

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

Genes e Genomas Protocolos das aulas práticas

Licenciatura em Biologia Aplicada, 3º ano

Ano lectivo de 2012/2013

Docente coordenador: Rui Oliveira

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

Precauções em laboratório de biologia molecular

Segurança pessoal

- Agentes químicos

Grande parte dos reagentes são carcinogénicos, mutagénicos, tóxicos, inflamáveis ou altamente reactivos. Deve-se sempre consultar a MSDS ("material safety data sheet") de cada reagente.

- Radiações

Muitos trabalhos com ácidos nucleicos envolvem o uso de nucleótidos marcados radioactivamente com ^{32}P .

- Agentes biológicos

O modelo biológico com que se trabalha pode ser patogénico, materiais biológicos como anticorpos, hormonas e células podem conter agentes patogénicos e a manipulação de plasmídeos bacterianos pode levar a problemas de disseminação de resistências a antibióticos.

- Electricidade

Uma das técnicas mais utilizadas na manipulação e análise de ácidos nucleicos e proteínas é a electroforese em que se empregam elevadas voltagens.

Protecção do material em análise

- DNA

Degradado por DNases e é desnaturado reversivelmente com o aumento da temperatura.

- RNA

Degradado por RNases e é também desnaturado reversivelmente com o aumento da temperatura.

- Proteínas

São degradadas por proteases e desnaturadas irreversivelmente com o aumento da temperatura e, por vezes reversivelmente, com alterações de pH e agentes químicos que promovam oxidação.

Há inibidores químicos de RNases e proteases disponíveis comercialmente que são de ampla utilização.

- Reagentes

Devem ser de elevado grau de pureza ("suitable for molecular biology") de modo a serem isentos de proteases, DNases e RNases. No entanto, estão sempre sujeitos a contaminação após a abertura das embalagens por espátulas sujas, poeiras, etc.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

- Material de vidro

A autoclavagem desnatura irreversivelmente as DNases e as proteases. As RNases são-no apenas reversivelmente. Para as desnaturar de modo irreversível, deve-se empregar calor seco prolongado: 200°C durante ~12h.

- Material plástico descartável

Este material é isento de DNases, RNases e proteases, sendo também sujeito a contaminações após a abertura das respectivas embalagens.

1. Extração de gDNA de frutos

Introdução

O procedimento básico de qualquer protocolo de extração de DNA envolve lise celular, com libertação de todo o material intracelular, e purificação do DNA. O processo de rompimento das células é a parte do protocolo que mais varia se compararmos os diferentes processos de extração de diferentes sistemas biológicos: bactéria, levedura, células vegetais, células animais, etc. Com a lise celular são libertados para a solução todos os compostos intracelulares: proteínas, lípidos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e iões. No caso de células com parede celular, o rompimento das células é usualmente executado por acção enzimática, lisozima para bactérias, liticase para leveduras ou celulase para células vegetais que catalisam a degradação das respectivas paredes celulares. Outro processo é o rompimento mecânico com agitação forte em vórtex das células misturadas com esferas de vidro de 0,5mm de diâmetro. Duma maneira geral, os protocolos com rompimento enzimático dão origem a DNA de maior peso molecular e apropriado para a clonagem e construção de bancos genómicos. Em ambos os casos, emprega-se um detergente para completar a lise por perturbação da organização dos lípidos membranares. Assim, a purificação do DNA consistirá em libertar o DNA de todos os compostos referidos, o que é feito usualmente por precipitações diferenciais e acção de enzimas específicas como por exemplo proteases e RNAases.

Nas precipitações diferenciais, recorre-se, geralmente, à mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico em que o fenol e clorofórmio desnaturam as proteínas, ficando estas solubilizadas na fase fenólica que se separa com maior eficácia da fase aquosa por acção do clorofórmio e álcool isoamílico. Os passos posteriores de purificação baseiam-se na insolubilidade do DNA em etanol na presença de concentrações relativamente elevadas de catiões monovalentes. Em solução vão permanecer solutos orgânicos e resíduos de fenol e clorofórmio. Posteriormente, é usado etanol a 70% no qual se dissolvem a maioria dos catiões, resultando DNA praticamente puro no precipitado.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

O DNA genómico extraído por estes processos é usado para a construção de bancos genómicos, após tratamento com enzima de restrição e incubação convenientes para a obtenção de fragmentos do tamanho pretendido; para análise de "Southern"; e como molde para amplificação *in vitro* por PCR.

O DNA deve ser guardado solubilizado a -70°C para prevenir a acção de DNases que possam contaminar a solução. No entanto, o congelamento e descongelamento sucessivos provoca quebras nas moléculas de DNA. Por isso, para armazenamento por longos períodos de tempo, deve-se guardar o DNA em alíquotas a -70°C . Se o armazenamento for por um período curto, deve-se então guardar a 4°C . Regra geral, o DNA é dissolvido, para armazenamento, em tampão TE (tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) em que o EDTA previne a degradação do DNA por acção queladora de metais pesados que promovem a quebra das ligações fosfodiéster e outros catiões como o Ca^{2+} necessários à acção das DNases.

