visualização de seqüências presentes ao nível de uma cópia por célula (LANGER *et alii*, 1982; LEARY *et alii*, 1983; SEYFERT, 1985; DYKES *et alii*, 1986; SHELDON *et alii*, 1986; MALCOLM & FIGUEIREDO, 1988; MEDEIROS *et alii*, 1988 e 1989; MACEDO



et alii, 1989; TAKAHASHI et alii, 1989).

Embora alguns sistemas de "marcação-a-frio", utilizando biotina, e alguns dos sistemas de detecção da mesma já possibilitem uma visualização com sensibilidade e resolução igual ou superior às autorradiografias; estudos têm continuado visando obter sistemas ainda mais vantajosos. WHITEHEAD et alii (1983) descreve o uso de Bio-luminescência catalizada pela HRP (Horseradish Peroxidase); este sistema pode ser detectado tanto por autorradiografia quanto pelo uso de um "luminometro", além de ter um tempo de detecção de minutos e uma sensibilidade comparada com  $^{32}\text{P}$ . Recentemente, FOSTER et alii (1985) desenvolveram a fotobiotina, a qual apresenta a vantagem de não requerer nenhuma enzima para detecção.

#### 2.4. Isolamento e Purificação de DNA Genômico

O DNA alvo, seja qual for a fonte, deve preencher um requerimento essencial, isto é, deve ser de alto peso molecular. O isolamento de DNA de alto peso molecular que seja adequado para a digestão com endonucleases de restrição pode ser um sério obstáculo ao progresso de estudos a nível molecular em muitas espécies (KAISER & MURRAY, 1985; DOYLE et alii, 1990).

É inevitável que se proceda certo grau de quebra durante o isolamento do DNA genômico das células, isto devido a choque mecânico durante o processo e à ação de enzimas degradativas liberadas durante a ruptura das células. Estas enzimas degradativas se encontram principalmente no citoplasma e, de uma maneira geral, os procedimentos descritos na literatura



não se preocupam em separar inicialmente o núcleo do restante da célula, exceto em um dos procedimentos descritos por DAVIS *et alii* (1986).

Uma fonte comum de quebra mecânica é o excesso de mistura das soluções de DNA viscosas; especialmente quando os protocolos demandam diversos ciclos de extração com fenol ou outros solventes orgânicos (KAISER & MURRAY, 1985). O uso destes solventes orgânicos se faz necessário quando da inativação e remoção de enzimas que são usadas em um dos diversos passos de purificação do DNA. Porém, medidas adicionais são necessárias quando o DNA é purificado de misturas complexas de moléculas, isto é, de células lisadas. Neste caso é comum remover a maioria das proteínas por digestão com enzimas proteolíticas, como pronase e proteinase K; que são ativas contra um amplo espectro de proteínas nativas, as quais são posteriormente extraídas com solventes orgânicos (MANIATIS *et alii*, 1982).

O uso de detergentes fortes como agentes de lise não somente liberam o DNA, mas, simultaneamente, age como um inibidor de atividade de DNases endógenas. Após a lise, a solução torna-se viscosa devido à presença de DNA de alto peso molecular. A partir deste estado avançado, é essencial que a quebra mecânica seja levada a um mínimo, isto é, processos como misturas, homogeneização, expulsão através de pipetas e agulhas de seringas, devem ser evitados ao máximo (KAISER & MURRAY, 1985).

Os vegetais são particularmente notórios pela dificuldade de se trabalhar com eles em alguns procedimentos de isolamento de DNA, principalmente pelas características inerentes à parede celular que envolve o protoplasto vegetal. Além do mais,

um procedimento que trabalha com um grupo de plantas pode não ser satisfatório com outro, isto devido à diversidade encontrada entre as plantas e seus compostos secundários (DOYLE et alii, 1990)

DOYLE et alii (1990) também citam que métodos que requerem grandes quantidades de tecido, devido à baixa produção de DNA, são desvantajosos quando necessita isolar de um grande número de indivíduos. Os métodos que utilizam gradiente de CsCl (Cloreto de Césio) consomem tempo e são caros.

Desde SAGHAI-MAROOF et alii (1984), alguns autores têm salientado uso de procedimentos com CTAB (Hexadocyltrimethylammonium bromide), os quais se caracterizam por serem relativamente baratos e por apresentarem alta produção de DNA a partir de pequena quantidade de tecido (CHOISINGTON et alii, 1988; UMC RFLP Manual, 1989; DOYLE et alii, 1990).

## 2.5. O pUC8 e o Ciclo Biológico do Bacteriófago M13

O plasmídeo pUC8 é um elemento extracromosomal circular, de fita dupla, apresentando 2655 pares de bases e dois genes marcadores principais: o gene *lac* e o *Amp<sup>r</sup>*. O gene *lac* ou gene da  $\beta$ -galactosidase permite, quando presente e funcional, a formação de colônias azuis em placas contendo X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Idolyl- $\beta$ -D-Galactosidase) e IPTG (Isopropylthiogalactoside). O gene *Amp<sup>r</sup>* é o gene que confere resistência à ampicilina. O gene *lac* apresenta um sítio múltiplo de clonagem onde foi inserido o fragmento  $\gamma$ ZM5 (Figura 1).

A figura 2 mostra, em termos gerais, o ciclo

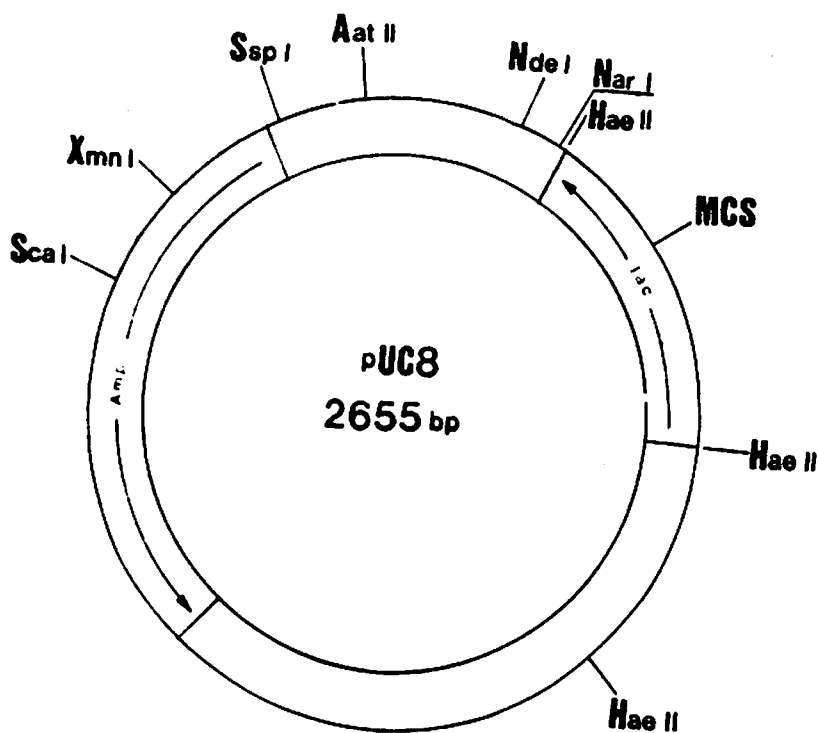
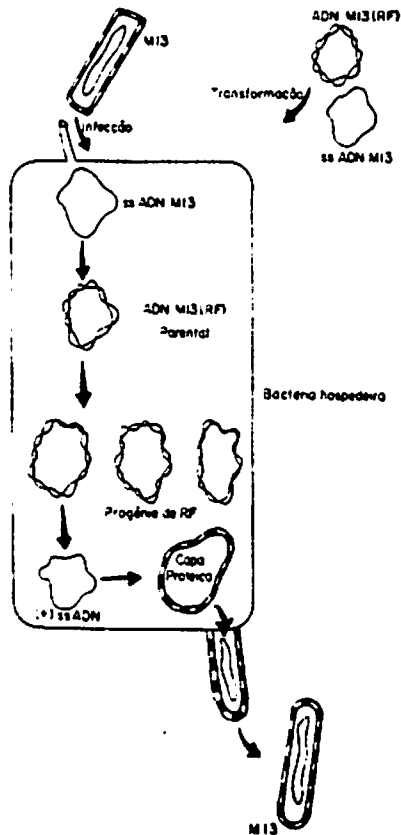


FIGURA 1. Plasmídeo pUC8 mostrando dois genes marcadores principais, *Amp<sup>r</sup>* (resistência ao antibiótico ampicilina) e *lac* ( $\beta$ -galactosidase). O gene da  $\beta$ -galactosidase apresenta um sítio de clonagem, onde são realizadas as inserções neste plasmídeo.



**FIGURA 2.** Ciclo Biológico do Bacteriófago M13. A introdução do DNA na bactéria hospedeira é feita via infecção ou transformação. Uma vez introduzido o DNA M13 (FR) parental é formado, e, a partir dele, é produzida a progênie de FR; até  $\approx 200$  cópias, quando passa a produzir somente ssDNA (+). O ssDNA (+) recebe a capa proteica na altura do espaço periplasmático e, através de um mecanismo não lítico, é expulso da bactéria.

biológico do bacteriófago M13. As duas mais importantes vias de introdução do DNA do bacteriófago M13, recombinante ou não, nas células da bactéria hospedeira são: a infecção, processo que exige que o bacteriófago tenha DNA de fita simples e que se encontre envolto pela capa proteica; e a transformação, procedimento em que tanto o DNA de fita simples sem capa proteica, quanto o DNA de fita dupla - forma replicativa (FR) - pode ser usado para transformar as células da bactéria hospedeira. A transformação utilizando DNA M13 (FR) é mais eficiente que a utilizando ssDNA M13 (MESSING, 1981).

Uma vez dentro da célula da bactéria hospedeira, a fita nonsense do M13mp18, com ou sem inserto, serve como molde para a síntese da fita sense complementar; formando assim, a forma replicativa parental do DNA viral. Esta forma replicativa do DNA viral é então amplificada até atingir em torno de 200 cópias por célula, quando então somente a fita nonsense continua a ser sintetizada. Com isso, a fita nonsense se associa com a capa proteica na altura do espaço periplasmático e, através de um mecanismo não lítico, é expulsa da bactéria hospedeira (MESSING, 1981; MANIATIS *et alii*, 1989).

## 2.6. Marcação via "Nick-translation"

A reação de marcação via "Nick-translation" é utilizada para a introdução de nucleotídeos, radioativos ou marcados com biotina, em fragmentos de DNA a serem utilizados como sondas. Esta reação de marcação é dependente de duas enzimas: DNase I e DNA Polymerase I.

A DNase I é uma endonuclease que hidrolisa DNA de fita simples ou fita dupla, produzindo uma complexa mistura de oligonucleotídeos com extremidade 5' livre. Na presença de  $Mg^{+2}$  a DNase I ataca cada fita de DNA independente e aleatoriamente. A quantidade de cortes realizados na fita de DNA a ser marcada é um fator que interfere diretamente na eficiência da marcação, de forma que poucos cortes levam a uma incorporação ineficiente de nucleotídeos marcados, enquanto o número elevado de cortes leva a um DNA bastante hidrolisado e de pequeno tamanho para a maioria dos experimentos. A DNA Polymerase I atua no processo com três atividades enzimáticas distintas; primeiramente ela atua como exonuclease no sentido 3'→ 5', retirando os nucleotídeos com radical OH livre, que foram gerados pelo corte com DNase I. Posteriormente, a DNA Polymerase I atua como polimerase no sentido 5'→ 3', introduzindo um nucleotídeo no local gerado pela ação de sua atividade de exonuclease 3'→ 5'; concomitantemente, a atividade de exonuclease 5'→ 3' da DNA Polymerase I retira o nucleotídeo com extremidade fosfato livre gerado pela ação da DNase I.

As atividades de exonuclease 5'→ 3' e polimerase 5'→ 3' continuam enquanto a reação não for interrompida, e se tem uma fita molde (SCHLEIF & WENSINK, 1981; MANIATIS *et alii*, 1982; DAVIS *et alii*, 1986).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivares

Como fonte de DNA genômico foram utilizados oito materiais obtidos no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA), Sete Lagoas, Minas Gerais. A tabela 2 apresenta uma caracterização dos oito materiais utilizados. A distribuição em três grupos - QPM, normal e mutante - foi feita de acordo com o padrão proteico da fração zeína apresentado em eletroforese (Figura 3).

