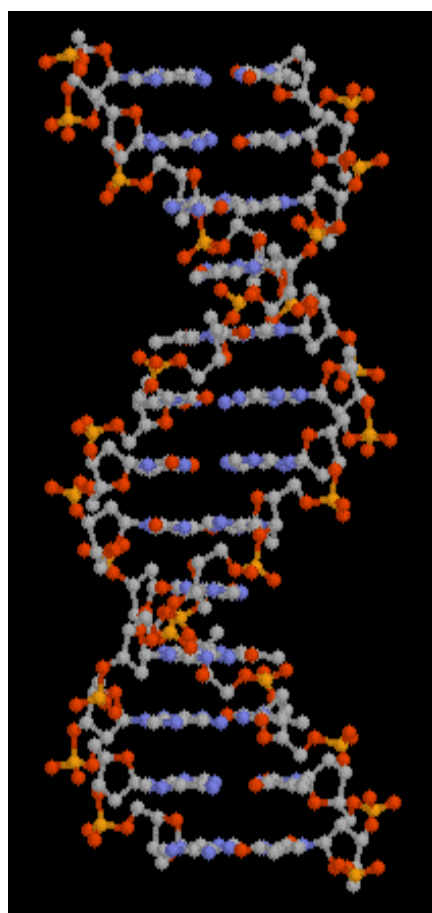


Documentos

ISSN 0101-6245
Dezembro, 2006

116

TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR



Embrapa



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 0101-6245
Dezembro, 2006*

Documentos 116

TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Rejane Schaefer

*Concórdia, SC
2006*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Caixa Postal 21
89.700-000, Concórdia, SC
Telefone: (049) 34410400
Fax: (049) 34428559
<http://www.cnpsa.embrapa.br>
sac@cnpsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade:

Presidente: *Claudio Bellaver*

Membros: *Teresinha Marisa Bertol*
Cícero J. Monticelli
Gerson N. Scheuermann
Airton Kunz
Valéria M. N. Abreu

Suplente: *Arlei Coldebella*

Revisão técnica: *Cícero J. Monticelli, Cátia S. Klein, Janice R.C. Zanella e Paulo Esteves*

Coordenação editorial: *Tânia Maria Biavatti Celant*

Normalização bibliográfica: *Irene Z.P. Camera*

Editoração eletrônica: *Vivian Fracasso*

Foto da capa: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/>

Tiragem: 100 unidades

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n.º 9.610).

Schaefer, Rejane

Técnicas em biologia molecular / Rejane Schaefer.-
Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006.

24p.; 29cm. -(Documentos / Embrapa Suínos e Aves,
ISSN 0101-6245; 116)

1. Biologia molecular – técnicas - manual. I. Título. II
Série.

CDD 574.87

© Embrapa 2006

Autor

Rejane Schaefer
Médica Veterinária, D.Sc.
Pesquisadora A
rejane@cnpsa.embrapa.br

Sumário

1. Cuidados na manipulação de ácidos nucléicos.....	07
2. Extração de ácidos nucleicos.....	09
3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	10
4. Separação de fragmentos de DNA através de eletroforese em gel de agarose.....	15
5. Purificação de fragmentos de DNA do gel de agarose.....	16
6. Enzimas de restrição.....	16
7. Clonagem de fragmentos de DNA em vetores plasmideais / ligação de fragmentos de DNA.....	17
8. Introdução de DNA em células e microorganismos.....	20
9. Fórmulas reagentes.....	21
10. Referências bibliográficas.....	23

Técnicas em Biologia Molecular

Rejane Schaefer

“A Biologia Molecular é o estudo da Biologia em nível molecular, com especial foco no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos de expressão, as proteínas. Mais concretamente, a Biologia Molecular investiga as interações entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre DNA, RNA e síntese proteica. É um campo de estudo amplo, que abrange outras áreas da Biologia e da Química, em especial, Genética e Bioquímica. Muito do trabalho feito no âmbito da Biologia Molecular relaciona-se com a obtenção, identificação e caracterização de genes. No estudo da Microbiologia, diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas para o isolamento e caracterização de organismos patogênicos (ou de seus genes), como vírus e bactérias. Neste documento serão abordadas os cuidados necessários e as técnicas básicas para a obtenção de RNA e DNA a partir de microorganismos. Outras técnicas abordadas são a reação em cadeia da polimerase (PCR), a eletroforese em gel de agarose, a clonagem de fragmentos de DNA em vetores plasmidiais, a extração de DNA plasmidial, a transformação bacteriana e a introdução de DNA em células e microorganismos”.

1 Cuidados na manipulação de ácidos nucleicos

Na manipulação de ácidos nucleicos extraídos de microorganismos, seja para a identificação e/ou isolamento ou para a caracterização molecular de agentes patogênicos, devem ser observados cuidados comparáveis aos atribuídos na manipulação de microorganismos infecciosos. A única diferença é que na manipulação do DNA e RNA o risco existente é a contaminação da amostra e não do operador. Para evitar a contaminação da amostra que está sendo trabalhada devem ser observados cuidados quanto ao local de manipulação dos ácidos nucleicos, na preparação dos reagentes utilizados e na manipulação da amostra propriamente dita. A seguir, são abordadas quais as precauções que deve-se ter ao manipular amostras de DNA e/ou RNA e as técnicas básicas de extração de ácidos nucleicos de microorganismos e isolamento e análise de DNA e RNA.

1.1 Trabalhando com o DNA

Para o isolamento de DNA plasmidial ou genômico de microorganismos a partir de células ou tecidos, sempre usar amostras frescas ou amostras que tenham sido congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C . Este procedimento minimiza a degradação do DNA por limitar a atividade de nucleases endógenas.

1.2 Armazenamento do DNA

- As deoxiribonucleases (DNases) necessitam de íons metal para a sua atividade, podendo ser facilmente inativadas por agentes quelantes, como o ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA), ou pelo calor (10 minutos a 65°C).