Protocolo

1. Cortar o fruto em pequenos pedaços (eventualmente esmagar o fruto com um garfo).
2. Num copo, misturar 4 colheres de café de sal grosso e 2 colheres de chá de detergente da louça.
Adicionar 100ml de água quente (60°C).
3. Juntar o fruto em pedaços (ou esmagado) à solução anterior e mexer lentamente durante alguns minutos.
4. Colocar um filtro de café num funil e deixar passar a mistura anterior para um tubo de ensaio.
5. À solução filtrada adicionar álcool que tenha estado em gelo (verter cuidadosamente o álcool de encontro às paredes do tubo).
6. Observar a formação do "novelo" de DNA. Enrolar lentamente num palito o DNA precipitado.
7. Dissolver o DNA em água ultra-pura ou tampão TE (tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e guardar a -20°C .

2. Extracção de DNA plasmídico

Introdução

Plasmídeos bacterianos são moléculas de DNA extracromossómico, circulares e de replicação autónoma. Nos habitats naturais, os plasmídeos são frequentes, conferindo aos seus hospedeiros características (fenótipos) que poderão constituir vantagem selectiva. Destes fenótipos, contam-se a resistência a antibióticos, resistência a metais pesados, produção de enzimas de restrição, produção de aminoácidos raros e produção ou catabolismo de moléculas orgânicas complexas. Ainda em habitats naturais, muitos plasmídeos têm a capacidade de transferir o seu DNA para outros hospedeiros que poderão ser de estirpes diferentes e, até, de espécies diferentes por um processo denominado conjugação na qual está envolvido um gene: *mob*.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

Na replicação dos plasmídeos estão envolvidos vários genes que poderão ser exclusivamente do genoma do hospedeiro ou, então, deste e do próprio plasmídeo. O local de origem da replicação (ori) juntamente com os elementos de control cis constituem o replicon ou replicador. Para replicadores diferentes, o mecanismo de replicação é diferente, podendo envolver mais ou menos genes e enzimas do hospedeiro. Duma maneira geral, plasmídeos que partilham mecanismos semelhantes de replicação, envolvendo os mesmos genes e as mesmas enzimas, são incompatíveis, ou seja, não podem coexistir no mesmo hospedeiro. Assim, numa célula que contenha dois plasmídeos com replicadores semelhantes vai ocorrer um fenómeno que se poderá denominar competição, entre os plasmídeos, seja pela maquinaria de replicação do hospedeiro, seja pela vantagem selectiva conferida por cada um ao hospedeiro. Deste modo, foram criados grupos de incompatibilidade aos quais pertencem plasmídeos com replicadores idênticos. Por outro lado, plasmídeos pertencentes a grupos de incompatibilidade diferentes possuem replicadores cujos componentes não são comuns.

Uma consequência do tipo de replicador dum plasmídeo constitui uma propriedade extremamente importante: o número de cópias por célula. Plasmídeos cujo mecanismo de replicação não depende grandemente de proteínas codificadas por genes pertencentes exclusivamente ao genoma do hospedeiro, são ditos multicópia. Tal deve-se ao facto da sua replicação não estar dependente do ciclo celular, em que há síntese dos factores de replicação apenas no início da divisão celular, nem das proteínas iniciadoras da replicação, que são instáveis, levando a que o seu número por célula seja elevado: mais de 20 cópias. Por outro lado, os plasmídeos em que a replicação está fortemente dependente das proteínas do hospedeiro, têm a sua replicação sincronizada com a replicação do cromossoma da célula, sendo o número de cópias por célula inferior a 20.

Para além do fenómeno de incompatibilidade entre plasmídeos e do número de cópias por célula, os plasmídeos também são caracterizados pelas marcas selectivas. As marcas selectivas são fenótipos conferidos por alelos dominantes plasmídicos que permitem distinguir células portadoras desse plasmídeo das não portadoras, através de testes simples em que se tenta evidenciar esse fenótipo. As marcas selectivas mais usadas em plasmídeos bacterianos são a resistência a antibióticos. Assim, células portadoras destes plasmídeos são resistentes a determinado antibiótico, enquanto que as que não o possuem mantêm a susceptibilidade. Por exemplo, no caso frequente da ampicilina, o gene plasmídico que lhe confere resistência codifica uma β -lactamase que é uma enzima que catalisa a degradação do anel β -lactâmico característico das penicilinas como a ampicilina. As células portadoras deste plasmídeo são capazes de formar colónias em meios de cultura contendo ampicilina, enquanto que as células que não o possuem não são viáveis nesses meios.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

Aos plasmídeos de ocorrência natural, foram feitas alterações para melhorar as suas qualidades para vários fins entre os quais se contam a clonagem de genes e a sua expressão aumentada. Assim, criaram-se os chamados vectores plasmídicos de clonagem e os vectores plasmídicos de expressão. Por manipulação das marcas selectivas, dos replicadores e de sequências sem função, foram criados novos plasmídeos com marcas selectivas convenientes, com maior número de cópias e mais pequenos em tamanho. Por outro lado, foram introduzidas sequências novas para aumentar o número de locais de clonagem (locais de clonagem múltipla) para os vectores de clonagem e introdução de promotores de expressão fortes a montante do local de clonagem nos vectores de expressão.