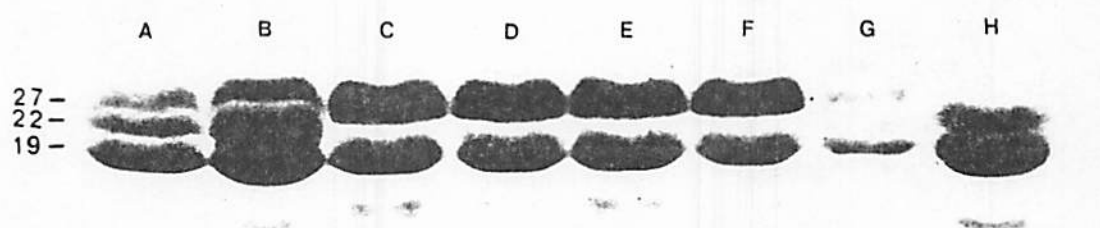
O grupo QPM caracterizou-se por apresentar o maior teor de  $\gamma$ -zeína dos três grupos, e foi composto por CMS 450, CMS 451, CMS 453 e CMS 454. O grupo normal caracterizou-se por apresentar teor intermediário de  $\gamma$ -zeína quando comparado com os demais grupos, e foi composto por BR 106 e BR 201. O grupo mutante apresentou o menor teor de  $\gamma$ -zeína dos três grupos, e foi composto por um mutante O<sub>2</sub> (IAC O<sub>2</sub> IV) e um mutante Fl<sub>2</sub> (Dentado Composto Fl<sub>2</sub>).

Plantas, com trinta dias da semeadura, foram liofilizadas (Continuous Freeze Dryer, New Brunswick Scientific

**TABELA 2. Relação e Caracterização dos Materiais de Milho Utilizados Neste Estudo.**

Material	Endosperma		Origem	Grupo
	Cor	Tipo		
CMS 450 (variedade)	Branco	Dentado	Pop. 63-Blanco Dentado 1 QPM	QPM
CMS 451 (variedade)	Branco	Dentado	Pop. 64-Blanco Dentado 2 QPM	QPM
CMS 453 (variedade)	Amarelo	Flint	Pop. 65-Yellow Flint QPM	QPM
CMS 454 (variedade)	Amarelo	Dentado	Pop. 66-Yellow Dentado QPM	QPM
BR 106 (variedade)	Amarelo	Dentado	Tuxpeño 1 X Tuxpeños Brasileiros	Normal
BR 201 (híbrido)	Amarelo	Semi-Dent.		Normal
IAC 1 O <sub>2</sub> IV (variedade)	Branco	Amiláceo		Mutante
Dentado Composto Fl <sub>2</sub> (variedade)	Branco	Amiláceo		Mutante





---

FIGURA 3. SDS-PAGE da fração zeína dos materiais utilizados neste estudo. BR 106 (A); BR 201 (B); CMS 450 (C); CMS 451 (D); CMS 453 (E); CMS 454 (F); Dentado Composto Flz (G); IAC Oz IV (H). Gama-zeína (27KD), Alfa-zeínas (22 e 19KD).

C.O., Inc./ Edison, N. J., USA) e imediatamente moídas em moinho com malha 0,5mm. Cada amostra foi composta do material de uma única planta, e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o isolamento do DNA genômico. Foram preparadas e armazenadas 50 plantas de cada uma das oito cultivares.

### 3.2. Obtenção do Fragmento $\gamma\text{ZM5}$ Marcado com Biotina

O fragmento de DNA  $\gamma\text{ZM5}$  utilizado como sonda é um dsDNA de  $\gamma$ -zeína, com aproximadamente 900 pares de bases, descrito por ESEN *et alii* (1982) e WANG & ESEN (1986). O fragmento foi obtido no laboratório do Dr. Brian A. Larkins da Universidade do Arizona/USA, na forma de uma colônia de bactéria *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$ , transformada com o plasmídeo pUC8, que trazia inserido no seu sítio múltiplo de clonagem o fragmento  $\gamma\text{ZM5}$ .

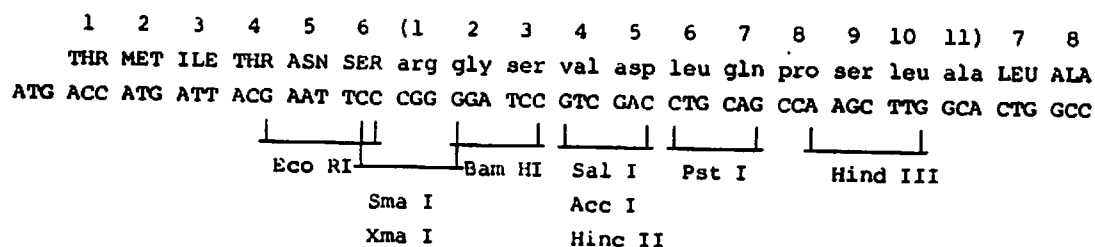
Visando obter o DNA plasmidial híbrido pUC8- $\gamma\text{ZM5}$  em quantidade e elevado grau de pureza, células de DH5 $\alpha$  transformadas foram multiplicadas em 2% Lennox L Broth Base com 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina, por uma noite a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação. O isolamento e a purificação do plasmídeo híbrido se deu pelo método "Plasmid Mini Preps" (UMC RFLP Manual, 1989), que consiste da lise das células da bactéria com 25mM Tris-Cl (pH 8,0), 10mM EDTA (pH 8,0), 50mM de glucose e 5mg/ml de lisozima. Para a liberação do DNA e precipitação da membrana plasmática tratou-se com 0,2M NaOH + 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) e com 3M KOAc (pH 5,5); a degradação do RNA se deu por ação da RNase A (10mg/ml) por 20' a  $37^{\circ}\text{C}$ . Purificou-se com fenol:clorofórmio (1:1); e a precipitação se deu com adição de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  para concentração final

de 1,5M e de 1,5X volume de ETOH 95% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), incubando-se por 30' à  $-80^{\circ}\text{C}$  e centrifugando a 15.600 rpm/15'/ $4^{\circ}\text{C}$ . O excesso de sal foi retirado com lavagens sucessivas com ETOH 80%; e o precipitado foi ressuspensão, após ter sido seco a vácuo, em TE-pH 8,0.

A separação do fragmento  $\gamma\text{ZM5}$  foi feita por digestão do plasmídeo híbrido pUC8- $\gamma\text{ZM5}$  com as endonucleases de restrição Eco R1 e Sal 1 (WANG & ESEN, 1986). Estes dois sítios de restrição encontram-se somente, e em uma única cópia cada no sítio múltiplo de clonagem do pUC8 (Figura 4).

A digestão do pUC8- $\gamma\text{ZM5}$  com endonucleases de restrição foi seguida de eletroforese em minigel de 1% agarose (Horizontal Gel Electrophoresis System - Model H6 - BRL), que, a 30V/16mA/10Watts durante três horas, permitiu separar os dois fragmentos de DNA de fita dupla -  $\gamma\text{ZM5}$  e pUC8 - de acordo com o tamanho.

A recuperação do fragmento  $\gamma\text{ZM5}$  do minigel de agarose foi feita conforme o protocolo descrito pela IBI para o modelo UEA (Unidirecional Electroelutor, Analytical). A eletroeluição unidirecional se deu em tampão 20mM Tris-Cl (pH 8,0) + 0,2mM EDTA + 5mM NaCl, para tampão de alta salinidade (10M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  + 0,1mg/ml de Azul de Bromofenol), a 125 Volts por 50'. O DNA foi precipitado em 2,5X volume de ETOH 95% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) incubando-se a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30' e centrifugando a 15.600 rpm/15'/ $4^{\circ}\text{C}$ . A lavagem do excesso de sal foi feita pela adição de ETOH 80% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e centrifugação a 15.600 rpm/15'/ $4^{\circ}\text{C}$ . Após as lavagens, o DNA foi ressuspensão em TE-pH 7,5 e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**FIGURA 4.** Sitio múltiplo de clonagem do plasmídeo pUC8 apresentando uma única cópia de sitio de restrição para Eco RI e para Sal I; as quais são utilizadas para que este plasmídeo possa receber o fragmento  $\gamma$ ZM5.

A marcação do fragmento  $\gamma$ ZM5 se deu em solução de marcação com 20 $\mu$ M de dNTP's (conforme nucleotídeo marcado utilizado), 1 $\mu$ g do fragmento  $\gamma$ ZM5, 20  $\mu$ M de nucleotídeo marcado com biotina, 2 unidades de DNA Polymerase I e 100 pg de DNase I, para um volume final de 50 $\mu$ l; por 90'/15 $^{\circ}$ C (BluGENE Manual, 1989). A reação de marcação foi interrompida por adição de EDTA (pH 8,0) e SDS para uma concentração final de 30mM e 0,1%, respectivamente.

A separação do  $\gamma$ ZM5 dos nucleotídeos livres na solução de marcação se faz necessária, antes do uso da sonda biológica no processo de hibridação, para que esses nucleotídeos não incorporados não viessem a se ligar com o DNA alvo, dificultando o reconhecimento, por parte da sonda, da sequência complementar à mesma no DNA alvo.

A filtração em gel de Sephadex G50 (coarse) possibilita um processo rápido e quantitativamente eficiente de recuperação da sonda biológica (BluGENE Manual, 1989). O protocolo de purificação utilizado no presente trabalho é uma variação do "Spun-Column Procedure" descrito por MANIATIS *et alii* (1982), e consistiu em filtrar a solução de marcação em uma coluna de Sephadex G50 (coarse) equilibrado em TE-pH 8,0 e empacotado em seringa descartável de 1ml. A filtração se deu por centrifugação da coluna por 1.500rpm/5'/temp. ambiente; sendo aproveitados os dois primeiros picos.

### 3.3. Obtenção do M13mp18- $\gamma$ ZM5 Marcado com Biotina

Objetivando a inserção do fragmento  $\gamma$ ZM5, fez-se

uma preparação inicial do DNA do bacteriófago M13mp18 (FR). Esta preparação, que visa gerar extremidades coesivas do fragmento a ser inserido, procedeu pela digestão do DNA M13mp18 (FR) com endonucleases de restrição. As endonucleases de restrição utilizadas foram Eco R1 e Sal 1, as quais apresentavam sítios de restrição únicos no sítio múltiplo de clonagem do M13mp18 (Figuras 5 e 6).

A inserção do fragmento  $\gamma$ ZM5 do DNA M13mp18 (FR) linear procedeu conforme DAVIS *et alii* (1986), onde ambos fragmentos são ligados em solução contendo T4 DNA Ligase.

A bactéria *E. coli*, cepa JM 103, foi selecionada em meio M9-Glicose (DAVIS *et alii*, 1986) e as bactérias se tornaram competentes crescendo em 2% Lennox L Broth Base a 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade ótica de 0,3 a 600nm e sendo posteriormente tratadas em 50mM CaCl<sub>2</sub> (MESSING, 1981; DAVIS *et alii*, 1986).

A transformação das células de JM 103 competentes foi feita por choque térmico da solução contendo as células competentes e o DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 (FR); obtido incubando a mesma por 40' no gelo/água e por 5' a 37°C (DAVIS *et alii*, 1986).

A seleção da JM 103 transformada foi feita por processos de coloração das colônias (DAVIS *et alii*, 1986). Os vectores da série M13mp carregam um pequeno segmento de DNA de *E. coli*, na sua maior região intergênica, que contém as sequências regulatórias e as informações para os primeiros 146 aminoácidos do gene da  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*), além de um sítio múltiplo de clonagem inserido neste segmento.