- Para armazenar o DNA a melhor escolha seria, portanto, diluí-lo em Tris-EDTA (TE). Mas o DNA também pode ser armazenado em soluções de etanol a 0°C ou a -20°C.

1.3 Trabalhando com RNA

O trabalho com RNA exige mais cuidados do que o trabalho com DNA tendo em vista a instabilidade química do RNA e a existência de RNases. Diferente das DNases, as RNases não necessitam de íons metal como co-fatores e são ativas mesmo após fervura prolongada ou autoclavagem.

a) *As principais fontes de contaminação com RNases no laboratório são:*

- Tampões e soluções: a autoclavagem das soluções utilizadas em trabalhos com RNA não inativa as RNases.
- Mãos sem luvas.
- Contaminação pelo ar.

b) *Precauções ao manipular RNA:*

- *Sempre usar luvas ao trabalhar com RNA:* após a colocação das luvas, não tocar em superfícies e equipamentos para evitar a reintrodução de RNases no material. Utilizar uma sala no laboratório somente para manipular RNA, com micropipetadores somente para trabalho com RNA. Os demais materiais (ponteiras, microtubos) devem ser livres de DNases e RNases.
- *Bancadas:* limpar com etanol 100%.
- *Instrumentos de metal:* flambar em fogo antes do uso.
- *Vidraria:* aquecer em forno a 180°C durante várias horas ou lavar com uma solução contendo dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% em água destilada durante 1 hora. Secar e autoclavar todo o material (necessário para destruir resíduos de DEPC os quais podem reagir com outras proteínas ou com as adeninas do RNA). Como o DEPC pode atacar os tubos de policarbonato (tubos de centrífuga) e microplacas de poliestireno, a descontaminação desses materiais pode ser feita com peróxido de hidrogênio a 3% (deixar de molho por 10 minutos). Resíduos de peróxido de hidrogênio são removidos pela lavagem dos materiais em água livre de RNases. Alternativamente, os materiais podem ser deixados de molho em NaOH 1N por uma hora a 37°C. Após, os materiais devem ser lavados com água livre de RNases.

c) *Descontaminação de tampões e soluções:*

- *Soluções:* usar 1 mL DEPC para cada 1L de solução. Agitar em agitador magnético durante 1 hora e autoclavar durante 1 hora (para hidrolizar DEPC remanescente em CO₂ e etanol).
- *Soluções contendo hidroximetil aminometano (Tris; P.M: 121,14):* não podem ser eficientemente tratadas com DEPC já que o Tris inativa o DEPC. A sacarose não pode ser tratada com DEPC já que o processo de autoclavagem carameliza a sacarose. O acetato de amônio é relativamente volátil, portanto não deve ser autoclavado. Para reagentes desta categoria, é recomendado prepará-los em água livre de ribonuclease. Remover os reagentes de seus frascos originais e

colocá-los em recipiente de plástico livre de ribonucleases. Evitar usar espátulas ou barras magnéticas a menos que tenham sido aquecidos a 250°C por, no mínimo, 4 horas para destruir as ribonucleases. Autoclavar as soluções por, no mínimo, 30 minutos.

- *Soluções de materiais termolábeis (DTT, nucleotídeos, sais de manganês):* devem ser preparados dissolvendo os sólidos em água tratada com DEPC e autoclavada, passando a solução em filtros 0,22 µm para esterilizar.
- Como alternativa ao DEPC, o qual pode inibir reações enzimáticas e modificar tanto o RNA como o Tris se não estiver completamente hidrolizado, é recomendado o uso de água livre de RNases.
- Extrair o RNA rapidamente após a obtenção das amostras. Usar sempre amostras frescas ou que tenham sido congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Este procedimento minimiza a degradação do RNA por limitar a atividade de RNases endógenas.

2 Extração de ácidos nucleicos

2.1 Extração de DNA

a) Preparo das amostras de vírus para a extração de DNA

O primeiro passo para a obtenção do DNA viral é realizar a purificação ou extração do DNA a partir de tecidos de animais ou cultivos celulares infectados por vírus de interesse. Este material é submetido a maceração (homogenização ou proteólise) para liberação das partículas virais, seguido de extração com fenol. Após a extração com o fenol, duas fases são formadas, uma fase aquosa e uma fase orgânica. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) ficam separados na fase aquosa superior e podem ser precipitados pela adição de etanol à solução. RNases, enzimas que quebram o RNA, são rotineiramente utilizadas para impedir a presença de RNA na amostra final, quando se busca trabalhar com amostras de DNA. O DNA obtido pode ser submetido a outros processos de purificação e pode ser utilizado em várias técnicas de biologia molecular, de acordo com o objetivo proposto. Como exemplo, o DNA pode ser utilizado como molde para reações de amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), em clonagens (DNA recombinante), ou ainda em reações de seqüenciamento.

2.2 Extração de RNA

Na extração do RNA é importante evitar a contaminação da amostra com RNases. Um produto muito eficiente utilizado na extração de RNA é o fenol-guanidina (Trizol[®]). Após realizar o isolamento do RNA, deve-se proceder a síntese do DNA complementar (cDNA) a qual é realizada com o uso da enzima Transcriptase Reversa (RT).

2.3 Precipitação de ácidos nucleicos (DNA) com álcool etílico

- Para a precipitação de DNA, adicionar NaCl (conc. estoque 5 M) a uma concentração final de 0,3 M.

- Para a precipitação de DNAs pequenos (menos de 100 pares de bases) ou em pequena concentração (0,1 µg/ mL), aumentar o período de precipitação por, pelo menos, uma hora e adicionar cloreto de magnésio (MgCl₂) a uma concentração final de 0,01 M.
- Os DNAs podem ser armazenados indefinidamente em soluções etanólicas a 0°C ou a -20°C.

3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se duas sequências de nucleotídeos iniciadoras (ou *primers*) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Três eventos distintos ocorrem durante um ciclo de PCR: (1) o DNA é desnaturado, (2) os *primers* ou iniciadores hibridizam com as fitas do DNA e (3) a síntese do DNA complementar à fita-molde de DNA é realizada pela polimerase termoestável com a incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs).