Tal como para o DNA genómico, a extracção de DNA plasmídico envolve a lise celular e purificação do plasmídeo. Os métodos mais frequentes de lise são a lise alcalina e a lise por fervura. A lise alcalina é feita com dodecil sulfato de sódio (SDS) que desnatura as proteínas e emulsiona os lípidos e NaOH que desnatura todo o DNA (cromossómico e plasmídico), para além também das proteínas. Por neutralização do pH com acetato de potássio, o DNA plasmídico (cccDNA: "covalently closed circular DNA") renatura rapidamente porque as duas cadeias não se podem separar devido aos super-enrolamentos, enquanto que o DNA genómico, constituído por longas cadeias, se mantém desnaturado e precipitado com as proteínas.

No método de lise por fervura, as células são lisadas com lisozima que catalisa a degradação da parede celular bacteriana, detergente e calor. Daqui resulta a libertação dos plasmídeos e RNA, enquanto que o DNA cromossómico se mantém ancorado à membrana plasmática que precipita juntamente com os restantes constituintes celulares.

Os métodos de coluna de afinidade de proveniência comercial baseiam-se na lise alcalina. A purificação do DNA é efectuada por passagem da mistura por uma coluna contendo uma resina insolúvel que tem a propriedade de fixar selectivamente o DNA. Por lavagens da resina com uma solução com etanol para o manter insolubilizado, purifica-se o DNA que é, posteriormente, eluído com água ou tampão TE.

Duma maneira geral, a qualidade do DNA plasmídico obtido por lise por fervura é inferior à do DNA obtido pelos outros métodos. No entanto, para tratamento de grandes quantidades de amostras em simultâneo, o método de lise por fervura é o preferido pela sua rapidez de execução. A estirpe de bactéria e tipo de plasmídeo, nomeadamente o seu tamanho, são os parâmetros principais que influenciam o rendimento final em DNA, que pode ser de 2-5µg de DNA por 1,5ml de cultura para o plasmídeo pBR322 e de 3 a 5 vezes mais para o pUC19, independentemente do método usado.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

Protocolo

Método 1: Miniprep por fervura rápida (Holmes & Quigley, 1981)

1º dia

1. Numa placa de Petri contendo meio LB suplementado com o antibiótico apropriado, e dividida em quatro sectores, estender 4 colónias distintas de *E. coli*. Incubar durante a noite a 37°C.

2º dia

2. Recolher a biomassa formada com um palito e transferi-la para um microtubo com 0,5 ml de tampão STET.

3. Agitar o tubo fortemente no vórtex até que as células se dispersem completamente.

4. Adicionar 5 µl de lisozima (5%, p/v) e misturar por inversão.

5. Colocar os tubos imediatamente num banho de água a ferver, durante 2 min.

6. Centrifugar 15 min numa microcentrifuga de bancada, à temperatura ambiente, no máximo da velocidade.

7. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo (de modo a proteger os ácidos nucleicos das endonucleases é importante utilizar luvas a partir deste passo)

8. Adicionar tampão TE até perfazer 0,5 ml do volume total e 1 µl de solução de RNase (10

9.mg/ml).

10. Proceder a uma incubação de 10 minutos a 37°C.

11. Adicionar 10 µl de NaCl (5M) e 0,4 ml de isopropanol. Deixar 15 minutos a -20°C e seguidamente centrifugar durante 10 minutos, numa microcentrifuga de bancada, à temperatura ambiente e no máximo da velocidade.

12. Eliminar o sobrenadante por aspiração numa trompa de vácuo ou com uma micropipeta.

13. Lavar o sedimento com 1 ml de etanol (70%, v/v), deixar secar.

14. Dissolver o sedimento em 40 µl de tampão TE.

Método 2: Purificação de DNA por lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979)

1º dia

1. Numa placa de Petri com meio de cultura LB suplementado com o antibiótico apropriado, e dividida em quatro sectores, estender 4 colónias distintas de *E. coli*. Incubar as placas durante uma noite a 37°C.

2º dia

2. Recolher a biomassa formada com um palito e transferi-la para um microtubo com 0,2 ml de meio LB.

3. Juntar 0,1 ml solução I e agitar em vórtex.

4. Juntar imediatamente 0,2 ml solução II e inverter lentamente 4 vezes (não usar vórtex). Colocar o tubo no gelo.

5. Adicionar 0,15 ml solução III e agitar lentamente com movimentos circulares.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

6. Centrifugar numa centrífuga de bancada, no máximo da velocidade, durante 2 min (de modo a proteger os ácidos nucleicos das endonucleases é importante utilizar luvas a partir deste passo)
7. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo contendo 0,5 ml de isopropanol. Misturar por inversão.
8. Centrifugar numa centrífuga de bancada, no máximo da velocidade, durante 1 min.
9. Rejeitar o sobrenadante. Lavar o sedimento com 1 ml de etanol (70%, v/v).
10. Centrifugar novamente, no máximo da velocidade, durante 1 min.
11. Dissolver o sedimento em 50 μ l TE contendo 10 μ g/ μ l de RNase pancreática.