Para que a bactéria hospedeira possa ser infectada

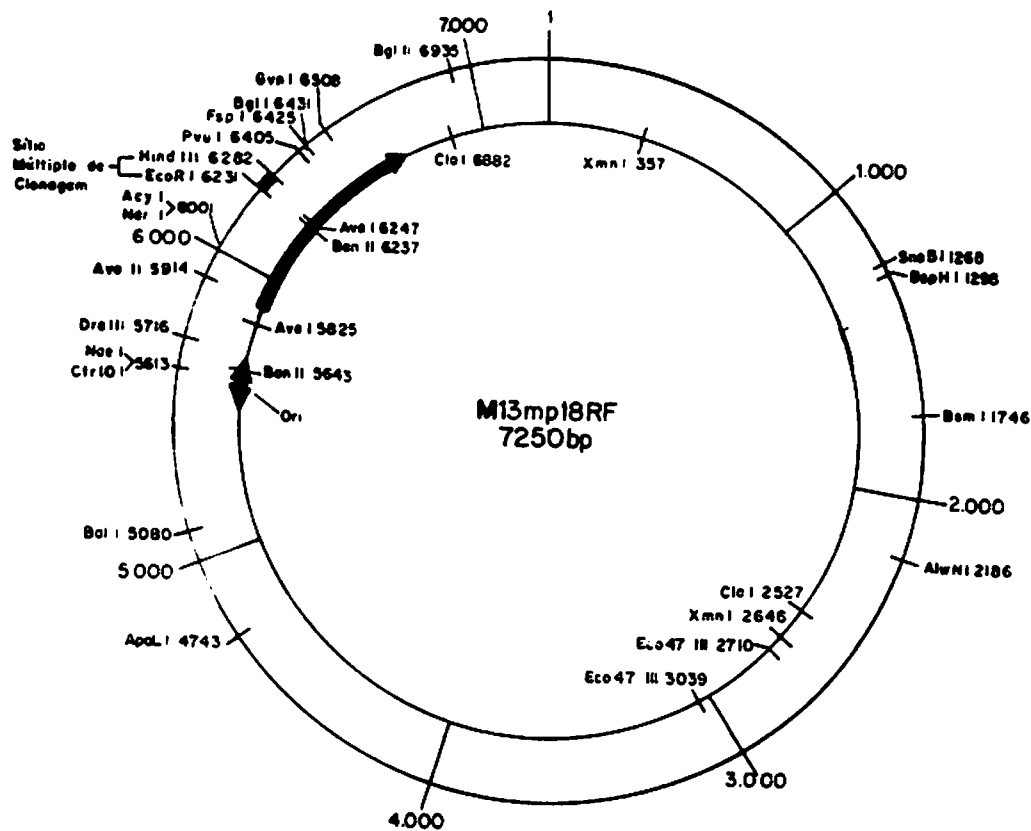
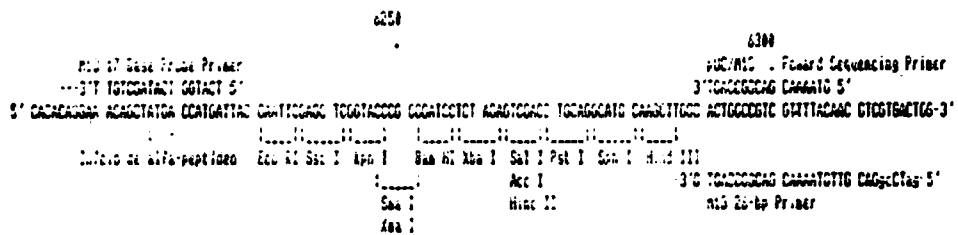


FIGURA 5. Representação esquemática do DNA vector M13mp18 (FR) apresentando um gene marcador principal, o *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase), o qual comporta um sítio múltiplo de clonagem.



**FIGURA 6.** Sítio múltiplo de clonagem do bacteriófago M13mp18, apresentando uma cópia de sítio de restrição para Eco RI e Sal 1; as quais são utilizadas para preparar o local de inserção do fragmento  $\gamma$ ZM5.



pelo bacteriófago M13, é necessário que a mesma carregue o plasmídeo F'; este plasmídeo carrega um gene da  $\beta$ -galactosidase com defeito que codifica para um polipeptídeo enzimaticamente inativo. Quando o fragmento amino-terminal da proteína  $\beta$ -galactosidase, produzindo em todas as células com um vector M13mp, associa-se com o polipeptídeo defeituoso, forma-se uma proteína enzimaticamente ativa. A essa associação é dado o nome de  $\alpha$ -complementação. As colônias das bactérias onde se processa a  $\alpha$ -complementação, quando plaqueadas em meio contendo IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosidase) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase), apresentam coloração azul.

A presença do sítio múltiplo de clonagem, inserido no gene da  $\beta$ -galactosidase presente no DNA dos vectores M13mp, não compromete a  $\alpha$ -complementação; porém, inserções adicionais de DNA neste sítio destrói a  $\alpha$ -complementação e gera recombinantes que produzem colônias brancas de crescimento retardado, quando plaqueados em meio com IPTG e X-Gal (MESSING, 1981; DAVIS et alii, 1986; M13 CLONING/DIDEOXY SEQUENCING INSTRUCTION Manual, 1988; MANIATIS et alii, 1989).

Após o choque térmico, a solução onde foi realizada a transformação foi misturada a 3ml de Top-Agar (2% Lennox L Broth Base + 0,8% Agar-Agar) com 10 $\mu$ l de 10% X-Gal (em Dimetilformamida - DMF) e 10 $\mu$ l de 0,1M IPTG e incubada à 37°C por 24 horas (DAVIS et alii, 1986).

Colônias individuais de JM 103 transformadas foram coletadas e transferidas para 2ml de meio de cultura (2% Lennox L Broth Base) e incubadas à 37°C por 6-7 horas, sob agitação. Após este período, foram transferidos 1,2ml da cultura para um

microtubo de 1,5ml e centrifugados a 8.000 rpm por 5' para separar as células de JM 103 do ssDNA M13mp18- $\gamma$ ZM5. O sobrenadante foi misturado com 200 $\mu$ l de 27% PEG-6000 em 3,3M NaCl, incubado por 1 hora à 4°C e centrifugado a 15.600 rpm por 5'. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 650 $\mu$ l de "Low Tris Buffer" [100mM Tris-Cl (pH 8,0) e 0,1M EDTA (pH 8,0)]. Adicionou-se então 40 $\mu$ l de 40% PEG-6000 e 5M NaCl, incubando-se por 30' à temp. ambiente. Após nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o precipitado em "Low Tris Buffer", tratou-se com RNase A e purificou-se o DNA com fenol, fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio:octanol (24:1). O DNA foi precipitado adicionando-se NaOAc para 0,3M, 2,5X volume com ETOH 95% (-20°C), incubando à -80°C por 30' e centrifugando a 15.600 rpm/15'/4°C. O ssDNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 foi ressuspense em TE-pH 8,0 e armazenado à -20°C.

A marcação da sonda  $\gamma$ ZM5, clonada no bacteriófago M13mp18, com nucleotídeos ligados a biotina, foi feita por adaptação de uma estratégia de marcação originalmente descrita por HU & MESSING (1982). Esta adaptação descrita por MEDEIROS *et alii* (1988 e 1989) e MACEDO *et alii* (1989), é baseada no anelamento do 17-base probe primer (5'-TCATGGTCATAGCTGTT-3', BRL) com a região 5' do sítio múltiplo de clonagem da fita molde nonsense do DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5; gerando, desta forma, um terminal OH livre, que é condição prioritária para a ação de polimerização da fita sense pela enzima Klenow Fragment DNA Polymerase I. Com esta adaptação foi obtida uma sonda constituída de um inserto não marcado e de fita simples, ligado a uma longa cadeia de fita dupla marcada com biotina (Figura 7).

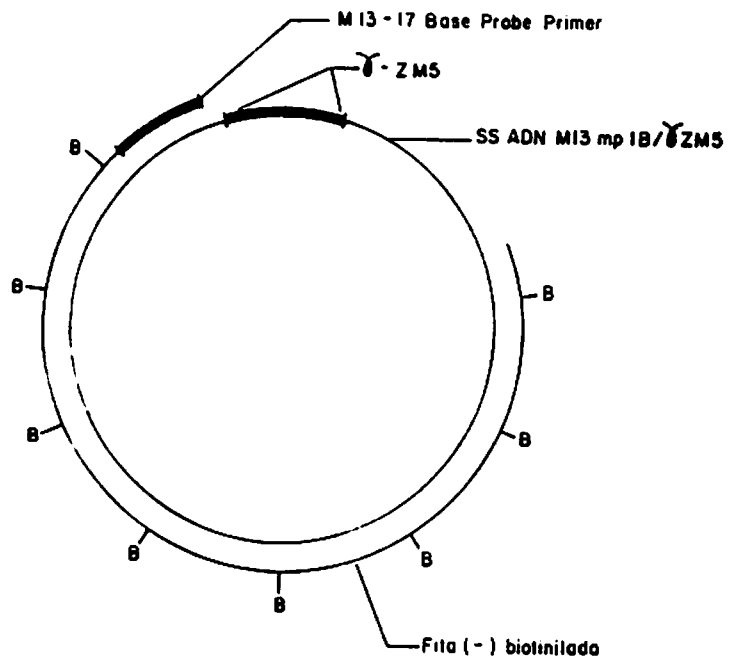


FIGURA 7. DNA M13mp18-γZM5 apresentando uma região específica com fita simples (γZM5) e uma região com fita dupla. A fita (-) apresenta nucleotídeos marcados com biotina.

Para o anelamento tratou-se a solução contendo o ssDNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 (3 $\mu$ g) + 17-base probe primer (10ng) + 1X Polymerase Reaction Buffer (BRL) por 5' em água fervente, e deixando-se esfriar em banho por aproximadamente 40' até atingir a temperatura ambiente.

A polimerização da fita sense do DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 foi feita adicionando 10mM DTT, 10 unidades de Klenow Fragment DNA Polymerase I, 40 $\mu$ g de Biotina-11-dUTP, dCTP e dGTP, e 4 $\mu$ M dATP; e incubou-se à 15<sup>o</sup>C por 90'. Quando o nucleotídeo marcado com biotina era análogo de dATP, isto é, Biotina-7-dATP ou Biotina-14-dATP, usou-se 40 $\mu$ M de todos os nucleotídeos.

A marcação foi interrompida por adição de EDTA (pH 8,0) e SDS para uma concentração final de 30mM e 0,1%, respectivamente; filtrada em coluna de Sephadex G50 (coarse) e armazenada à 4<sup>o</sup>C.

### 3.4. Avaliação dos Nucleotídeos Marcados

Buscando avaliar se o tipo de nucleotídeo marcado com biotina, influenciava ou não no grau de resolução do sistema; realizou-se um "Southern-blot" tendo como DNA alvo o fragmento  $\gamma$ ZM5 em 16 concentrações distintas. Como sonda foi utilizado o mesmo fragmento marcado com um dos três nucleotídeos ligados a biotina existentes no mercado, Biotina-7-dATP, Biotina-14-dATP e Biotina-11-dUTP. O sistema de detecção utilizado foi o baseado no conjugado SA-AP (Streptavidina-Fosfatase alcalina).

Os nucleotídeos Biotina-7-dATP e Biotina-14-dATP são análogos de dATP e apresentam uma molécula de biotina ligada


à posição 6 da purina por uma cadeia carbônica de 7 e 14 átomos, respectivamente. O nucleotídeo Biotina-11-dUTP é análogo de dTTP e apresenta uma molécula de biotina ligada à posição 5 da pirimidina por uma cadeia carbônica de 11 átomos.

O fragmento  $\gamma$ ZMS foi utilizado como DNA alvo em 16 concentrações distintas, variando de 25 nanogramas a 0,75 picogramas, numa diluição em série. O suporte sólido utilizado foi membrana de nylon (Nytran 0.45 $\mu$  - Schleider & Schuell). O fragmento  $\gamma$ ZMS, utilizado como sonda foi marcado via "Nick-translation"; e as lavagens pós-hibridação foram feitas à temperatura ambiente.

### 3.5. Isolamento, Purificação e Quantificação de DNA

Todas as metodologias de isolamento de ácido desoxirribonucleico de alto peso molecular testadas, isolam tanto o material genético cromosomal quanto o material genético extracromosomal, e é a este grupo de DNA que convencionou-se chamar, no presente trabalho, de DNA genômico ou DNA alvo.