1. A desnaturação do DNA ocorre quando a reação é aquecida a 92-96°C. Para sequências de DNA que possuem uma porcentagem alta de G+C, é recomendada a adição de glicerol, aumento da temperatura e tempo de desnaturação do DNA, e também uso de análogos de nucleotídeos para melhorar o produto da PCR.
2. Após a desnaturação do DNA, os *primers* oligonucleotídeos hibridizam com a sequência-alvo da fita simples de DNA. A temperatura desta etapa varia de 37 a 65°C, dependendo da homologia dos *primers* com a sequência-alvo, assim como também da composição de bases dos oligonucleotídeos.
3. A última etapa é a extensão do *primer* oligonucleotídeo pela polimerase termoestável. Tradicionalmente, esta etapa é realizada a 72°C. O tempo necessário para copiar a fita-molde depende do tamanho do produto de PCR.

A repetição dessas 3 etapas, por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um segmento de DNA de fita dupla cujo término é definido pela terminação 5' do *primer* oligonucleotídeo e cujo comprimento é definido pela distância entre os *primers*. Como os produtos de 1 ciclo de amplificação servem como molde para o próximo, cada ciclo sucessivo aumenta exponencialmente a quantidade do produto do DNA desejado.

3.1 RT-PCR

A técnica de RT-PCR é utilizada para a amplificação de um fragmento definido de uma molécula de RNA. Em um primeiro momento, é realizada a síntese de uma molécula de DNA complementar à amostra de RNA. Isto é feito adicionando à reação o RNA-molde, uma solução de dNTPs e a enzima DNA polimerase RNA-dependente. O processo é conhecido como transcrição reversa e a enzima DNA polimerase RNA-dependente é chamada de enzima transcriptase reversa. Os componentes citados acima são combinados com um primer de DNA e o tempão da enzima e incubados por 1 hora em temperatura superior a 37°C (usualmente a 42°C; depende da enzima utilizada na reação). Após o término da reação de transcrição

reversa e produção de DNA complementar ao RNA fita-simples original, é iniciada a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2 *Nested e Semi- Nested PCR*

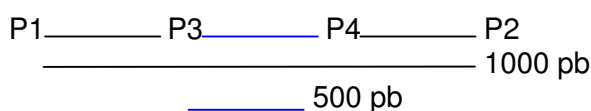
a) *Nested PCR*

Nested e semi-nested PCRs são utilizados para reduzir ou eliminar produtos da PCR não desejados, e por apresentar uma maior sensibilidade. De uma maneira geral, é realizada uma reação com um par de *primers* que amplifica uma região de interesse. Produtos espúrios podem aparecer com um ou com os dois *primers* e contém sequências internas irrelevantes. Uma alíquota deste produto (primeiro ciclo de amplificação) é submetido a um segundo ciclo de amplificação utilizando um par de *primers* complementar à sequência interna amplificada pelo primeiro par de *primers*.

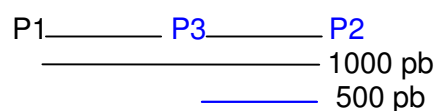
Exemplo esquemático:

Primers externos: P1 e P2; amplificação de um fragmento com 1000 pb

Primers internos: P3 e P4; amplificação de um fragmento com 500 pb



Nested PCR



Semi-Nested PCR

No segundo ciclo de amplificação somente o produto de interesse deve ser amplificado.

b) *Semi-Nested PCR*

É quando um segundo *primer* é utilizado. Este é interno somente a uma extremidade da sequência-alvo.

Caso sejam empregados os métodos de *Nested* ou *semi-nested* PCR é recomendado que o primeiro e o segundo ciclo de amplificação sejam terminados por volta de 20 ciclos (ao invés dos habituais 30-35 ciclos). Esta modificação diminui a chance de gerar fragmentos de alto peso molecular não desejados ou de rastros (DNA degradado).

3.3 Otimização da reação de PCR

A otimização da reação deve levar em conta os parâmetros que contribuem para a fidelidade *primer*-DNA molde. São estes:

- a concentração do íon Magnésio, na otimização da reação variar a concentração do íon Mg^{2+} de 0,5 a 5 mM, com incrementos de 0,5 mM.
- a quantidade da enzima *Taq* DNA polimerase;
- a concentração dos *primers*;
- as condições de ciclagem da reação (principalmente a temperatura de anelamento dos *primers*).

Calcular a T_m dos *primers*. Em geral, iniciar a reação com a temperatura de anelamento dos *primers* cerca de 5°C abaixo da T_m calculada: $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$.

a) *Estratégia de otimização da reação*

- Sempre desenhar *primers* que tenham a T_m semelhante.
- Na otimização da reação incluir controles negativos e positivos apropriados. Adicionar à reação 10^4 a 10^5 cópias do DNA-molde.

Caso após a realização da PCR for detectado pouco produto ou nenhum produto:

- Reamplificar diluições com base 10 do produto da PCR inicial (1:10 a 1:1000) utilizando a mesma temperatura de anelamento por 30 ciclos.
- Usar sempre o mesmo controle positivo na reação, o qual já foi demonstrado ser amplificado em reações anteriores (este DNA é o controle para a presença de inibidores na reação).
- Utilizar uma etapa inicial de desnaturação da fita-molde antes da ciclagem (usualmente 95°C durante 5 minutos).

PCR "Hot Start": neste caso, a *Taq* DNA polimerase só é adicionada à mistura quando a temperatura inicial do ciclo de desnaturação for maior que 80°C.

Uma variação desta técnica envolve a adição à reação de um anticorpo específico anti-*Taq* DNA polimerase antes da adição da *Taq* DNA polimerase. Este anticorpo impede o início da atividade da polimerase até que a temperatura da reação aumente, dissociando e desnaturando o anticorpo bloqueador.