Meios e soluções utilizadas

Meio LB

- 1% (p/v) Triptona
- 0,5% (p/v) Extracto de levedura
- 1% (p/v) NaCl
- Ajustar pH 7,5 com NaOHaq
- Autoclavar 20min, 120°C, 1bar. Para meios sólidos adicionar 2% (p/v) de agar antes de autoclavar. Para suplementar o meio com ampicilina adicionar ampicilina para 100 μ g/ml final após autoclavagem e arrefecimento do meio a, pelo menos, 50°C.

Tampão STET

- 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 5% (v/v) Triton X-100

Tampão Tris-EDTA (TE)

- 10 mM Tris.HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

Sol. I

- 50mM glucose
- 25mM Tris.HCl (pH 8,0)
- 10mM EDTA (pH 8,0)

Sol. II

- 200 mM NaOH
- 1% (p/v) SDS

Sol. III

- 3.0 M KAc (pH 5.5)

3. Determinação da concentração e pureza de ácidos nucleicos

Introdução

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

O método mais usado para a determinação do grau de pureza de DNA é o método espectrofotométrico. Uma vez determinado o grau de pureza da amostra, a concentração pode ser avaliada também por espectrofotometria, no caso de amostras puras, ou por intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo, se a amostra estiver contaminada com as impurezas habituais resultantes dos protocolos de extracção: proteínas, fenol, agarose e RNA.

Na análise espectrofotométrica, a absorvância a 260nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos, sendo a seguinte a proporcionalidade:

Absorvância	Equivalência
260 nm	~50 µg/ml dsDNA
	~37 µg/ml ssDNA
	~40 µg/ml ssRNA
	~20 µg/ml oligonucleótidos

Para a determinação do grau de pureza, faz-se a leitura da absorvância a 280nm que é proporcional à quantidade de proteínas e fenol e a 325nm que é proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes". O grau de pureza é frequentemente calculado através da relação A260/A280 que deve ser entre 1,8 e 2,0. Para valores inferiores a 1,8, considera-se a amostra contaminada com proteína e fenol.

Em amostras contaminadas ou muito diluídas (<250ngDNA/ml) a concentração é determinada por emissão de fluorescência por intercalação selectiva de brometo de etídeo. Este método pode ser realizado em simultâneo com a análise da amostra por electroforese, bastando usar um padrão conveniente, aparelhagem de leitura de fluorescência em geles e "software" de tratamento de imagem. Recentemente surgiram novos fluorocromos que marcam selectivamente o DNA, tendo alguns a grande vantagem de não serem carcinogénicos nem mutagénicos. Exemplos destes são o GelRed™ (Biotium) e o SYBR® safe (Life Technologies).

Protocolo

2. Ligar o espectrofotómetro e regular para 260nm.
3. Fazer o zero de absorvância com 1ml de água ultra-pura em "cuvette" de quartzo.
4. Na mesma "cuvette" de quartzo adicionar 695µl de água ultra-pura e, depois, 5µl do DNA a quantificar (diluição de 140x). Tapar a "cuvette" com parafilm® e inverter várias vezes para misturar.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

5. Fazer a leitura de absorvância a 260nm.
6. Repetir as leituras a 280nm e 325nm.
7. Calcular a pureza e concentração de DNA na amostra.

4. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Introdução

Endonucleases de restrição são enzimas que reconhecem pequenas sequências de DNA e cortam o DNA em cadeia dupla num local específico dentro dessa sequência ou adjacente a ela. De acordo com as características de corte, as enzimas de restrição são classificadas em três tipos. As enzimas tipo I e III, para além da acção nucleásica, têm acção modificadora (metilação) na mesma proteína. Acresce que as enzimas do tipo I cortam ao acaso próximo da sequência de reconhecimento. Por estas razões, as enzimas do tipo I e III não são usadas em investigação de rotina em biologia molecular.

As endonucleases de restrição do tipo II são sistemas binários em que uma subunidade tem acção nucleásica e a outra acção de metilação. Ambas estas acções são efectuadas em locais específicos dentro ou adjacentes à sequência de restrição no DNA. Estas sequências são de 4 a 8 nucleótidos, havendo algumas enzimas que reconhecem sequências maiores. Como há especificidade para o local de corte, as enzimas de restrição podem ser usadas para a degradação de moléculas de DNA com obtenção de fragmentos de menor tamanho, cujas extremidades são conhecidas em termos de sequência nucleotídica e que podem ser separados em electroforese em gel de agarose. As sequências das extremidades e o tamanho dos fragmentos obtidos variam de acordo com a enzima de restrição usada.