O uso da trituração do tecido em nitrogênio líquido (MANIATIS *et alii*, 1982; HOISINGTON *et alii*, 1988; DOYLE *et alii*, 1990) exige que o material seja recém-colhido, além do isolamento ter que ser processado logo após a trituração; impossibilitando a armazenagem do mesmo. Cabe salientar que num processo de aplicação da técnica de fragmentos polimórficos de DNA, como ferramenta de auxílio ao melhoramento vegetal, serão observadas oportunidades em que o número de materiais a serem avaliados superará às possibilidades de isolamento e purificação de DNA em



laboratórios de estrutura similar ao Laboratório de Biotecnologia do CNPMS/EMBRAPA. Com isso, optou-se por um pré-tratamento composto de liofilização e moagem do tecido foliar, com conseqüente armazenamento à  $-20^{\circ}\text{C}$ , até que se possa proceder ao isolamento e purificação do DNA.

Visando identificar um procedimento de isolamento e purificação de DNA que melhor se adaptasse às condições do citado laboratório, buscou-se neste trabalho avaliar diversos protocolos propostos na literatura, ao mesmo tempo que tentava-se desenvolver um protocolo mais eficaz que os demais.

Pelo método de HOISINGTON *et alii* (1988), o DNA genômico foi extraído incubando 400mg de tecido liofilizado e moído em 9ml de tampão de extração CTAB [0,1M Tris-Cl (pH 7,5), 0,5M NaCl, 0,1M EDTA (pH 8,0), 0,14M  $\beta$ -mercaptoetanol, 1%  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NBr}$  (CTAB - PM 364,5g)] à  $60^{\circ}\text{C}/90'$ . A purificação se deu por sucessivas misturas com clorofórmio:octanol (24:1) e centrifugações a 3.000 rpm/10'/temp. ambiente. Após o tratamento com 500 $\mu\text{g}$  de RNase A por 30', o DNA foi precipitado em 6ml de isopropanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), lavado em 76% ETOH + 0,2M NaOAc por 20' e em 76% ETOH + 10mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  por 10''; e ressuspensão em TE-pH 7,5.

O método descrito no UMC RFLP Manual (1989) segue o protocolo acima descrito; porém, após a precipitação do DNA, o mesmo foi ressuspensão em TE-pH 7,5 por uma noite. Seguindo-se novo processo de purificação por mistura com igual volume de fenol e centrifugação a 3.000 rpm/10', e por mistura com igual volume de clorofórmio:octanol (24:1) e nova centrifugação. O DNA foi novamente precipitado adicionando 50 $\mu\text{l}$  de 5M NaCl e 2,5ml de ETOH 95% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Após a segunda precipitação, segue-se as

lavagens já descritas em HOISINGTON *et alii* (1988).

Seguindo protocolo de DOYLE *et alii* (1990), o DNA genômico foi extraído incubando-se 400mg de tecido liofilizado e moído em tampão de isolamento CTAB [100mM Tris-Cl (pH 7,5), 20mM EDTA (pH 8,0), 2% CTAB, 1,4M NaCl, 0,028M  $\beta$ -mercaptoetanol] a 65°C/30'. A purificação se deu por mistura com clorofórmio:octanol (24:1) e centrifugação a 3.000 rpm/10'/temp. ambiente. Os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando 6ml de isopropanol (-20°C) e incubados em ETOH 76% + 10mM NH<sub>4</sub>OAc por pelo menos 20', seguindo-se então o tratamento com RNase A (1 $\mu$ l de 10mg/ml)/30'/37°C. O DNA foi então precipitado adicionando-se 2X volume com TE-pH 7,5 ou dH<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,7) para concentração final de 2,5M, e 2,5X volume de ETOH 95% (-20°C).

Dois protocolos foram adaptados: no protocolo A, 400mg de tecido liofilizado e moído foram incubados em 10ml de 0,5M EDTA (pH 8,0) + 0,5% N-Lauroylsarcosine + 1mg proteinase K, por 15'/65°C e por 12 horas/37°C, sob agitação (150rpm). A purificação se deu com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 3.000 rpm/10'/temp. ambiente. Os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando 1/10 do volume de 3M NaOAc, 2X volume de água destilada e 20ml de ETOH 95% (-20°C); e lavados em 76% ETOH + 10mM NH<sub>4</sub>OAc por pelo menos 20'. Após a lavagem, os ácidos nucleicos foram secos à vácuo por 15' e ressuspensos em 4,5ml de TE-pH 7,5. O RNA foi degradado utilizando-se 10 $\mu$ g/ml de RNase A durante 30'/37°C, e nova purificação se deu adicionando NaOAc para 0,3M e igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado adicionando-se 6ml de ETOH 95% (-20°C); seguindo-se as lavagens descritas em HOISINGTON *et alii*

(1988).

O protocolo B foi uma adaptação do protocolo A, onde se utilizou a solução de extração descrita em HOISINGTON *et alii* (1988).

A quantificação do DNA genómico é necessária para viabilizar o uso adequado das endonucleases de restrição, bem como para padronizar DNA dos diversos materiais a serem estudados.

Dois foram os procedimentos avaliados para a quantificação do DNA genómico: espectrofotometria e uso de padrões de DNA de alto peso molecular. No primeiro procedimento utilizou-se de uma característica que é inerente aos ácidos nucleicos, isto é, de absorver luz ultravioleta tão eficientemente que a absorbância óptica na faixa ultravioleta de 260nm pode ser usada como uma medida rápida, precisa e não destrutiva de quantificação (SCHLEIF & WENSINK, 1981; MANIATIS *et alii*, 1982). O segundo procedimento utiliza padrões de DNA de alto peso molecular (DNA do fago  $\lambda$ ) com concentrações conhecidas para, através de comparação visual de intensidade de bandas em géis de agarose, processar a quantificação.

Para quantificação via espectrofotometria, adicionou-se 10 $\mu$ l de DNA ressuspense em TE-pH 7,5 em 990 $\mu$ l de água destilada e foi feita a leitura da absorbância a 260nm. Para cálculo da concentração utilizou-se a seguinte equação (MANIATIS *et alii*, 1982).

$$\text{Conc.}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 100 \times 50^{\mu\text{g}}}{1000\mu\text{l}}$$



### 3.6. "Southern-blot"

O objetivo da digestão com endonucleases de restrição foi gerar uma gama de fragmentos de DNA, de tamanhos diferentes, e em quantidade suficiente para viabilizar a detecção da sonda marcada com biotina utilizada na hibridação. A quantidade do fragmento que tem que se posicionar na mesma região do gel de agarose após a eletroforese, a qual possibilitará a detecção da sonda é maior quanto menor for a resolução obtida com a sonda e com o sistema de detecção utilizados.

De uma maneira geral, buscou-se utilizar as endonucleases de restrição que não apresentavam sítios de restrição no fragmento  $\gamma$ ZM5, o qual tinha a sua sequência de bases conhecida. As reações de digestão com endonucleases de restrição seguiram orientação descrita por HOISINGTON *et alii* (1988). A solução de digestão consistiu de 1X tampão de digestão #3 (BRL), 10 $\mu$ g de DNA genômico (MANIATIS *et alii*, 1982) e 30-50 unidades de Eco R1 (BRL) num volume de 300 $\mu$ l. A digestão se deu a 37°C por 24 horas; parando-se a reação com NaCl suficiente para uma concentração final de 0,25M. A precipitação se deu adicionando 2,5X o volume com ETOH 95% (-20°C), incubando por 30' à -80°C e centrifugando por 15.600 rpm/15'/4°C. O excesso de sal foi retirado com lavagem do precipitado em ETOH 80%; após a lavagem, o mesmo foi seco à vácuo e ressuspensão em TE-pH 7,5.

Visando padronização dos trabalhos buscou-se trabalhar com gel de agarose 0,6%, tampão de corrida TBE 1X (MANIATIS *et alii*, 1982), e 30Volts/16mA/10Watts. O tempo de corrida variou de acordo com o objetivo da eletroforese, sendo de

3 horas para as eletroforeses que tinham como objetivo separar poucos fragmentos de tamanho distintos (pUC8 e  $\gamma$ ZM5), quantificar DNA de alto peso molecular e avaliar taxa de contaminação com RNA. As eletroforeses com objetivo de separar fragmentos de restrição, gerados pela digestão do DNA genômico, processavam-se por 20 horas.

Após as eletroforeses, os géis eram coloridos em 500ml de água destilada + 50 $\mu$ l de Brometo de etídio (10mg/ml)/20' para que os DNA's pudessem ser visualizados com luz ultravioleta 254nm.

Os fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose foram desnaturados em 1,5M NaCl + 0,5M NaOH por 30' e o gel foi neutralizado em 1,5M NaCl + 1M Tris-Cl (pH 7,5) por 30'. Os fragmentos foram então transferidos para o suporte sólido - "Southern-transfer" - (SOUTHERN, 1975), utilizando-se da capilaridade, em 20X SSC (MANIATIS *et alii*, 1982) durante 18 horas, e imobilizados à 80°C/1hora à vácuo. As posições relativas dos fragmentos de DNA no gel são preservados durante a transferência (MANIATIS *et alii*, 1982).

A existência de uma variedade de sítios não específicos de ligação nos suportes sólidos utilizados (membrana de nitrocelulose e de nylon), onde se ligam não somente a sonda, mas também alguns reagentes utilizados durante o processo de detecção, determina a necessidade de um bloqueio destes sítios.

Utilizou-se a solução de bloqueio proposta por DYKES *et alii* (1986) - 1% Caseína hidrolizada enzimaticamente, 3% Calf Skin Gelatin (Sigma), 0,005% Tween 20, 0,5M NaCl e 0,1M Tris-Cl (pH 7,5) - em dois momentos, após a imobilização do DNA

no suporte sólido (por 6 horas à 50°C) e após as lavagens pós-hibridação (por 1 hora à temp. ambiente).

Embora a cinética de hibridação de sondas marcadas com biotina seja, virtualmente, idêntica à de sondas marcadas com radioisótopos; a modificação de alguns pontos na condição padrão utilizada baseou-se em DYKES *et alii* (1986) e MEDEIROS *et alii* (1988 e 1989) e foi composta por 45% formamida, 105 Dextran Sulfate (Sigma), 5X SSC, 0,1% SDS, 20mM fosfato de sódio monobásico (pH 7,0), 0,02% PVP-40, 0,2% ficoll-400 e 0,02% Calf Skin Gelatin (Sigma). A hibridação se deu à 42°C por 24 horas.

Seguindo à hibridação, as membranas foram lavadas por 2x5' à temp. ambiente com 2X SSC + 0,1% SDS, 2x5' à temp. ambiente com 1X SSC + 0,1% SDS, 2x30' à 60°C em 0,1X SSC + 0,1% SDS e 1x30'' à temp. ambiente em 2X SSC. A ligação do conjugado SA-AP/BRL à biotina marcando a sonda se deu incubando as membranas em solução de 1:1000 de SA-AP: "Complex Dilution Buffer" [0,1M Tris-Cl (pH 7,5) + 5% Tween 20] por uma hora. Antes das membranas serem colocadas no tampão de coloração (0,1M Tris, 0,1M NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub> - pH 9,1) contendo 200µg/ml de BCIP e 50µg/ml de NBT, as mesmas foram lavadas por 4x10' em 0,1M Tris-Cl (pH 7,5) + 0,5M NaCl e por 2x15' no tampão de coloração sem BCIP nem NBT.

A coloração se processou por 3 horas à temp. ambiente e no escuro. a reação de coloração foi interrompida lavando-se as membranas com água destilada e secando à vácuo por 20' à 80°C.

### 3.7. DNA de *Rhizobium sp.* e o Fragmento PCQ 15

Tendo em vista a doação, por parte da Prof<sup>a</sup> Nádja M<sup>a</sup> H. de Sá Carneiro do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, de DNA genômico de estirpes de *Rhizobium sp.* com alto grau de pureza e com taxa mínima de degradação, além do fragmento de DNA de fita dupla PCQ15 (4Kb); decidiu-se, concomitantemente aos trabalhos com DNA genômico de milho, testar o uso deste fragmento como sonda marcada via "Nick-translation". Para tanto os DNA's genômicos de estirpes de *Rhizobium sp.* foram digeridos com a endonuclease de restrição Eco R1; e o PCQ15 marcado com Biotina-14-dATP ou Biotina-11-dUTP nas mesmas condições descritas anteriormente para o fragmento  $\gamma$ ZM5.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de tecido foliar preparadas, mesmo após um ano de armazenagem, apresentaram-se aptas para o isolamento e a purificação do DNA genômico. O tempo de armazenagem não pareceu influenciar na qualidade do DNA genômico isolado; porém, o tempo máximo que o material poderá ficar armazenado não foi determinado.