- Variar a concentração dos componentes da solução tampão (pH, *Taq* DNA polimerase, dNTPs, *primers*).
- Adicionar *enhancers* à reação, como por exemplo: dimetilsulfóxido (DMSO; 1-10%), polietilenoglicol (PEG-6000; 5-15%), glicerol (5-20%), formamida (1,25-10%) e albumina sérica bovina (10-100 µg/mL).
- Reamplificar diluições (1:10 a 1:1000) da primeira reação utilizando *nested primers*.
- Utilizar um novo par de *primers*.
- Importante: na otimização da reação de PCR deve-se modificar uma variável de cada vez.
- Caso após a realização da PCR for detectado fragmentos múltiplos (ou bandas espúrias):
 - Aumentar a temperatura de anelamento.
 - Reduzir o número de ciclos da reação.
 - Variar a concentração dos componentes da solução tampão (pH, *Taq* DNA polimerase, dNTPs, *primers*).
- Purificar o fragmento de interesse após eletroforese em gel de agarose e reamplificar o produto.
- Reamplificar diluições (10^4 e 10^5) da primeira reação utilizando *nested primers*.
- Se nada funcionar, desenhar um novo par de *primers*.
- Importante: deve-se modificar uma variável de cada vez na reação de PCR.

3.4 Dicas para evitar contaminações nas reações de amplificação de DNA

As amplificações de DNA devem ser realizadas em ambientes limpos, livres de DNA. Isto garante que o único DNA presente na reação seja o adicionado pelo técnico. Os cuidados que devem ser observados são comparáveis às boas práticas laboratoriais na manipulação de patógenos. A única diferença é que, no caso da PCR, o risco é a contaminação da reação com DNA exógeno.

a) *DNAs contaminantes na PCR podem ter como origem:*

- DNAs originários de outras amostras.
- DNAs originários de outros experimentos como, por exemplo, clones recombinantes, DNA plasmideal ou fragmentos de restrição purificados.
- DNAs originários de amplificações prévias da mesma sequência-alvo. Este tipo de contaminação costuma ser a mais problemática devido a abundância de DNA gerado após a reação de PCR e facilidade com que este DNA pode ser reamplificado.

b) *Outras fontes de contaminação no laboratório*

- Bancadas de laboratório, equipamentos e pipetadores contaminados com preparações prévias de DNA.
- Termociclador.

3.5 Cuidados a serem observados no laboratório

Utilizar locais ou salas separadas no laboratório para:

a) *Preparação da reação de PCR (pré-PCR)*

1. É extremamente importante existir no laboratório uma área para a manipulação dos reagentes da PCR. Esta área deve ser mantida limpa e livre de qualquer fonte de contaminação. Esta sala de preparação do *premix* (pré-mistura) deve conter uma capela com lâmpada ultravioleta (UV) para degradar qualquer DNA contaminante. O operador deve usar sempre avental, luvas e pró-pés durante o trabalho. As luvas devem ser trocadas freqüentemente, particularmente entre cada etapa do processo de purificação da amostra.
2. Os aventais não devem ser retirados da área de pré-PCR. Deve ser observado o fluxo de pessoal dentro do laboratório (o fluxo de pessoal no laboratório deve ser sempre da área limpa em direção à área suja).
3. Usar somente material estéril, livre de DNases e RNases. Vidraria lavada e autoclavada de uso comum em laboratórios pode ser fonte de ácidos nucleicos contaminantes.
4. Todas as soluções utilizadas devem estar livres de ácidos nucleicos e/ou nucleases contaminantes (DNases e RNases).
5. Na preparação das soluções sempre utilizar água coletada recentemente, de alta qualidade (destilada/ deionizada, filtrada com filtro 0,22 µm e autoclavada). Preparar alíquotas pequenas, utilizando-as a cada nova reação realizada.
6. *Aliquotar os demais reagentes:* todos os reagentes utilizados na reação de PCR devem ser mantidos em sala separada, livre de produtos amplificados por PCR. É

recomendável marcar o lote dos reagentes utilizados para possível descarte em caso de contaminação.

7. *Preparo do premix da reação:* todos os reagentes da PCR podem ser colocados em um mesmo microtubo. Este procedimento dá consistência à reação e reduz a chance de erros na pipetagem dos reagentes.
8. *Escolha dos controles positivo e negativo:* a utilização de controles positivo e negativo é muito importante para testar a eficiência da reação e ausência de contaminantes que podem inibir a PCR. É importante não usar um controle positivo altamente concentrado (por exemplo, solução de DNA plasmideal contendo a sequência-alvo). Neste caso, diluir o controle positivo. Dependendo do sistema de detecção, 100 cópias da sequência-alvo são suficientes para serem utilizados como controle positivo da reação. Este cuidado reduz problemas de contaminação das amostras com o controle positivo.

b) Preparação da amostra de DNA

As amostras de DNA devem ser manipuladas em sala específica para este fim, onde serão realizadas as extrações de RNA ou DNA a partir de amostras de tecidos, cultura de células ou amostras de soro.

Os seguintes cuidados devem ser observados:

1. Produtos de PCR ou clones de DNA contendo a sequência a ser amplificada não devem ser manipulados nesta sala.
2. Os pipetadores ou outros instrumentos utilizados no processamento das amostras não devem ser utilizados para outros fins, como por exemplo, clonagem molecular ou manipulação de sequências-alvo de DNA.
3. Usar sempre na manipulação das amostras de DNA ponteiras com filtros. Isto impede a contaminação via aerossóis criados pela pipetagem da amostra.
4. Adicionar o DNA da amostra por último: após a adição do DNA fechar o microtubo antes da adição de outra amostra.
5. Alguns microtubos apresentam tampas difíceis de abrir. Neste caso, líquidos próximos a tampa podem ser projetados para fora. Trocar de luva se isto ocorrer. Antes de abrir o microtubo, centrifugá-lo rapidamente para retirar líquidos da abertura e dos lados do mesmo. Também pode-se usar pedaços de parafilme (1 cm²) para proteger a luva durante a abertura do microtubo.

c) Análise do produto da PCR (Área pós-PCR)

Após a realização da PCR, as amostras precisam ser analisadas e interpretadas. Isto deve ser feito em área específica para manipulação de amostras pós-reação, com equipamentos e reagentes destinados exclusivamente para este fim.