Pela possibilidade de manipulação em locais específicos do DNA, as enzimas de restrição constituem ferramentas básicas em biologia molecular. Duma maneira geral, são usadas para o estabelecimento de mapas de restrição de fragmentos de DNA cuja sequência é desconhecida, fragmentação de DNA genómico para separação electroforética e posterior análise por "Southern", criação de fragmentos menores dum DNA clonado para subclonagem num vector apropriado e criação de sondas marcadas para análises por "Southern" e "Northern".

De acordo com o modo de corte da cadeia dupla, há enzimas que originam extremidades sem nenhuma das duas cadeias protuberante ("blunt ends"), quando o corte é feito no eixo de simetria (*DraI* por exemplo). Enzimas que não cortam ao longo do eixo de simetria da sequência de reconhecimento dei-

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

xam extremidades com uma das cadeias protuberante que pode ser a extremidade 3' (*KpnI*) ou 5' (*BamHI*). Endonucleases com a mesma sequência de reconhecimento são designadas isosquisómeros e podem ou não originar extremidades iguais nos fragmentos a que dão origem (*Sau3AI* e *NdeI*). Por outro lado, enzimas que sejam isosquisómeros, ou não, podem originar extremidades com cadeias protuberantes semelhantes e que portanto podem ser ligadas umas às outras por haver sequências complementares. Estas enzimas (*BamHI* e *BglII* por exemplo) produzem extremidades compatíveis e são de grande utilidade pois são ferramentas essenciais na construção de moléculas recombinantes.

Dois factores são essenciais para a eficiência de corte das endonucleases de restrição: pureza do DNA e o tampão de digestão. As impurezas habituais presentes em amostras de DNA (proteína, fenol, clorofórmio, etanol, EDTA, SDS e elevada concentração de sais) podem inibir por completo determinadas enzimas de restrição. Muitas vezes este problema pode ser ultrapassado empregando maior quantidade de enzima, no entanto, geralmente é melhor fazer nova purificação do DNA. Por outro lado, em amostras conservadas em tampão TE, o EDTA pode quelar catiões que sejam necessários à actividade da enzima a usar. A influência de todos estes factores é dependente da enzima de restrição, pelo que se devem ter em conta quando se verifica ausência de actividade, assegurando-se que as condições de reacção foram as ideais.

Os componentes essenciais dos tampões de digestão são: tampão tris para pH 7,5- 8,0; iões de magnésio, cloro, sódio e potássio; e um agente redutor como o ditioeritritol, ditiotretol ou 2-mercaptoetanol. Embora haja especificidades da actividade em relação a todos os estes factores, o mais importante é a concentração de iões (força iónica). Assim, dividem-se as enzimas em três grupos: as que requerem elevada força iónica, média força iónica e baixa força iónica. Esta propriedade é particularmente importante para digestões com várias enzimas de restrição em que é impossível a digestão simultânea com enzimas que requerem diferentes forças iónicas. Nestes casos devem-se fazer as digestões em separado, começando pela enzima de menor força iónica, desnaturar a enzima por calor, ajustar a concentração de sais e proceder à segunda digestão. As consequências do uso de condições não ideais em digestões com enzimas de restrição são a ausência de actividade ou a "star activity" em que a enzima perde a especificidade para a sequência de reconhecimento, passando a fazer cortes não só nos locais específicos mas também noutros.

Um factor que pode ser importante em alguns casos é o grau de metilação do DNA. A produção de enzimas de restrição é um mecanismo de defesa contra a infecção por DNA exógeno em bactérias. Para precaver a acção contra o próprio DNA, estas enzimas de restrição promovem a metilação de nucleótidos, ficando então a sequência de reconhecimento imune à sua acção. Assim, quando se trabalha com

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

DNA plasmídico proveniente de estirpes bacterianas com capacidade de metilação, deve-se ter em atenção, também, a sensibilidade da enzima a usar para a metilação dos nucleótidos da sequência de reconhecimento. A estratégia mais usada é o uso de estirpes bacterianas manipuladas geneticamente para a perda desta capacidade.

A acrescentar aos cuidados a ter nas condições de digestão, as enzimas de restrição são extremamente instáveis e de elevado preço. Assim, devem-se cumprir normas rigorosas para evitar desperdícios e perdas de actividade (ver o protocolo).

Protocolo

1. A um microtubo colocado no gelo adicionar

- 0,2-1µg de DNA
- 2µl de tampão conveniente (10x conc.)
- água ultra-pura esterilizada q.b.p. 19µl

Misturar agitando no vórtex. Manter o microtubo no gelo.