Como pode ser observado na figura 3, o grupo QPM apresenta um teor de  $\gamma$ -zeína (27KD) superior aos demais, sendo seguido pelo grupo normal, e por último, o grupo mutante. É visível também o menor teor de alfa-zeínas dos QPM's e do mutante Dentado Composto Flz quando comparados com o grupo normal.

O protocolo utilizado para a seleção de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) transformada com pUC8- $\gamma$ ZM5, se mostrou eficiente; não apresentando nenhum problema de contaminação nas diversas vezes em que o mesmo foi utilizado. Os protocolos de clonagem, isolamento e purificação do plasmídeo híbrido pUC8- $\gamma$ ZM5 foram, no seu conjunto, eficientes. Os mesmos possibilitaram a obtenção de concentrações sempre em torno de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, quando ressuspensos em 50 $\mu$ l de TE-pH 8,0; além de alto grau de pureza, mesmo quanto a

RNA, visto que só foi utilizada a RNase A.

A obtenção do fragmento  $\gamma$ ZM5 a partir do plasmídeo híbrido pUC8- $\gamma$ ZM5 mostrou-se eficiente quanto à digestão com as endonucleases de restrição Eco R1 e Sal 1, e à separação em gel de agarose. Porém, o processo de eletroeluição unidirecional utilizado para remover o DNA do fragmento  $\gamma$ ZM5 do gel de agarose mostrou-se pouco eficaz; recuperando-se cerca de 50% do fragmento presente no gel.

O protocolo de marcação via "Nick-translation" utilizado (BluGENE Manual, 1989), mostrou-se simples, rápido e eficiente para a incorporação de nucleotídeos marcados com biotina. Quanto à purificação do fragmento  $\gamma$ ZM5 marcado com biotina, observou-se que a coluna de Sephadex G50 (coarse) deve ser equilibrada no mesmo dia da utilização; não devendo ser armazenada após o equilíbrio.

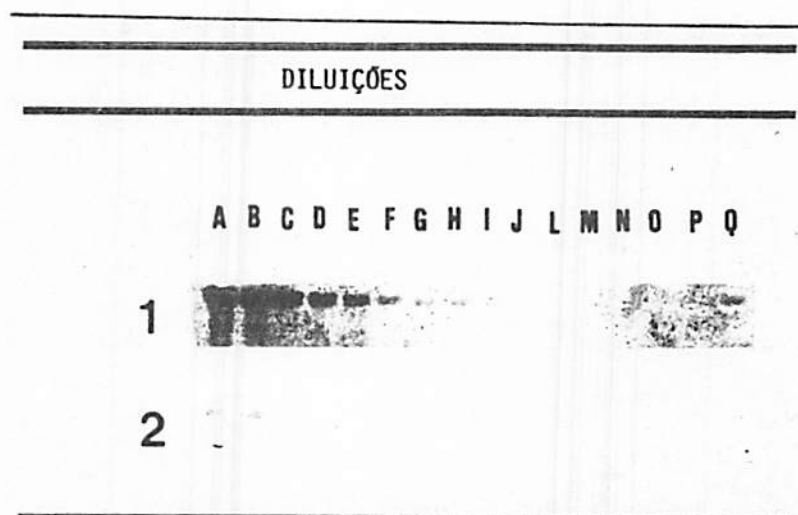
Quando o sistema foi testado como um todo, desde o isolamento e purificação do DNA genômico até a hibridação e detecção; isolou-se os DNA's genômicos dos oito materiais de milho citados na tabela 2, seguindo o protocolo de HOISINGTON et alii (1988) e utilizou-se como sonda o fragmento  $\gamma$ ZM5 marcado via "Nick-translation" com o nucleotídeo Biotina-7-dATP; e como controle correu-se, paralelamente aos DNA's genômicos digeridos, amostras do fragmento  $\gamma$ ZM5, para que o mesmo também servisse de DNA alvo. Em todas as tentativas somente o controle mostrou resposta positiva, levando inicialmente à suposição de que o único fator limitante era a resolução obtida com este tipo de sonda. Com isso, ou aumentava-se a quantidade de DNA genômico utilizado a um nível compatível com a resolução obtida, ou

buscava-se alternativas de melhoria da resolução obtida até então.

O uso de altas concentrações de DNA genômico pareceu inicialmente o caminho mais sensato a seguir; porém, o uso de altas concentrações de DNA resultou numa série de limitações quanto ao procedimento utilizado no laboratório, inviabilizando esta alternativa. Dentre as limitações podem ser citadas a digestão em volume superior ao padrão indicado por HOISINGTON *et alii* (1988); o uso de tubos maiores do que o microtubo de 1,5ml que é padrão para microcentrifugas, com isso diminuiu-se a eficiência de precipitação dos fragmentos após a digestão; e a necessidade de ressuspender os fragmentos de restrição em volumes superiores aos orifícios dos géis de agarose; etc.

Um teste dos nucleotídeos marcados com biotina existentes no mercado, feito para observar se os mesmos influenciavam ou não no grau de resolução, foi o passo seguinte. Como pode ser visto na figura 8, o nucleotídeo Biotina-7-dATP conferiu ao sistema um grau de resolução que permitiu a visualização de 100 picogramas do fragmento  $\gamma$ ZM5; este foi o menos eficiente dos três nucleotídeos marcados utilizados. Os nucleotídeos Biotina-14-dATP e Biotina-11-dUTP permitiram a visualização de 12 e 6 picogramas, respectivamente (Figuras 9 e 10). Cabe salientar que a taxa de ligações não-específicas obtida neste experimento não foi a ideal, chegando a dificultar a visualização das bandas de menor intensidade.

Segundo GRIERSON & COVEY (1984) uma célula haplóide de milho apresenta aproximadamente 6,2 picogramas de DNA nuclear




---

FIGURA 8. Grau de resolução obtido com o uso do fragmento  $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-7-dATP via "Nick-translation" (1); e com o uso do M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-7-dATP via polimerização da fita sense (2). A a Q representam concentrações de  $\gamma$ ZM5 variando de 250ng até 0,75pg, obtidas por diluição em série.



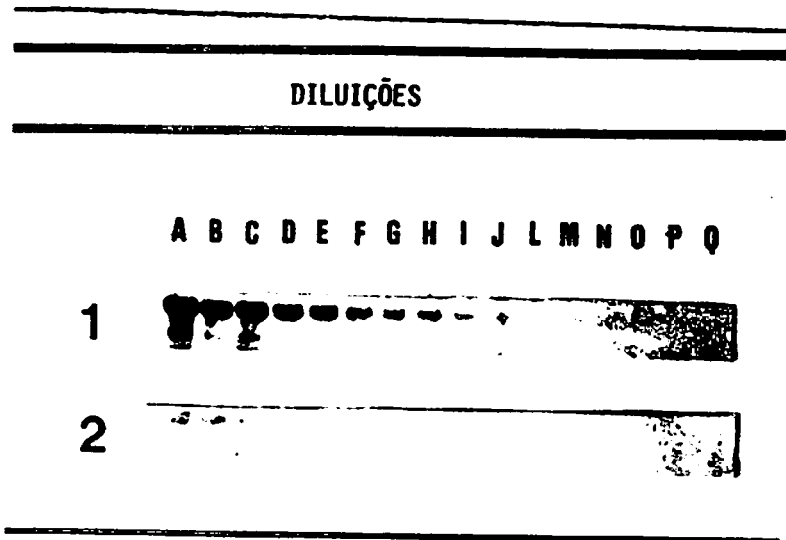
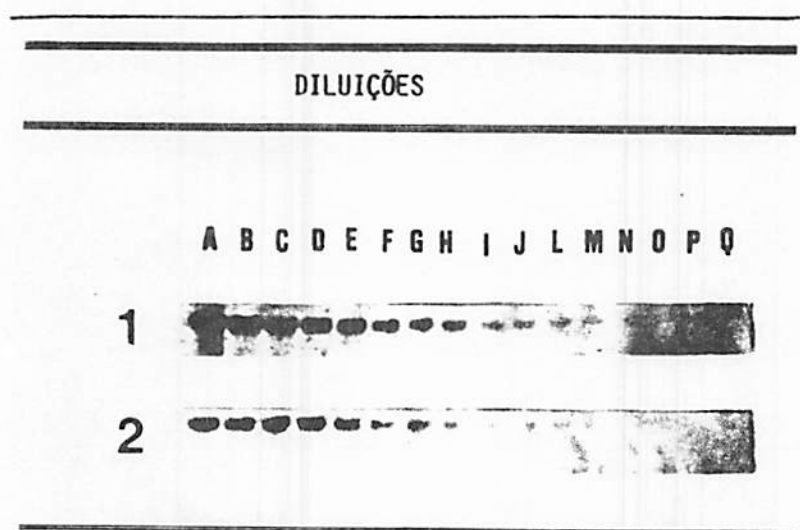


FIGURA 9. Grau de resolução obtido com o uso do fragmento  $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-14-dATP via "Nick-translation" (1); e com o uso do M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-14-dATP via polimerização da fita sense (2). A a Q representam concentrações de  $\gamma$ ZM5 variando de 250ng até 0,75pg, obtidas por diluição em série.




---

FIGURA 10. Grau de resolução obtido com o uso do fragmento  $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-11-dUTP via "Nick-translation" (1); e com o uso do M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-11-dUTP via polimerização da fita sense (2). A a Q representam concentrações de  $\gamma$ ZM5 variando de 250ng até 0,75pg, obtidas por diluição em série.

e que uma picograma de DNA representa aproximadamente  $10^9$  pares de bases; isto leva a algo em torno de  $2,48 \times 10^{10}$  nucleotídeos por núcleo diplóide de milho. Considerando que o fragmento  $\gamma ZM5$  apresenta em torno de 900 pares de bases (WANG & ESEN, 1986); buscava-se observar algo em torno de 3600 nucleotídeos, o que equivale a 2 cópias de cada uma das fitas do fragmento  $\gamma ZM5$  por célula diplóide de milho, isto é,  $18 \times 10^{-7}$  picogramas. Como foi obtida uma resolução que permite visualizar 6 picogramas deste fragmento em "Southern-blot"; necessitaria ter DNA nuclear de aproximadamente  $3,3 \times 10^6$  células de milho, isto é, 41,3 microgramas de DNA nuclear devidamente digerido e imobilizado no suporte sólido, para que fosse possível identificar cópias únicas de  $\gamma ZM5$  nos genomas dos milhos estudados. Isto deu a certeza que a simples mudança do nucleotídeo marcado era insuficiente para obter uma resolução capaz de possibilitar a identificação de cópia única complementar ao  $\gamma ZM5$  em  $10 \mu\text{g}$  de DNA genômico.

Assim, o uso do M13mp18- $\gamma ZM5$  foi proposto pelo Dr. Sérgio Danilo J. Pena do laboratório de genética bioquímica do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com objetivo de melhorar a sensibilidade do sistema explorando a possibilidade teórica do M13 acomodar um número maior de nucleotídeos marcados com biotina. Isto já vinha sendo confirmado com a alta resolução obtida em trabalhos que têm sido realizados no citado laboratório com outros insertos no M13mp18 (MACEDO *et alii*, 1989).

A taxa de transformação da JM 103 com o DNA M13mp18- $\gamma ZM5$  (FR) foi baixa, nas três vezes em que este processo foi utilizado. Essa ineficiência pode ter sido devido à

recircularização do DNA M13mp18 (FR) não recombinante. Como a digestão do DNA M13mp18 (FR) com as endonucleases de restrição Eco R1 e Sal 1 gera dois fragmentos de DNA, o DNA M13mp18 (FR) linear e um pequeno fragmento composto dos nucleotídeos que estavam entre os dois sítios de restrição, e , como esses não foram separados, os dois fragmentos podem ter voltado a se ligar durante o processo de inserção do  $\gamma$ ZM5, restabelecendo o DNA M13mp18 (FR) não recombinante.

Embora em quantidade bem menor que a esperada, e talvez devido à alta taxa de recircularização, foi ainda possível obter colônias de JM 103 transformadas com DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5; as quais foram utilizadas para clonagem e isolamento do ssDNA M13mp18- $\gamma$ ZM5.