Importante: a principal fonte de contaminação em laboratórios que utilizam a PCR é o DNA obtido como produto de ampliações prévias. Isto ocorre a partir de microaerossóis gerados durante a pipetagem e manipulação de amostras de PCR (importante observar o fluxo de pessoal no laboratório, sempre da área "limpa" em direção a área "suja", e não o contrário!).

3.6 Irradiação ultravioleta de superfícies para reduzir a contaminação na PCR

Limitações:

1. A superfície a ser irradiada deve ser perpendicular à fonte de luz UV.
2. Superfícies irregulares diluem a intensidade da luz.
3. Objetos tri-dimensionais, como por exemplo, pipetadores não podem ser adequadamente descontaminados pela luz UV porque somente uma fração da superfície do pipetador entra em contato com a fonte de luz.
4. DNAs muito pequenos (menores que 300 pares de base) podem ser resistentes a degradação pela luz UV.

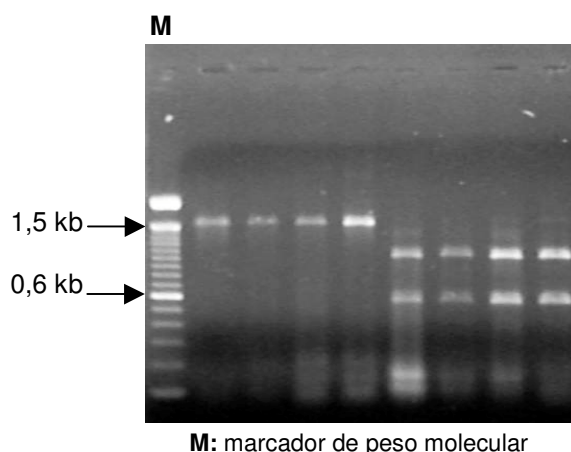
3.7 Presença de inibidores na amostra de DNA

Vários inibidores da reação de PCR já foram identificados. Estes incluem detergentes iônicos (SDS e Sarcosil), fenol, heparina, xilenocianol e azul de bromofenol.

Em casos de contaminação da amostra pode ser feita uma nova extração do DNA e/ou precipitação do DNA com etanol. A contaminação de amostras com proteinase K pode ter como efeito a digestão da *Taq* DNA polimerase. Neste caso, desnaturar a enzima a 95°C durante 5 minutos.

4 Separação de fragmentos de DNA através de eletroforese em gel de agarose

Fragmentos de DNA e RNA podem ser separados de acordo com o seu tamanho através da eletroforese em gel de agarose. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica que pode ser utilizada para separar fragmentos de tamanhos diferentes quando colocados em um gel horizontal na presença de um campo elétrico. A agarose possui poros por onde as moléculas de DNA migram quando é adicionada uma corrente elétrica. A taxa de migração das moléculas é afetada pelo tamanho e forma das moléculas, densidade do gel e força da corrente elétrica. As moléculas maiores de DNA migram mais vagarosamente do que as moléculas menores. Quando o DNA é clivado com enzimas de restrição, fragmentos de diferentes tamanhos migram em diferentes padrões. O gel resultante apresenta um aspecto de "degraus de escada", visualizados após o gel ser corado com brometo de etídio, um corante que tem a propriedade de intercalar-se entre as fitas do DNA, emitindo radiação que pode ser identificada quando o gel é exposto a luz ultravioleta. Em um dos poços do gel, onde as amostras a serem avaliadas por eletroforese são colocadas, é adicionado um marcador de peso molecular contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido. Este tem como objetivo estimar o tamanho dos fragmentos gerados após a corrida. O tamanho de cada fragmento é medido em pares de bases (pb).



5 Purificação de fragmentos de DNA do gel de agarose

Para extrair fragmentos de DNA de géis de agarose, pode ser realizada uma extração com fenol, após a remoção da banda de interesse do gel, como segue:

- Recortar a banda do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril (minimizar a retirada de gel).
- Derreter o gel de agarose a 65°C, completando o volume com até 200 µl de TE.
- Adicionar 8 µl NaCl / 5 M (concentração final de 0,2 M).
- Adicionar 200 µl de fenol (v/v).
- Misturar a solução em *vortex* e centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos, em temperatura ambiente.
- Coletar o sobrenadante aquoso e adicionar 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Incubar a solução -20°C durante 30 minutos. Caso tenha ficado um volume muito grande de gel no início da extração, deixar o DNA precipitando durante um tempo maior (*overnight* ou 16 h).
- Coletar o DNA por centrifugação a 14.000 rpm durante 30-45 minutos a 4°C.

6 Enzimas de restrição

6.1 O que são enzimas de restrição?

Na década de 60, pesquisadores descobriram que as bactérias possuem enzimas que "cortam" ou "digerem" DNA de organismos estranhos ou externos, protegendo desta forma as células bacterianas de invasores, como por exemplo, os vírus. Estas enzimas, conhecidas como enzimas de restrição ou endonucleases de restrição, foram isoladas e purificadas para uso em pesquisas. Cada enzima é capaz de reconhecer e "cortar" uma seqüência específica de DNA de fita dupla, conhecida como "seqüência de reconhecimento" ou "sítio de restrição".

6.2 Uso de enzimas de restrição na caracterização de amostras de vírus

As enzimas de restrição podem ser utilizadas na caracterização de amostras de vírus onde, após a clivagem do DNA com estas enzimas, fragmentos de tamanhos

diferentes são gerados. Isto ocorre devido a diferenças na seqüência do DNA entre amostras resultando em diferentes padrões de comprimento do fragmento de restrição. Esta técnica também é conhecida como polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP).