2. Adicionar 1µl da enzima de restrição e agitar novamente como em 1.

As enzimas de restrição são extremamente caras e de grande instabilidade. Nas preparações comerciais, estas enzimas estão em soluções concentradas de glicerol e mantidas a -20°C. Assim, deve-se ter o maior cuidado ao pipetar estes produtos para evitar desperdícios e desnaturações, de acordo com os seguintes conselhos:

- *certificar-se que usa sempre uma ponta nova da micropipeta*
- *mergulhar o mínimo possível da ponta no líquido para pipetar*
- *manter a solução da enzima o mínimo de tempo possível fora do recipiente refrigerador ou gelo*
- *usar o mínimo possível de enzima, garantindo que este volume não contribui com mais de 10% do volume final de reacção*

3. Para calcular a quantidade a usar, consultar a ficha técnica do fabricante. De um modo geral, 1 unidade corresponde à quantidade de enzima necessária para digerir completamente 1µg de DNA do fago lambda, durante 1 hora a 37°C e com o tampão adequado. Para efeitos práticos, considera-se que 1U digere 1µg DNA/h

4. Incubar a mistura à temperatura conveniente de acordo com a enzima (normalmente 37°C) e durante ~1,5horas

5. Para determinados fins, a reacção pode ser parada através da adição de EDTA 0,5M para uma concentração final de 10mM, ou, no caso de se tratar duma enzima termolábil, através do aquecimento da mistura a 65°C durante 10-15min

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

6. Analisar os produtos da reacção em electroforese em gel de agarose (incluir um controlo com amostra de DNA não digerida).

5. Electroforese de DNA em gel de agarose

Introdução

A electroforese de DNA consiste na separação de diferentes fragmentos de DNA de acordo com as suas diferentes mobilidades num campo eléctrico. A electroforese pode ser analítica, tendo como objectivo a análise de determinada amostra de DNA, por identificação dos fragmentos constituintes, quantificação e determinação do peso molecular. Por outro lado, a electroforese pode ser preparativa quando o objectivo é a separação e purificação de determinada fracção ou fragmento que faça parte duma amostra.

Num campo eléctrico, definido pela diferença de potencial em Volts e pela distância entre os eléctrodos em centímetros (V/cm), as moléculas de DNA migram para o eléctrodo positivo (ânodo) devido às cargas negativas dos grupos fosfato. Esta migração é retardada pelo atrito das moléculas com o suporte da electroforese. Como a relação carga/massa é igual para diferentes fragmentos de DNA, o parâmetro principal a condicionar a migração de DNA numa mesma electroforese é a dimensão dos fragmentos.

Para o planeamento duma electroforese é preciso ter em conta todos os factores que influenciam a migração de DNA de modo a aproveitar o melhor possível as potencialidades desta técnica:

- Peso molecular

Fragmentos lineares de DNA em cadeia dupla migram através duma matriz de gel a velocidades inversamente proporcionais ao \log_{10} do número de pares de bases devido a um maior atrito com a matriz (gel de agarose) com o aumento do tamanho.

- Concentração da agarose

Pelas mesmas razões da influência do peso molecular na mobilidade, o aumento da concentração da agarose leva ao retardamento da migração electroforética. A linearidade entre migração X peso molecular é, também, alterada pelo que se deve adaptar este parâmetro à gama de tamanhos de fragmentos que se pretende resolver (consultar as tabelas de separação electroforética fornecidas pelo fabricante da agarose).

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

- **Conformação do DNA**

Consideram-se três conformações do DNA: a forma I é o DNA circular fechado (cccDNA ou "covalently closed circular DNA"); a forma II é o DNA circular com uma quebra numa ligação fosfodiéster ("nicked"); a forma III é o DNA linear em cadeia dupla (dsDNA ou "double stranded DNA"). Duma maneira geral, sob condições usuais, cccDNA migra mais rapidamente do que fragmentos do mesmo tamanho de dsDNA porque a conformação circular tem menor raio hidrodinâmico devido aos superenrolamentos. Na forma II, os enrolamentos desaparecem por causa da quebra numa ligação fosfodiéster o que faz com que seja a forma mais lenta em electroforese.

- **Voltagem aplicada**

A voltagens elevadas os fragmentos maiores tendem a migrar a velocidades maiores do que as previstas na relação linear migração X peso molecular. Assim, as electroforeses destinadas à separação de fragmentos de elevado peso molecular devem ser feitas a voltagens inferiores.

- **Composição do tampão de electroforese**

Os tampões mais usados neste tipo de electroforese são o tris/acetato (TAE) e o tris/borato (TBE). O TBE tem maior capacidade tampão, no entanto, deve ser evitado em electroforeses preparativas com purificação de DNA a partir de geles de agarose devido aos iões borato formarem complexos com açúcares em polímeros como a agarose.

- **Presença de brometo de etídeo**

O brometo de etídeo tem a propriedade de se intercalar entre pares de bases do DNA, conferindo maior rigidez e comprimento à molécula. Isto faz com que a migração das formas de DNA II e III seja menor. Quanto ao cccDNA, a intarcação de brometo de etídeo introduz enrolamentos positivos, diminuindo o número de enrolamentos negativos que existem espontaneamente. Isto faz com que a migração seja menor porque a molécula aumenta o seu raio hidrodinâmico. No entanto, com o aumento da concentração de brometo de etídeo e após adquirir o estado de ausência de enrolamentos, a molécula começa a diminuir o raio hidrodinâmico porque aumentam os enrolamentos, desta vez, no sentido positivo. Assim, a migração passa a ser mais rápida.