A metodologia de clonagem, isolamento e purificação fita nonsense do DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 é um processo de obtenção em escala reduzida. Isto foi confirmado ao obter 20ng/ $\mu$ l em média, quando o ssDNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 foi ressuspenso em 50 $\mu$ l de TE-pH 8,0. Não foram observados quaisquer tipo de contaminação do DNA quando utilizou-se estes processos de isolamento e purificação.

Os resultados das figuras 8, 9, 10 e 11 são exemplos que mostram que a incorporação dos nucleotídeos marcados com biotina, via polimerização da fita sense do DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 se deu conforme o esperado e independentemente do nucleotídeo utilizado; isto é, as condições descritas realmente produzem uma sonda constituída de um inserto não marcado e de fita simples, ligado a uma longa cadeia de fita dupla marcada com biotina. Se isto não fosse verdade, não teria ocorrido a hibridação observada.



---

FIGURA 11. Fragmentos de DNA de fago  $\lambda$ , digerido com Hind III e marcados com biotina (1). DNA genômico de uma planta BR 201 (2) apresentando uma banda para M13mp18- $\gamma$ ZM5 entre os fragmentos 6,5 e 9,4 Kb (A), uma banda difusa abaixo de 2 Kb (B), e DNA genômico de milho digerido com Eco R1 sem apresentar banda para M13mp18- $\gamma$ ZM5 (3 e 4).

Buscando avaliar o grau de resolução obtido com o uso do M13mp18- $\gamma$ ZM5 como sonda marcada com biotina, realizou-se um "Southern-blot" tendo como DNA alvo o fragmento  $\gamma$ ZM5 nas 16 concentrações anteriormente descritas. Para a marcação da sonda com biotina foram utilizados os três nucleotídeos marcados com biotina, separadamente. Como o observado na ocasião em que o sistema de marcação utilizado foi o de "Nick-translation", o Biotina-11-dUTP forneceu a maior resolução, seguido pelo Biotina-14-dATP e Biotina-7-dATP, respectivamente. Porém, a resolução obtida com este sistema de marcação foi inferior à resolução obtida com o sistema de marcação via "Nick-translation" para os nucleotídeos Biotina-7-dATP (3ng) e para Biotina-14-dATP (400pg); e igual para Biotina-11-dUTP (6pg) (Figuras 8, 9 e 10).

Com esses resultados não foi possível afirmar que somente o nucleotídeo marcado tenha tornado distinta a resolução no sistema M13. Acredita-se que as quantidades de Biotina-7-dATP e Biotina-14-dATP utilizadas não tenham levado a uma polimerização tão otimizada quanto quando utilizou-se Biotina-11-dUTP. Este ponto tem fundamento em MACEDO *et alii* (1989), que indica que tanto a temperatura para polimerização quanto a quantidade de dATP são determinantes da eficiência de polimerização da fita sense do M13.

Mesmo com esses resultados, continuou-se os estudos com o M13mp18- $\gamma$ ZM5 como sonda biológica, tendo como referencial os resultados obtidos por Pena e colaboradores (MACEDO *et alii*, 1989; MEDEIROS *et alii*, 1988 e 1989). A figura 11 mostra uma membrana de nitrocelulose trazendo duas bandas de 10 $\mu$ g de DNA genômico do BR 201 digerido com Eco R1. Uma banda, bem definida,

num fragmento de restrição de tamanho entre 6,5 e 9,4 Kb; e, portanto, podendo apresentar mais de uma cópia do  $\gamma$ ZM5. A outra banda, embora seja uma banda difusa, apresenta-se em fragmento de restrição de tamanho inferior a 2 Kb. Esta membrana foi obtida utilizando, como sonda biológica, o DNA híbrido M13mp18- $\gamma$ ZM5 com fita sense contendo nucleotídeos marcados com Biotina-11-dUTP. A temperatura de lavagem pós-hibridação foi de 60°C; isto é, sob condições bastante severas, onde não deve ter ocorrido hibridação cruzada com sequências de DNA que codificam para  $\beta$ -Zeína (15KD) e que apresentam duas regiões de homologia com a gama-zeína (27KD) (SHOTWELL & LARKINS, 1989). Para se ter certeza que a banda no fragmento de restrição de tamanho entre 6,5 e 9,4 Kb apresenta somente uma cópia homóloga ao fragmento  $\gamma$ ZM5, e não duas ou mais cópias homólogas em série, seria necessário que o DNA genômico do BR 201 fosse digerido com outras enzimas de restrição com sítios específicos inexistentes no  $\gamma$ ZM5. Esta digestão teria como objetivo diminuir o tamanho do fragmento de restrição que deu origem à banda para algo em torno de 1,5 Kb, onde só seria possível ter uma única sequência altamente homóloga ao fragmento  $\gamma$ ZM5. A intensidade da banda pode dar uma idéia da existência de uma ou mais cópias.

A membrana de nitrocelulose apresentada na figura 11 trouxe, além do resultado positivo para o DNA genômico do BR 201, digerido com Eco R1, dois outros materiais igualmente isolados pelo protocolo descrito por HOISINGTON *et alii* (1988) e que não apresentaram nenhuma banda para  $\gamma$ ZM5. Esta membrana, juntamente com outros testes de digestão realizados no laboratório de Genética Bioquímica da UFMG, sob orientação da

Pesquisadora Andréa M. Macedo (em doutoramento pelo Departamento de Bioquímica da UFMG), levaram a acreditar que o DNA genômico isolado pelo protocolo citado não era suficientemente puro; o que levava, na maioria dos casos, a uma digestão parcial do DNA genômico. Esta digestão parcial poderia estar impossibilitando que fosse gerada a quantidade mínima necessária do fragmento de restrição que trazia a sequência homóloga ao fragmento  $\gamma$ ZM5. Daí os outros materiais não terem apresentado bandas para  $\gamma$ ZM5.

Foram avaliados quatro outros protocolos: UMC RFLP Manual (1989), DOYLE *et alii* (1990), protocolo A e protocolo B. Os protocolos A e B são modificações dos protocolos existentes, sendo que o primeiro utiliza o detergente N-Lauroylsarcosine como agente de lise e a proteinase K como enzima proteolítica, e o segundo utiliza o detergente CTAB como agente de lise.

Quanto à quantidade de DNA de alto peso molecular, todos os quatro protocolos geraram acima de 50 $\mu$ g a partir de 400 mg de tecido foliar liofilizado. Conforme pode ser visto nas figuras 12 e 13, os protocolos UMC RFLP Manual (1989), DOYLE *et alii* (1990) e protocolo B, resultaram na obtenção de altas taxas de DNA fragmentado; além de alta taxa de contaminação com RNA, quando comparados com DNA isolado de *Rhizobium sp.* e com o DNA obtido pelo protocolo A. Embora o uso de detergentes fortes venha a inibir a atividade de DNases endógenas liberadas com a lise (KAISER & MURRAY, 1985), os resultados levam a crer que só este fator não é capaz de evitar a alta taxa de fragmentação; requerendo que a purificação seja acompanhada da adição de enzimas proteolíticas de amplo espectro - proteinase K - e quelantes - EDTA -.



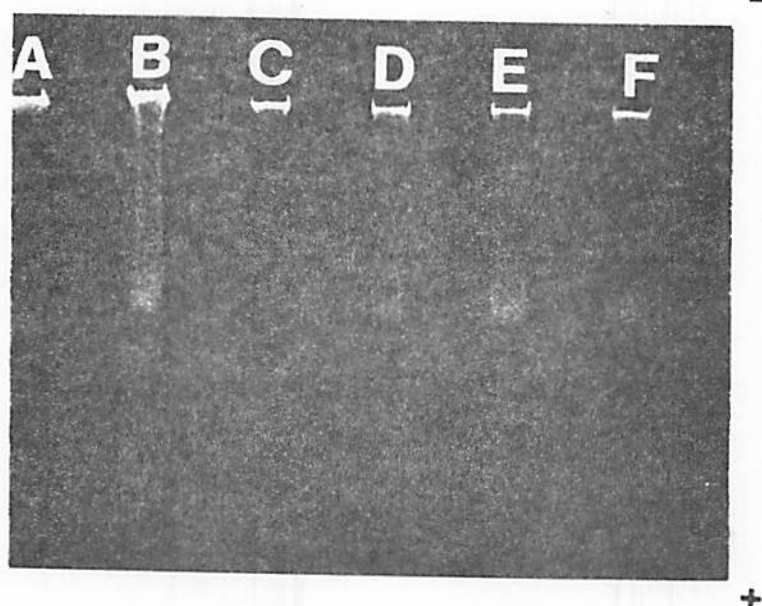
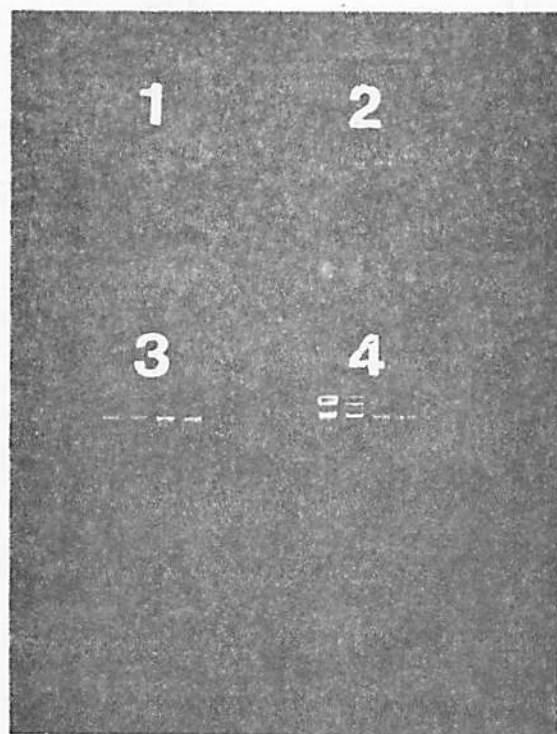


FIGURA 12. Padrões de DNA genômico isolados. DNA de *Rhizobium sp.* - estirpe CENA - (A), DNA's de milho isolados pelo protocolo HOISINGTON *et alii* (1988) (B), pelo protocolo A (C), pelo protocolo B (D), pelo protocolo DOYLE *et alii* (1990) (E) e pelo protocolo UMC RFLP Manual (1989) (F).



---


FIGURA 13. Padroes de DNA genômico isolados, com repetições. DNA's de milho isolados pelo protocolo UMC RFLP Manual (1989) (1), pelo protocolo DOYLE *et alii* (1990) (2), pelo protocolo A (3) e DNA's de *Rhizobium sp.* - estirpe CENA - (4). A figura salienta a repetitividade dos protocolos.

Todos os protocolos testados foram rápidos e simples. O protocolo A apresentou uma alta eficiência de ação da RNase A, mesmo sendo usada em baixa concentração, se comparado aos protocolos HOISINGTON *et alii* (1988) e UMC RFLP Manual (1989). O alto custo da proteinase K, visto que cada amostra exige 1mg desta enzima, apresentou-se como único fator limitante ao uso deste protocolo.

Um outro ponto que convém salientar quanto ao material isolado pelo protocolo A, é a não degradação do DNA com o tempo; isto é, foi observado que todos os outros protocolos levaram a um aumento da quantidade de DNA degradado durante o armazenamento a 4°C, o que não aconteceu com o material isolado pelo protocolo A. Este aumento da quantidade de DNA degradado deve-se provavelmente às impurezas na solução com DNA, principalmente quanto às DNases endógenas e seus cofatores.

Dos dois métodos de quantificação de DNA testados, espectrofotometria e DNA de alto peso molecular com concentração conhecida, este último apresentou-se como procedimento mais completo; tendo em vista que, além da quantificação do DNA de alto peso molecular, o mesmo possibilita ter acesso a informações quanto ao DNA fragmentado e ao RNA.

O uso da espectrofotometria exige, para uma precisa quantificação do DNA de alto peso molecular, que a solução esteja pura; isto é, sem significante quantidade de contaminantes, tais como: proteínas, fenol, agarose, CTAB, fragmentos de DNA de fita simples e RNA. Como a espectrofotometria mede a quantidade de radiação ultravioleta absorvida pela base nitrogenada constituinte do nucleotídeo (MANIATIS *et alii*, 1982), a mesma



leva a quantificação superestimada; visto que, além do DNA de alto peso molecular, que é o único útil ao processo, ela quantifica os nucleotídeos livres, os fragmentos de DNA de fita simples, os fragmentos de DNA de fita dupla gerados durante o isolamento e a purificação, e o RNA que por ventura estejam na amostra.