6.3 Fatores que afetam a digestão enzimática

- a) *Metilação do DNA*: DNA metiltransferases são encontradas em procariotos e eucariotos. Sua função é proteger o DNA do hospedeiro da clivagem pela endonuclease de restrição correspondente (as bactérias possuem enzimas que metilam o seu DNA, ou seja, adicionam o grupo metil ao DNA sintetizado, com isto protegendo o seu próprio DNA da ação das endonucleases de restrição).
- b) *Outros fatores que impedem a clivagem do DNA*: inibidores da atividade das enzimas de restrição, como por exemplo, o excesso de sal na reação. O excesso de glicerol na reação também impede a clivagem do DNA. A quantidade de enzima adicionada em uma reação não deve ultrapassar 10% do volume total da reação de digestão. Por exemplo, em um volume de 100 µl, usar no máximo 10 µl da enzima, o que já representa um excesso, uma vez que a maioria das enzimas apresenta uma concentração de 10 U por µl e 1 U cliva 1 µg de DNA.

7 Clonagem de fragmentos de DNA em vetores plasmídeos / ligação de fragmentos de DNA

7.1 Plasmídeos

Os plasmídeos estão presentes em bactérias e, em algumas vezes, em organismos eucariotos como, por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*. São, tipicamente moléculas de DNA circulares de fita dupla separados do DNA cromossômico. Cada plasmídeo contém uma seqüência de DNA que serve como origem de replicação ou ori (ponto de início da replicação) que torna a duplicação do plasmídeo independente da replicação do DNA cromossômico. Seu tamanho varia de 1 a 400 kbp. Os plasmídeos estão presentes em 1 cópia (grandes plasmídeos) até centenas de cópias do mesmo plasmídeo em uma única célula bacteriana.

7.2 Resistência a antibióticos

Os plasmídeos freqüentemente contém genes que conferem uma vantagem seletiva à bactéria que o alberga, como a habilidade de tornar a bactéria resistente a um determinado antibiótico (ATB). Esta vantagem conferida a bactéria faz com que a mesma mantenha o plasmídeo.

7.3 Transformação bacteriana

Os plasmídeos servem como importantes ferramentas em laboratórios de genética e bioquímica, onde são comumente utilizados para multiplicar (fazer cópias) ou expressar um dado gene. Existem muitos plasmídeos comercialmente disponíveis. Inicialmente, o gene a ser replicado é inserido no plasmídeo. Este contém, além do gene inserido, um ou mais genes capazes de fornecer resistência frente a antibióticos à bactéria que o alberga. O plasmídeo é então inserido na bactéria por

um processo conhecido como transformação bacteriana. Existem dois métodos principais de transformação bacteriana:

- *Método químico*: Incubação com altas concentrações de íon Ca^{+2} , o que leva a membrana plasmática bacteriana a admitir o DNA plasmídeo.
- *Eletroporação*: A eletroporação consiste na indução de poros reversíveis em membranas celulares, resultando em fluxo de íons e moléculas através da membrana deformada. A eletroporação permite uma alta eficiência de transformação. A maioria dos aparelhos de eletroporação, os eletroporadores, utiliza descarga de capacitores para produzir pulsos de alta voltagem. A intensidade do pulso é determinada pela voltagem aplicada e condutividade do meio. Quando não se conhecem os parâmetros para a eletroporação de uma espécie ou tecido, é sempre necessário otimizar: a intensidade da voltagem e a capacitância, a duração do pulso, a condutividade do meio, a concentração da bactéria e a quantidade de DNA (plasmídeo e carreador), entre outros. O grau de permeabilidade da membrana dependerá do campo elétrico aplicado e do tipo celular. Altos níveis de permeabilização facilitam a entrada de DNA, entretanto, diminuem a viabilidade da célula. Portanto, é necessário estabelecer uma curva de viabilidade da célula em relação aos parâmetros aplicados. As condições para a máxima eletroporação diferem entre diferentes espécies e mesmo entre cepas.

Importante: Antes de proceder a transformação bacteriana, as bactérias devem ser tornadas competentes para ambos os métodos, isto é, capazes de absorver DNA. Devem ser desenvolvidas até uma determinada densidade, colhidas e lavadas com sais. As células competentes devem ser divididas em alíquotas e congeladas na presença de um criopreservante. Existem pequenas variações entre os métodos para produzir bactérias quimicamente competentes *versus* bactérias competentes por eletroporação.

Após a transformação, bactérias contendo o plasmídeo inserido são selecionadas pelo crescimento em cultura contendo um antibiótico específico. Bactérias que albergam uma ou mais cópias de um plasmídeo expressam o gene que confere resistência a um ATB. Como resultado, somente a bactéria resistente ao ATB sobrevive. O ATB matará qualquer bactéria que não recebeu o plasmídeo, porque elas não expressarão o gene de resistência ao ATB. Desta forma, o ATB age como um filtro, selecionando somente as bactérias modificadas. Assim, as bactérias modificadas podem crescer em grandes quantidades, serem coletadas e lisadas para o isolamento do plasmídeo de interesse.

- Os plasmídeos também podem ser utilizados para a produção de grandes quantidades de proteínas. Neste caso, a bactéria contendo o plasmídeo de interesse é cultivada em grandes volumes, induzindo também a produção de grandes quantidades de proteínas do gene inserido no plasmídeo que a mesma alberga. Esta é uma maneira rápida e barata de produção em massa de um gene ou proteína codificada por este gene, para a produção, por exemplo, de insulina ou até mesmo ATBs.

7.4 Extração de DNA plasmideal

Os plasmídeos usados como vetores precisam ser purificados e separados do resto do genoma. Existem vários métodos de isolar o DNA plasmideal da bactéria: um destes métodos é a *lise alcalina*, em combinação com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS).