Para a visualização do DNA após a corrida, usa-se o brometo de etídeo como corante específico do DNA porque tem a capacidade de se intercalar entre pares de bases. Sob radiação ultra-violeta, o brometo de etídeo emite fluorescência, surgindo corado apenas o DNA. Este corante pode ser incorporado no tampão com a vantagem de se poder parar a corrida, verificar se a migração foi ou não suficiente, e, se necessário, continuar a electroforese. No entanto, por razões de segurança, pode-se corar o gel apenas no fim da corrida. Para este caso é particularmente conveniente a adição dum corante (azul de bro-

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

mofenol ou xileno de cianol) às amostras para uma avaliação correcta da migração: o xileno de cianol migra juntamente com fragmentos de ~5Kb enquanto que o azul de bromofenol migra juntamente com fragmentos de ~0,5Kb.

Com o recurso à electroforese, podem-se separar fragmentos de DNA desde 5bp até 10.000Kb. Fragmentos de 5bp até 500bp são bem separados com geles de poliacrilamida que têm a capacidade de poder distinguir fragmentos que diferem em apenas um par de bases. Os geles de agarose (agar purificado) são utilizados para fragmentos de 200bp até 50Kb, desde que se adapte a concentração de agarose à dimensão dos fragmentos a separar. Para fragmentos de dimensões superiores a 50Kb, recorre-se a técnicas de electroforese em campo pulsado: FIGE - "field-inversion gel electrophoresis" e CHEF - "contour-clamped homogeneous field electrophoresis". Nestes tipos de electroforese, há aplicação alternada de campos eléctricos com sentidos e/ou direcções diferentes de modo a provocar a contracção e extensão das longas moléculas de DNA a separar durante a migração para o ânodo, fazendo com que estas tenham um movimento denominado reptação.

Protocolo

Preparação do gel de agarose

1. Preparar uma solução de agarose em tampão TAE com concentração final de 0,8% (p/v). Aquecer a mistura em microondas, com agitação frequente, até toda a agarose se ter dissolvido.
2. Colocar o tabuleiro da tina de electroforese no respectivo suporte de preparação do gel ou, na sua falta, selar com fita adesiva de autoclave.
3. Colocar o pente em posição conveniente no tabuleiro para um correcto posicionamento dos poços
4. Verter a agarose no tabuleiro até uma altura de ~5mm. Eliminar bolhas de ar que se tenham formado, aspirando com uma micropipeta e deixar solidificar à temperatura ambiente.
5. Quando o gel se tiver formado, retirar lentamente o pente para não danificar os poços, colocar o tabuleiro na tina de electroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eléctrodo negativo, e adicionar tampão TAE até ~1mm acima do gel.

Preparação das amostras

6. Para cada amostra, misturar num microtubo:
 - 100-500ng de DNA
 - 4µl de tampão de amostra (5x conc.)
 - água ultra-pura q.b.p. 20µl
7. Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos. Aplicar o marcador de pesos moleculares num dos poços das extremidades do gel.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

8. Colocar a tampa da tina. Verificar que as amostras estão colocadas do lado do polo negativo (cátodo, eléctrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do polo positivo (ânodo, eléctrodo de cor vermelha).

9. Ligar os cabos à fonte de electricidade. Ligar a fonte e regular para uma voltagem de 1-5V/cm (distância medida entre os eléctrodos). Verificar se há desprendimento de bolhas dos eléctrodos devido à electrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correcto.

10. Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente eléctrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. Retirar o gel cuidadosamente para não partir e corar o DNA de acordo com o protocolo a fornecer.

11. Tomando como referência a distância (mm) percorrida pelos fragmentos do marcador de pesos moleculares de DNA padrão, cujas dimensões são conhecidas (pb), construir em papel semi-logarítmico, um gráfico do log dos fragmentos do DNA padrão vs. a mobilidade no gel dos fragmentos.

12. Tomando a distância percorrida pelo DNA amostra e aplicando esse valor no gráfico determinar as dimensões dos fragmentos do DNA da amostra. Alternativamente, utilizando a equação da recta da calibração, determinar as dimensões dos fragmentos.

Meios e soluções utilizadas

Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 20x

- 0,8M tris.base
- 20mM EDTA
- Ajustar pH a 7,2 com ácido acético

Tampão de aplicação 2,5x

- 0,25% (p/v) Azul de bromofenol
- 0,3% (p/v) Glicerol

6. Reacção da polimerase em cadeia (PCR)

Introdução

A reacção da polimerase em cadeia ("polymerase chain reaction", PCR) é uma reacção de amplificação de um dado fragmento de DNA por síntese *in vitro*. Esta reacção baseia-se na mistura dos componentes necessários para a replicação de DNA: DNA polimerase, nucleótidos (dNTP's), "primers" (oligonucleótidos iniciadores de síntese), DNA molde e um tampão adequado para a actividade máxima da enzima usada. O que permite determinar a especificidade da sequência a ser amplificada é o emprego dos

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

“primers” que consistem em pequenos fragmentos de DNA (18 a 30 nucleótidos) em cadeia simples, cuja sequência é complementar a uma dada região do DNA molde e com a qual vão emparelhar quando as condições da mistura de reacção o permitirem. Com o uso de “primers” específicos, é possível amplificar toda a região situada entre eles.