A quantificação via comparação com padrões de DNA de alto peso molecular com concentrações conhecidas, embora seja bastante dependente da observação pessoal, possibilita considerar exclusivamente o DNA de alto peso molecular.

A figura 14 apresenta o exemplo de um gel de agarose com oito padrões de DNA de alto peso molecular, com concentrações conhecidas de DNA, e utilizadas para quantificar oito materiais com volume conhecido. Por exemplo, o DNA genômico do CMS 450 mostra intensidade próxima da banda padrão correspondente a 175ng; como o volume da solução com este DNA genômico foi de 3 $\mu$ l, a concentração do CMS 450 - isolado pelo protocolo A - é aproximadamente 60ng/ $\mu$ l.

Se por um lado a espectrofotometria superestima a quantificação quando o DNA genômico tem alta taxa de degradação e/ou contaminação com RNA; por outro lado, observou-se que ela pode subestimar a quantificação quando a amostra tem somente DNA de alto peso molecular. Para tanto, tem-se como exemplo, o mesmo DNA genômico do CMS 450 da figura 14, que apresentou uma concentração de 35ng/ $\mu$ l pela espectrofotometria. Isto também foi observado com outros materiais do referido gel.

A digestão do DNA genômico é dependente do grau de pureza do DNA e da solução que o contém. Se a amostra for de alta

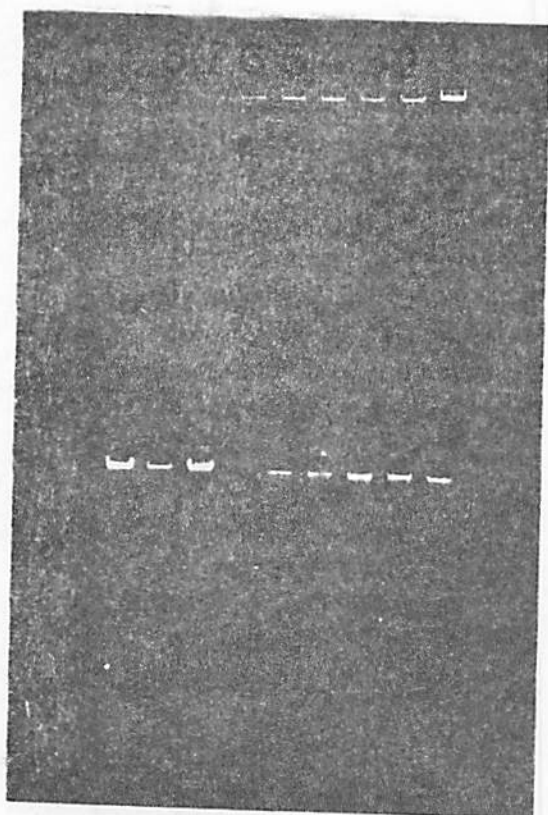


FIGURA 14. Padrões de DNA de alto peso molecular utilizados para quantificação de DNA genômico por comparação visual. No alto, da direita para a esquerda, padrões de DNA de fago  $\lambda$  com 250ng, 200ng, 175ng, 150ng, 100ng, 50ng, 25ng e 12,5ng, respectivamente. No centro, da direita para a esquerda, DNA de CMS 450, CMS 451, Dentado Composto Flz, CMS 453, CMS 454, DNA de *Rhizobium sp.* estirpes CIAT, SEMIA e CENA.

pureza, a digestão conforme protocolo descrito por HOISINGTON *et alii* (1988) se mostra eficaz. Não necessitando que a mesma seja prolongada por 24 horas; isto é, somente 12 horas foi suficiente para uma digestão total de 10 $\mu$ g de DNA genômico.

A manutenção das posições relativas dos fragmentos de restrição, por ocasião da transferência dos mesmos do gel de agarose para a membrana de nitrocelulose, pode ser visualizada na figura 15. Nela observou-se que as linhas onde se encontram o DNA genômico digerido mantiveram as distâncias entre si; além das bandas apresentadas se mostrarem retilíneas e bem definidas.

Decidiu-se, concomitantemente aos estudos procurando obter um melhor protocolo de isolamento e purificação de DNA genômico de milho, utilizar os DNA's de estirpes de *Rhizobium sp.* e o fragmento de DNA de fita dupla PCQ 15 como DNA alvo e DNA sonda, respectivamente, para avaliar pontos como membranas, o bloqueio dos sítios não específicos, as condições para hibridação e lavagens pós-hibridação, e o sistema de detecção proposto.

A figura 15 mostra uma membrana de nitrocelulose apresentando os padrões pós-deteccção de seis DNA's de estirpes de *Rhizobium sp.* digeridos com Eco R1 e hibridados com o fragmento PCQ 15 marcado com Biotina-14-dATP via "Nick-translation". Observa-se a diminuta taxa de ligações não específicas, o que confirma a eficiência da solução de bloqueio proposta por DYKES *et alii* (1986). A linha 2 mostra uma mancha representativa de material parcialmente digerido; a disposição aleatória dos fragmentos contendo sequências homólogas ao PCQ 15, gera este tipo de ligação não específica. As linhas 3, 4, 5 e 6 mostram

1 2 3 4 5 6



FIGURA 15. Membrana de nitrocelulose mostrando padrões de pós-deteccção de DNA de estirpes de *Rhizobium sp.*, digeridos com Eco R1 e hibridados com PCQ15 marcado com Biotina-14-dATP via "Nick-translation".

bandas perfeitas dentre elas encontramos bandas de igual intensidade e de intensidades diferentes, o que, levando-se em conta o tamanho do fragmento de restrição no qual a mesma se encontra, pode dar uma idéia da existência ou não de sequências de um mesmo fragmento de DNA repetidas em série dentro de um mesmo fragmento de restrição.

O resultado mostrado na figura 11 confirma a eficiência do uso da sonda M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcada com Biotina-11-dUTP para detecção de cópia única do gene que codifica para  $\gamma$ -zeína e que tem menos de 2 Kb. Porém, antes de continuar estudo com o M13, a sugestão seria continuar este trabalho, testando a resolução de fragmentos menores de 2 Kb gerados a partir da digestão do PCQ 15 com endonucleases de restrição, e marcados com Biotina-14-dATP ou Biotina-11-dUTP via "Nick-translation" Para tanto poderia utilizar o PCQ 15, com 4 Kb, como padrão.

A tecnologia de sondas de DNA poderá permitir, nos moldes descritos neste trabalho, uma precisa quantificação das cópias altamente homólogas ao fragmento  $\gamma$ ZM5, desde que sejam resolvidos os problemas inerentes ao isolamento e purificação do DNA genômico do milho.

Foi condição prioritária para gerar o DNA alvo a ser utilizado neste estudo e nas futuras aplicações da técnica de fragmentos polimórficos de DNA no melhoramento de milho no CNPMS/EMBRAPA, que o protocolo de isolamento e purificação de DNA genômico partisse de uma única planta, sem o sacrifício da mesma, e gerasse uma grande quantidade de DNA de alto peso molecular, com baixa taxa de degradação e alto grau de pureza. Além de ser



um protocolo rápido, simples e de baixo custo.

Em alguns momentos, como por exemplo na seleção massal em populações de milho, um único indivíduo é representante de um material a ser selecionado em um processo de melhoramento, isto leva à necessidade de um protocolo de isolamento e purificação que não exija o sacrifício do indivíduo, nem comprometa substancialmente a obtenção da progênie do mesmo. Além disso, a praticidade da coleta do material de onde será retirado o DNA deve ser considerada; visto que, em alguns momentos a seleção se dá em um "stand" bastante numeroso, dependendo da cultura. Estes fatores definiram a escolha do tecido foliar como fonte de material para o isolamento e a purificação do DNA genômico.

## 5. CONCLUSÕES

A marcação de DNA via "Nick-translation" utilizando tanto o Biotina-11-dUTP quanto o Biotina-14-dATP, confere resolução suficiente para a detecção de cópia única de fragmentos, com tamanho igual ou superior a 4Kb.

O M13mp18- $\gamma$ ZM5 marcado com Biotina-11-dUTP se mostrou eficiente para a detecção de cópia única do fragmento  $\gamma$ ZM5 no DNA genómico de milho.

O isolamento e a purificação de DNA de alto peso molecular de milho, com qualidade para ser digerido eficientemente em quantidades superiores a 10 $\mu$ g, se mostrou como o principal problema para que a parte laboratorial da tecnologia de sondas de DNA de milho marcadas com biotina se torne rotina. O protocolo A foi, dos avaliados, o que mais se aproximou do protocolo considerado ideal, tanto a nível das características inerentes ao próprio protocolo, quanto a nível das características inerentes ao DNA obtido. Porém, a alta demanda por proteinase K e o alto custo de obtenção da mesma, se mantêm como pontos limitantes. Modificações que diminuam significativamente a demanda por proteinase K, sem perda da

eficiência de isolamento e purificação, se fazem necessárias.

Mesmo dependendo de observação pessoal, a quantificação usando padrões de DNA de alto peso molecular, com concentrações conhecidas, possibilita ter uma noção mais precisa da concentração e da qualidade do DNA isolado; se comparado com a quantificação via espectrofotometria.

O BR 201 apresentou, para uma única planta, duas bandas para o fragmento  $\gamma$ ZM5. Embora este resultado não possa ser generalizado para as demais plantas de BR 201, fortalece a hipótese de ocorrência de amplificação do gene que codifica para o polinucleotídeo que deu origem ao fragmento  $\gamma$ ZM5.

A metodologia, utilizada no presente trabalho, satisfaz as exigências de laboratório para a aplicação da tecnologia de sondas de DNA marcadas com biotina como ferramenta de apoio ao melhoramento de milho; porém, ainda continua dependente de um protocolo de purificação de DNA genômico de milho com baixa taxa de fragmentação e alto grau de pureza.

Os resultados obtidos com a utilização de DNA de *Rhizobium sp.* como DNA alvo, e do fragmento PCQ 15 como sonda biológica, são as evidências mais fortes do potencial da técnica e da eficiência do material e métodos utilizados.

## 6. RESUMO

Buscou-se viabilizar o uso do fragmento  $\gamma$ ZM5, um dsDNA de  $\cong 900$ pb obtido a partir do mRNA de gama-zeína (27KD), como sonda marcada com biotina na caracterização de genótipos de milho que apresentavam distintos teores desta proteína. Para tanto avaliou-se a utilização de dois tipos de marcação, "Nick-translation" e Polimerização da fita sense do bacteriófago M13mp18 trazendo o  $\gamma$ ZM5 inserido; além de três tipos de nucleotídeos marcados: Biotina-7-dATP, Biotina-14-dATP e Biotina-11-dUTP. Tendo em vista a necessidade de utilização de um protocolo de isolamento e purificação de DNA genômico de milho que fosse simples, rápido, barato, e que produzisse DNA de alto peso molecular em quantidade e com alto grau de pureza, foram avaliados 5 protocolos de isolamento. Procedeu-se também à realização de "Southern-blot" com DNA de estirpes de *Rhizobium sp.* sendo utilizados como DNA alvo, e o fragmento de DNA PCQ15 (4Kb) marcado via "Nick-translation". Observou-se que a utilização de fragmentos com 4Kb ou mais, marcados com Biotina-14-dATP ou Biotina-11-dUTP via "Nick-translation", permitia, seguindo o material e métodos descrito, detectar cópias

únicas de fragmentos no DNA genómico dos materiais. Fragmentos, com 1Kb ou menos, só permitia detecção de cópia única quando inserido no bacteriófago M13 e marcado com Biotina-11-dUTP. A maior limitação do presente trabalho foi obter um protocolo de isolamento e purificação que viesse a satisfazer todas as características inicialmente desejadas.