Neste método, a exposição da suspensão bacteriana a um detergente fortemente aniônico em pH alto, abre a parede celular, desnatura o DNA cromossômico e proteínas e libera o DNA plasmideal no sobrenadante. Apesar da solução alcalina desfazer completamente o pareamento de bases, as fitas do DNA plasmideal circular fechado não se separam porque são topologicamente entrelaçadas. Uma vez que a intensidade e duração da exposição ao íon OH^- não for muito grande, as duas fitas do DNA plasmideal voltam ao normal assim que o pH da reação tender a neutralidade. Durante a lise, proteínas bacterianas, parede celular rompida, DNA cromossomal desnaturado tornam-se enredados em grandes complexos que são revestidos pelo SDS. Estes complexos são eficientemente precipitados da solução quando íons sódio são substituídos por íons potássio. Após a remoção do material desnaturado por centrifugação, o DNA plasmideal nativo pode ser recuperado do sobrenadante.

Lise alcalina: purificação de culturas bacterianas contidas em volumes de 1 a 500 mL.

Minipreparações podem ser utilizadas para um rastreamento rápido do plasmídeo que contém o inserto com o gene de interesse. Obtem-se uma quantidade pequena e impura do DNA plasmideal, mas que é suficiente para análise do fragmento através de digestão enzimática. As maxipreparações são realizadas a partir de volumes grandes da suspensão bacteriana. Essencialmente, esta etapa é uma escala maior da minipreparação, seguida de purificação adicional do DNA. O resultado disto é uma quantidade grande do DNA plasmideal purificado (várias microgramas).

- OBS.: *Presença de degradação do DNA*: pode ser devido a ação de DNases de origem bacteriana. Quando o DNA plasmideal é importante, fazer uma extração com fenol logo após a lise alcalina. A presença de traços de fenol na amostra também pode degradar o DNA.


7.5 Conformação do DNA plasmideal

O DNA plasmideal quando submetido a eletroforese pode apresentar as seguintes conformações:

- "Superenrolado" (ou "Circular Covalentemente fechado"), DNA intacto.
- *DNA Circular Relaxado*: DNA intacto, relaxado enzimaticamente (superenrolamento removido).
- *DNA Superenrolado Desnaturado*: não é uma forma "natural" apresentada *in vivo*. É um contaminante produzido em pequenas quantidades seguido da lise alcalina excessiva. Ambas as fitas estão inteiras (não cortadas), mas não estão pareadas corretamente, resultando em uma forma de plasmídeo compactado.

- " DNA Linearizado" tem as duas fitas cortadas no mesmo sítio.

A mobilidade eletroforética do DNA plasmideal em gel é afetada pela conformação dos mesmos e segue a seguinte ordem:

- Linear (o mais lento)
 - Circular Relaxado
 - Superenrolado Desnaturado
 - Superenrolado (o mais rápido)
- 

7.6 Taxa de migração do DNA

A taxa de migração para fragmentos lineares pequenos é diretamente proporcional a voltagem aplicada. Em altas voltagens, fragmentos grandes migram rapidamente ainda que em taxas diferentes. Desta forma, a resolução do gel diminui com o aumento da voltagem.

7.7 Clonagem de fragmentos de DNA em plasmídeos

Antes de clonar fragmentos de DNA em plasmídeos é importante linearizar o plasmídeo com a enzima de restrição escolhida previamente e purificá-lo através de eletroforese em gel de agarose/low melting point/(LMP). Isto é necessário devido a presença nas preparações, mesmo após a linearização, de um percentual de plasmídeos circularizados, o que pode gerar, após a reação de ligação, em um percentual alto de plasmídeos vazios (sem o fragmento de DNA de interesse).

8 Introdução de DNA em células e microorganismos

No item 7.3 foi discutido a introdução de DNA em células procarióticas. Neste item será discutido a introdução de DNA em células eucarióticas.

O processo de transferência de genes para células eucarióticas é conhecido como transfecção.

A transfecção de células eucarióticas é realizada de várias maneiras, incluindo:

- *Co-precipitação de fosfato de cálcio*: método desenvolvido por Graham & van der Eb, 1973. Nesta técnica, o DNA que se deseja introduzir nas células é preparado previamente em uma solução contendo um DNA carreador, fosfato de cálcio e solução tampão. Após um período de incubação no escuro, a mistura de DNAs é adicionada às células e, cerca de 4 horas após, é realizado um choque de glicerol.
- *Transfecção mediada por lipossomos*: lipossomos são vesículas microscópicas formadas por uma bicamada de fosfolípides análoga à membrana celular. Vetores de lipossomos podem ser sintetizados pela mistura de fosfolípides com água e genes desejados sob condições apropriadas. Em geral, quando comparados com vetores virais, os lipossomos apresentam eficiência menor com relação à transferência de genes e expressão dos mesmos.

- *Eletroporação*: na eletroporação uma descarga elétrica aplicada com uma pistola provoca alteração da permeabilidade da membrana plasmática, facilitando a entrada dos genes nas células-alvo.
- *Microinjeção*: método de introdução de material genético para dentro da célula por meio de microprojéteis de DNA através da membrana celular. Os microprojéteis são, em geral, partículas de ouro de aproximadamente 1mm de diâmetro e capazes de penetrar na membrana celular sem causar dano às células. Este método pode ser utilizado em experimentos com músculo e cartilagem.
- *Transferência mediada por vírus*: Adenovírus, retrovírus e SV-40 podem ser usados para introduzir DNA nas células (neste caso, o genoma viral é manipulado de forma a remover os genes que causam doença e inserir o gene de interesse). A forma de introdução do DNA viral nas células pode ser através de um dos métodos descritos acima.

Um dos princípios básicos da tecnologia do DNA recombinante é o uso de marcadores biológicos para identificar as células que carregam moléculas do DNA recombinante. Para isto, após a transfecção, as células que absorveram o DNA são selecionadas pela expressão de um gene-repórter. Genes-repórter são genes utilizados para localizar, identificar ou analisar outros genes. Exemplos clássicos de genes-repórter são: o gene CAT que codifica a cloranfenicol-acetiltransferase, é um gene usado para avaliar a regulação do gene em células eucarióticas. De um modo mais amplo, genes-repórter podem ser transferidos para as células ou bactérias para monitorar se o DNA estranho está sendo expresso ou não. Os genes de resistência a antibióticos são um exemplo. Outros exemplos incluem a β -galactosidase, β -glucoronidase e fosfatase alcalina (se a enzima está presente e interage com o substrato, resulta em um produto colorido ou fluorescente). A GFP, uma proteína autofluorescente da medusa *Aequorea victoria*, está se tornando um gene-repórter de preferência, pois não requer ativação ou atividade enzimática para ser visualizado.