Com a manipulação da temperatura da mistura de reacção, pode-se fazer alternar fases de reacção (alongamento) com fases de desnaturação e fases de emparelhamento. À medida que se vão cumprindo estes ciclos, os fragmentos acabados de ser sintetizados vão servir de molde para novas reacções de alongamento, o que resulta num aumento exponencial do número de fragmentos de DNA, iguais ao DNA existente entre os dois “primers” na molécula original. No entanto, ainda há os fragmentos originais com comprimento maior do que o comprimento do segmento compreendido entre os “primers” e, também, os fragmentos resultantes dos dois primeiros ciclos com dimensões maiores na extremidade oposta à do “primer” que o originou. Todos estes fragmentos continuam na mistura de reacção, funcionando como molde nos ciclos subsequentes de alongamento. Deste modo, ocorre sempre síntese de fragmentos maiores do que a região de DNA a amplificar, só que este aumento é aritmético (linear) enquanto que o aumento dos fragmentos desejados é geométrico (exponencial).

Em resumo, numa reacção de PCR, cada ciclo terá de compreender três passos cumpridos com alterações de temperatura: desnaturação (normalmente a 94°C), emparelhamento (entre 50°C e 60°C) e alongamento (cerca de 72°C). Para evitar o emparelhamento não específico dos “primers”, é conveniente executar este passo a temperaturas relativamente elevadas sem, no entanto, se aproximarem da temperatura óptima de acção da polimerase. Este problema deixou de se colocar com a aplicação de polimerases termoestáveis como a *Taq* DNA polimerase isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*. A temperatura óptima de acção desta enzima é de 72°C, pelo que o passo de emparelhamento pode ser executado a 50°C, sendo suficientemente elevada para evitar emparelhamentos não específicos. Acresce que esta enzima não perde actividade após incubações prolongadas a 95°C, garantindo-se a sua plena actividade ao longo de todos os ciclos do PCR. Assim, numa reacção de PCR, pode-se obter entre 0,5µg a 1µg de DNA com comprimento até 2kb a partir de 10⁻⁶µg de DNA molde ao fim de 30-35 ciclos de amplificação.

Dada a simplicidade de execução e o poder de amplificação, a técnica de PCR tem sido aplicada para todo o tipo de análises genéticas a amostras em quantidades pequenas e, também, na síntese de DNA com sequências específicas. Assim, é usado no diagnóstico de doenças genéticas, incluindo diagnóstico pré-natal, e na detecção de microrganismos patogénicos em amostras clínicas, na identificação de amostras de natureza forense (cabelos, escamas de pele, sêmen, etc) e análise de mutações em on-

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

cogenes activados. Por outro lado, o PCR também tem aplicação no estudo da evolução molecular, na produção de sondas para experiências de hibridização, clonagem de genes desconhecidos a partir de amostras de DNA genómico, produção de bibliotecas genómicas de cDNA, sequenciação de DNA e análise de mutações.

Protocolo

1. Num microtubo arrefecido de 1,5ml misturar, em gelo preparar um “master mix” a partir das quantidades indicadas na tabela, adaptando as quantidades dos reagentes para o número de reacções a realizar mais um excesso de 10% (incluir um controle negativo omitindo o DNA molde).

Reagente	Quantidade
Tampão de reacção (10x)	5µl
“Primer” 1f (50µM)	0,4µl
“Primer” 1r (50µM)	0,4µl
dNTPs (10mM cada)	0,4µl
MgSO ₄ (100mM)	0,5µl
<i>Taq</i> DNA polymerase (2U/µl)	0,25µl
H ₂ O ultra-pura	qbp 35µl

2. Distribuir a mistura pelos microtubos de 0,2ml arrefecidos no gelo (41,95µl por tubo).

3. Adicionar a cada microtubo o DNA molde (1-10µl; ~100ng).

4. Completar o volume de 50µl em cada microtubo com água ultra-pura.

5. Misturar bem pipetando cuidadosamente várias vezes a mistura em cada tubo.

6. Ligar o termociclador e introduzir o seguinte programa:

Acção (passo)	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	94°C	2 min.	
Emparelhamento	55°C	30 seg.	1°
Polimerização	72°C	75 seg.	
Desnaturação	94°C	30 seg.	
Emparelhamento	55°C	30 seg.	2°-29°
Polimerização	72°C	75 seg.	
Desnaturação	94°C	30 seg.	
Emparelhamento	55°C	30 seg.	último
Polimerização final	72°C	5 min.	

7. Retirar uma amostra de 10µl do produto de PCR e analisar em electroforese em gel de agarose a 0,8%. Guardar o restante DNA a 4°C.

Rui Oliveira	Departamento de Biologia	tel +351 253601512
	Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga	fax +351 253678980
		ruipso@bio.uminho.pt

7. "Forensic DNA Fingerprinting"

Seguir as instruções do kit comercial.

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Birnboim, HC and Doly, J. 1979. Nucleic Acids Research 7:1513-1523
- Holmes, DS and Quigley, M. 1981. Analytical Biochemistry 114:193-197