## 7. SUMMARY

The possibility was investigated of using the  $\gamma$ ZM5 DNA fragment, a 900pb cDNA obtained from a gamma-zein mRNA (27KD), as a biotinylated probe in the characterization of corn genotypes. Two ways of marking were tried, "Nick-translation" and sense strand DNA M13mp18- $\gamma$ ZM5 bacteriophage polymerization, and three biotinylated nucleotides were studied (Biotin-7-dATP, Biotin-14-dATP and Biotin-11-dUTP). In an effort to find a fast, simple and inexpensive procedure to isolate and purify high molecular weight corn DNA, five different ones were studied. A "Southern-blot" was performed using *Rhizobium* sp. as target DNA and PCQ15 DNA fragment (4Kb) as a "Nick-translation" biotinylated probe. It was possible to detect single copies of genes when the probes used were biotinylated with Biotin-14-dATP and Biotin-11-dUTP by "Nick-translation", and 4Kb long or more. Probes with 1Kb long or less only detected single copies genes when inserted in M13 bacteriophage and marked with Biotin-11-dUTP. It was not possible to obtain a procedure to isolate and purify protocol with all the features desired.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica, Wageningen, 35(1):111-24, Mar. 1986.
- BLUGENE MANUAL - NONRADIATIVE NUCLEIC ACID DETECTION SYSTEM. Gaithersburg, Bethesda Research Laboratories Life Technologies. 1989. 36p. (Apostila).
- DAVIS, L. G.; DIBNER, M. D. & BATTEY, J. F. Basic Methods in Molecular Biology. New York, Elsevier Science Publishing Co., 1986. 388p.
- DOLL, H. Nutritional aspects of cereal proteins and approaches to overcome their deficiencies. Philosophical Transaction of the Royal Society, London, 304: 373-80, 1984.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. & HORTORIUM, L. H. B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Gaithersburg, 12(1): 13-5, Jan. 1990.

- DYKES, D.; FONDELL, J.; WATKINS, P. & POLESKY, H. The use of biotinylated DNA probes for detecting single copy human restriction fragment length polymorphisms separated by electrophoresis. Electrophoresis, Weinheim, 7: 278-82, 1986.
- ESEN, A. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. Plant Physiology, Washington, 80(3):623-7, Mar. 1986.
- ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). Journal of Cereal Science, London, 5: 117-28, 1987.
- ESEN, A.; BIETZ, J. A.; PAULIS, J. W. & WALL, J. S. Tandem repeats in the N-terminal sequence of a proline-rich protein from corn endosperm. Nature, Massachusetts, 296: 678-9, Apr. 1982.
- FORSTER, A. C.; McINNES, J. L.; SKINGLE, D. C. & SYMONS, R. H. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, Photobiotin. Nucleic Acids Research, Oxford, 13: 745-61, 1981.
- GERAGHTY, D.; PEIFER, M. A.; RUBENSTEIN, I. & MESSING, J. The primary structure of a plant storage protein: zein. Nucleic Acids Research, Oxford, 9: 5163-74, 1981.
- GRIERSON, D. & COVEY, S. Gene cloning, identification and sequencing. In: \_\_\_\_\_. Plant Molecular Biology. London, Blackie et Son Limited, 1984. p.1-18.
- HANSEL, L. W.; TSAI, C. Y. & NELSON, O.E. The effect of the *Floury-2* gene on the distribution of protein fractions and methionine in maize endosperm. Cereal Chemistry, Minnesota, 50: 383-94, 1973.



- HOISINGTON, D.; GARDINER, J. & GROGAN, R. RFLP PROCEDURES.  
University of Missouri, may 1988. 29p. (Apostila).
- HU, N. & MESSING, J. The making of strand-specific M13 probes.  
Gene, 17: 271-7, 1982.
- KAISER, K. & MURRAY, N. E. The use of phage lambda replacement  
vectors in the construction of representative genomic DNA  
libraries. In: GLOVER, D. M. DNA Cloning / A practical  
approach. Oxford, IRL Press, V.1, 1985. p.1-47.
- KODRZYCKI, R.; BOSTON, R. & LARKINS, B. A. The *Opaque-2* mutation  
of maize differentially reduces zein gene transcription. The  
Plant Cell, Rockville, 1: 105-14, 1989.
- LANGER-SAFER, P. R.; LEVINE, M. & WARD, D. C. Immunological  
method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes.  
Proceedings of the National Academy of Science of the United  
States of America, Washington, 79(7): 4381-5, July 1982.
- LANGER-SAFER, P.R.; WALDROP, A. A. & WARD, D. C. Enzymatic  
synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic  
acid affinity probes. Proceedings of the National Academy of  
Science of the United States of America, Washington, 78(11):  
6633-7, Nov. 1981.
- LARKINS, B. A. Modification of proteins encoded by seed storage  
protein genes. In: BRUENING, G.; HARADA, J.; KOSUGE, T. &  
HOLLAENDER, A. Tailoring Genes for Crop Improvement. An  
Agricultural Perspective. New York, Plenum Press, 1987.

- LEARY, J. J.; BRIGATTI, D. J. & WARD, D. C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. Proceedings of the National Academy of the United States of America. Washington, 80: 4045-9, July 1983.
- LOPES, M. A. Fractionation and characterization of storage proteins in hard-endosperm opaque-2 maize. West Lafayette, Purdue University, 1989. 115p. (Tese MS).
- LUDELIV. M. D.; TORRENT, M.; MARTINEZ-IZQUIERDO, J. A.; PUIGDOMENECH, P. & PALAU, J. Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays L.*) endosperm. Plant Molecular Biology, The Hague, 3: 227-34, 1984.
- M13-CLONING/ DIDEOXY SEQUENCING (INSTRUCTION MANUAL). Gaithersburg, Bethesda Research Laboratories Life Technologies, May 1988. 108p. (Apostila).
- MACEDO, A. M.; MEDEIROS, A. C. & PENA, S. D. J. A general method for efficient non-isotopic labeling of DNA probes cloned in M13 vectors: application to DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, Oxford, 17(11): 4414, 1989.
- MALCOLM, A. D. B. & FIGUEIREDO, H. Non-radioactive probes in Southern-blots. Biochemical Society Transactions, Dublin, 16: 139-40, 1988.
- MANIATIS. T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. Molecular Cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Molecular Cloning. A laboratory manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.1, p.1.1-1.110, 4.1-4.43.

- MANUELIDIS, L. *In situ* detection of DNA sequences using biotinylated probes. Focus, Gaithersburg, 7(4):4-8, Apr. 1985.
- MARKS, M. D.; JUDITH, S. L. & LARKINS, B. A. Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 260(30): 16451-9, Dec. 1985.
- MEDEIROS, A. G.; MACEDO, A. M. & PENA, S. D. J. A simple non-isotopic method for DNA fingerprinting with M13 phage. Nucleic Acids Research, Oxford, 16(21) 10394, 1988.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. M13 Bioprints: non-isotopic detection individual-specific human DNA fingerprintings with biotinylated M13 bacteriophage. 1989. (Comunicação pessoal).
- MERTZ, E. T.; BATES, L. S. & NELSON, O. E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science, Washington, 145(3629): 279-80, July 1964.
- MESSING, J. New M13 vector for cloning. In: Methods in Enzimology, New York, Academic Press, 1981. Vol. 101, p. 20-78.
- MISRA, P. S.; MERTZ, E. T.; GLOVER, D. V. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. Cereal Chemistry, Minnesota, 52: 734-9, 1975.
- MURPHY, J. J. & DALBY, A. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. Cereal Chemistry, Minnesota, 48: 336-49, 1971.
- OSBORNE, T. B. & MENDEL, L. B. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. The Journal of Biology Chemistry, Baltimore, 18: 1-16, 1914.

- PAIVA, E. Fragmentos polimorficos do DNA no melhoramento do milho. 1988. (Comunicação pessoal)
- \_\_\_\_\_, KRIZ, A. L.; PEIXOTO, M. J. V. D.; WALLACE, J. G. & LARKINS, B. A. Quantitation and distribution of gamma-zein in the endosperm of maize kernels. 1990. (Comunicação pessoal).
- PARK, W. D.; LEWIS, E. D. & RUBENSTEIN, I. Heterogeneity of zein mRNA and protein in maize. Plant Physiology, Washington, 65(1):98-106, Jan. 1980.
- PEDERSEN, K.; DEVEREUX, J.; WILSON, D.R.; SHELDON, E. & LARKINS, B. A. Cloning and sequence analysis reveals structural variation among related zein genes in maize. Cell, Cambridge, 29: 1015-26, 1982.
- PRAT, S.; CORTADAS, J.; PUIDOMENECH, P. & PAULAU, J. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of the maize endosperm protein glutelin-2. Nucleic Acids Research, Oxford, 13:1493-504, 1985.
- QUALITY-PROTEIN MAIZE. Report of an Ad Hoc panel of the advisory committee on technology innovation. Board on science and technology for development. National Research Council. Washington, National Academic Press, 1988. 100p.
- SAGHAI-MARROF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A. & ALLARD, R. W. Ribosomal DNA Spacer-length Polymorphisms in Barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America, Washington, 81: 8014-8018, 1984.
- SCHEIF, R. F. & WENSINK, P. G. Working with nucleic acids. In: \_\_\_\_\_ Practical Methods in Molecular Biology. New York, Springer-Verlag, 1981. p.89-127.

- SEYFERT, HANS-MARTIN. The use of biotinylated gene probes for mRNA titration. Focus, Gaithersburg, 7(4): 3-4, 1985.
- SHELDON, E. L.; KELLOGG, D. E.; WATSON, R.; LEVENSON, C. H. & ERLICH, H. A. Use of non-isotopic M13 probes for genetic analysis: application to HLA class II loci. Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America. Washington, 83(12): 9085-9, Dec. 1986.
- SHEWRY, P. R.; MIFLIN, B. J.; FORDE, B. G. & BRIGHT, S. W. J. Conventional and novel approaches to the improvement of the nutritional quality of cereal and legume seeds. Science Progress. Oxford, 67: 575-600, 1981.
- SHOTWELL, M. A. & LARKINS, B. A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In: \_\_\_\_\_. The Biochemistry of Plants, A Comprehensive treatise. New York, Academic Press, 1989. v.15, p.297-345.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, London, 98: 503-17, 1975.
- TAKAHASHI, T.; MITSUDA, T. & OKUDA, K. An alternative non-radioactive method for labeling DNA using biotin. Analytical Biochemistry, New York, 179: 77-85, 1989.
- TSAI, C. Y. Early termination of zein accumulation in opaque-2 maize mutant. Maydica, Bergamo, 24: 129-40, 1979.
- \_\_\_\_\_. Genetics of storage protein in maize. Plant Breeding Reviews, 1: 103-38, 1983.
- UMC RFLP PROCEDURES MANUAL. Maize RFLP Laboratory, University of Missouri, Julho 1989. 41p. (Apostila).

- UPDYKE, T. V. & NICOLSON, G. L. Membrane antigen isolation using biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin agarose. Focus, Gaithersburg, 7(3): 1-3, 1985.
- VASAL, S. K. Approaches and methodology in the development of QPM hybrids. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 15, Maceió, 1984.
- VASAL, S. K.; VILLEGAS, E. & TANG, C. Y. Recent advances in the development of quality modified maize germplasm at CIMMYT. In: \_\_\_\_\_ The Research Coordination Meeting on the use of nuclear techniques for cereal grain protein improvement, Viena, Dec. 1982.
- WALLACE, J. C.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. & LARKINS, B. A. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified opaque-2 maize. Plant Physiology, Washington, 92(1):191-6, Jan. 1990.
- WANG, S. Z. & ESEN, A. Primary structure of a proline-rich zein and its cDNA. Plant Physiology, Washington, 81(1):70-4, May. 1986.
- WHITE, R. & LALOUEL, J. M. Chromosome mapping with DNA markers. Scientific American, New York, 258(2):20-8, Feb. 1988.
- WHITEHEAD, T. P.; THORPE, G. H. G.; CARTER, T. J. N.; GROUCUTT, C. & KRICKA, L. J. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. Nature, Massachusetts, 305(5930):158-9, Sept. 1983.

WILSON, D. R. & LARKINS, B. A. Zein gene organization in maize and related grasses. Journal of Molecular Evolution, New York, 20: 330-40, 1984.

WOLF, M. J.; KHOO, U. & SECKINGER, H. L. Subcellular Structure of endosperm protein high-lysine and normal corn. Science, Washington, 157(3788): 556-7, May 1967.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. Cereal Chemistry, Minnesota, 46(3):253-63, May 1969.