Em experimentos de transferência de genes de mamíferos envolvendo genes virais, a transferência de DNA exógeno para dentro das células é detectada porque o DNA tem alguma atividade biológica, a qual leva a produção de vírus infeccioso, ou expressão de proteínas virais ou ainda leva a produção de mudanças estáveis nas propriedades de crescimento das células transfectadas. Muitas vezes está não é uma tarefa fácil, uma vez que mesmo utilizando o melhor método de transfecção, este resulta na transferência estável de DNA para aproximadamente uma célula em mil.

9 Fórmulas reagentes

Solução H₂O/DEPC

Adicionar 1 mL de dietilpirocarbonato (DEPC) em 1 L de água deionizada. Misturar a solução em agitador magnético durante 1 hora. Após, autoclavar durante 1 hora (para hidrolisar o DEPC remanescente em CO₂ e etanol). Aliquotar em vidraria submetida a tratamento prévio pelo calor.

Tris 1 M

Dissolver 121,14 g de Tris (hidroximetil aminometano, P.M: 121,14) em 800 mL H₂O. Ajustar o pH para o valor desejado pela adição de HCl concentrado:

pH 7,4: ~70 mL

pH 7,6: ~60 mL

pH 8,0: ~42 mL

Ajustar o volume para 1 L com H₂O. Esterilizar por autoclavagem e armazenar em temperatura ambiente.

EDTA 0,5 M pH 8,0

Dissolver 186,12 g de etilenodiaminotetracético (Na₂ EDTA, P.M: 186,12) em 800 mL H₂O. Agitar vigorosamente com barra magnética. Ajustar o pH em 8,0 com NaOH (~20g *pellets* de NaOH) e ajustar o volume para 1 L com H₂O. Aliquotar e esterilizar por autoclavagem. Armazenar em temperatura ambiente.

Nota: o sal disódico de EDTA somente entrará em solução quando o pH da solução for ajustado em 8,0 pela adição de NaOH.

Tris-EDTA (TE) pH 8,0

10 mM Tris-Cl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

Esterilizar a solução por autoclavagem durante 20 minutos, 15 psi (1,05 kg/ cm²). Guardar a solução em temperatura ambiente.

NaCl 5 M

Dissolver 292,2 g de cloreto de sódio (NaCl, P.M: 58,44) em 800 mL H₂O. Ajustar o volume para 1 L. Esterilizar por autoclavagem e armazenar em temperatura ambiente.

Tampão TAE: Tris-acetato EDTA

TAE 50X: 242 g Tris base

57,1 ml ácido acético glacial

100 ml EDTA 0,5 M pH 8,0

TAE 1X: 40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA

20 ml TAE 50 X

40 µl brometo de etídeo

1 L água ultrapura

GLB (gel loading buffer)

0,25% BPB

30% glicerol

Meio Luria Bertani LB (p/ 1L)

Triptona 10 g
Extrato de levedura 5 g
NaCl 10 g

Ajustar o volume para 1 L e o pH em 7,0 (com NaOH 5N ~0,2 ml). Autoclavar.

NaOH 10 N

Usar frasco de plástico

Colocar vagorosamente 800 ml de água sobre 400 g NaOH (*pellets*). Agitar continuamente. Colocar no gelo com cuidado. Ajustar o volume final em 1 L (quando os *pellets* estiverem dissolvidos). Guardar em garrafa plástica em temperatura ambiente.

Antibióticos para seleção de plasmídeos recombinantes

Ampicilina/ estoque: 50 mg/ml. Usar 1 µl/ml de LB.

Tetraciclina/ estoque: 5 mg/ml. Usar diluído 500x para pBR322.

Soluções para Lise Alcalina

Solução I:

50 mM glicose
25 mM Tris-Cl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)

Preparar a solução I em alíquotas de 100 ml, autoclavar durante 15 minutos a 15 psi e armazenar a 4 °C.

Solução II:

NaOH 0,2 N (diluir na hora a partir de um estoque a 10 N)

SDS 1 % (w/v)

Preparar a solução II no momento do uso e manter a temperatura ambiente.

Solução III:

60 ml de uma solução de acetato de potássio 5 M

11,5 ml de ácido acético glacial

28,5 ml de água

A solução resultante é 3 M ao potássio e 5 M em relação ao acetato. Guardar a solução a 4°C e transferir ao gelo no momento do uso.

10 Referências bibliográficas

BARKER, K. **At the bench**: a laboratory navigator. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

COHEN, M., POCHINI, A.C., HAN, S., INGHAM, S.M., EJNIAMAN, B., ABDALLA, R.J. **Terapia gênica em ortopedia**. Disponível em: <<http://www.rbo.org.br/materia.asp?mt=1768&idIdioma=1>>. Acesso em: 16 nov. 2006.

CONTRIBUIDORES DA WIKIPÉDIA. Título. **Biologia Molecular**. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Biologia Molecular](http://pt.wikipedia.org/wiki/Biologia_Molecular)>. Acesso em: 16 nov. 2006.

DIEFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. **PCR primer: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.

GRAHAM, F.L., VAN DER EB, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52, p. 456-467. 1973.

KWOK, S., HIGUCHI, R. Avoiding false-positives with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237-238, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2nd ed. New York: Scientific American Books. 1992.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Caixa Postal 21, 89.700-000, Concórdia, SC
Telefone (49) 3441 0400, Fax (49) 3442 8559
<http://www.cnpsa.embrapa.br>
sac@cnpsa.embrapa.br*

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

