

*BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À
MEDICINA: FUNDAMENTOS TEÓRICOS E
METODOLÓGICOS*

Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças

São Paulo, fevereiro 2008

Referências utilizadas para preparação dos roteiros e elaboração das discussões sobre os métodos:

- Current Protocols in Molecular Biology

F.M. Ausubel e cols - Editora: John Wiley & Sons, Inc.

Atualizações bimensais

- Molecular Cloning - A Laboratory Manual

Sambrook - Russel 3a. Ed. - Editora: Cold Spring Harbor Laboratory Press – 2001

Imprescindível num laboratório de Biologia Molecular

Aqui voce pode encontrar todos os protocolos necessários, com excelentes explicações.

- PCR Primer - A Laboratory Manual

C.W.Dieffenbach

G.S.Dveksler

Editora: Cold Spring Harbor Laboratory Press – 2ª edição - 2003

- Nucleic Acid Hybridization - A Practical Approach

B.D.Hames & S.J. Higgins

Editora: IRL Press – 1991

- PCR - The Polymerase Chain Reaction

K.B. Mullis

F.Ferré

R. A. Gibbs

Revisado por James D. Watson

Editora: Birkhauser 1994

- PCR Applications – Protocols for Functional Genomic

Michael A. Innis

Davod H. Gelfand

John J. Sninsky

Academic Press – 1999.

- PCR – The Basics from Background to Bench

M.J. McPherson

S.G. Moller

Bios – Spring Verlag – 2000.

- PCR 2 – A Pratical Approach

M.J. McPherson

B.D. Hames

G.R. Taylor

PAS – A Pratical Approach Series

IRL Press – 1995.

- PCR Protocols

J. M. S. Bartlett

D. Stirling

Human Press – 2^a. Ed.- 2003

Soluções Básicas Utilizadas no Laboratório de Biologia Molecular:

Tris.HCl [tris(hydroxymethyl)aminomethane] - 1M

Dissolva 121g de Tris Base em 800 ml de água MiliQ

Ajuste o pH desejado com HCl concentrado

Adicione água até 1L

Autoclave

Cerca de 70 ml de HCl são necessários para pH de 7,4 ; e cerca de 42 ml para pH de 8,0.

Nota importante: O pH dos tampões com Tris muda significativamente com a temperatura, caindo cerca de 0,028 U para elevação de cada 1°C. O pH das soluções tamponadas com Tris deve ser ajustado na temperatura na qual as soluções serão usadas. Como o pK do Tris é 8,08, o tampão não deve ser usado a pH abaixo 7,2 nem acima de 9,0.

Não adicione DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) em soluções com Tris, porque o Tris inativa essa substância. Se a solução deve ser usada em experimentos com RNA, prepare-a com água previamente tratada com DEPC e autoclavada.

EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) - 0,5M (pH 8,0)

Dissolva 186,1g de Na₂EDTA.2H₂O em 700 ml de água

Ajuste o pH para 8,0 com NaOH 10M (cerca de 50 ml)

É difícil dissolver o sal. Ele só entra em solução quando o pH já está próximo de 8.

Adicione água MiliQ para 1 L.

Autoclave

TE (tampão Tris/EDTA)

10 mM Tris.HCl - pH 7,4 - 7,5 ou 8,0

1 mM EDTA

SSC (sodium chloride/sodium citrate), 20X

NaCl 3M - 175g/L

Na₃citrate.2H₂O 0,3M - 88g/L

Ajuste o pH para 7,0 com HCl 1M

TBE(Tris/Borate/EDTA) - Tampão de Eletroforese

10X - 1L de solução stock

108 g de Tris Base (890 mM)

55 g de ácido bórico (890 mM)

40 ml de EDTA 0,5M pH 8,0 (20 mM)

TAE(Tris/Acetate/EDTA) - Tampão de Eletroforese

50 X - 1L de solução stock

242 g de Tris Base

57,1 ml de ácido acético g;acial

37,2 g Na₂EDTA.2H₂O

Água MiliQ para 1 L

(TAE tem menor capacidade tamponante que TBE, porém é mais adequado quando se vai extrair DNA do gel)

NaCl - 5M

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) - 10%

Prepare todas as soluções com água da melhor qualidade possível

Destilada - Deionizada (MiliQ).

Caso as soluções sejam destinadas a uso com RNA, trate-as com DEPEC (1:1000), deixe em DEPEC até o dia seguinte e, em seguida, autoclave.

Solução com TRIS não deve ser tratada com DEPEC. Trate previamente a água com DEPEC, autoclave, e prepare a solução.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Extração de DNA:

Embora o DNA em forma de dupla fita seja muito estável e resistente a condições adversas, o DNA é vulnerável mesmo a forças leves originadas durante a pipetagem ou agitação que facilmente geram tensão na molécula e quebra das ligações fosfodiéster. A obtenção de moléculas de DNA com mais de 150 kb não é fácil. No entanto, é muito fácil extrair moléculas de DNA fragmentadas, com 50 a 100 kb.

A quantidade de DNA que se obtém usualmente a partir de 20 ml de sangue é ~250 µg.

A extração de DNA inclui basicamente os seguintes procedimentos:

1. Lise das células (citólise)
2. Purificação do DNA, separando-o de macromoléculas contaminantes, tais como proteínas e RNA, por digestão enzimática e/ou processos físico-químicos.

O local no laboratório e o material utilizados para extração de DNA devem ser separados daqueles dedicados ao manuseio de DNA clonado em plasmídeos ou outro tipo de vetor. Contaminação do DNA genômico, durante o processo de extração, com esse tipo de DNA poderá causar sérios problemas em experimentos futuros. Uma possível fonte de contaminação é o uso comum de centrífugas e banhos.

Extração de DNA de sangue:

Anticoagulante:

1 - citrato: (solução ACD)

0,48% (peso/volume) - ácido cítrico

1,32% - citrato de sódio

1,47% - glicose

Use 3,5 ml para cada ~20 ml de sangue.

2 - EDTA - pode ser usado.

A solução ACD é ideal, se o objetivo é preparar DNA genômico a partir de sangue total, pois preserva melhor moléculas de DNA de elevado peso molecular.

Tanto em citrato como em EDTA, o sangue pode ser estocado por vários dias a 0°C ou indefinidamente a -70°C, antes da extração do DNA. O sangue não deve ser coletado em heparina, pois heparina pode inibir a reação de PCR que eventualmente poderá ser realizada mais tarde. Não é um impedimento absoluto; caso a heparina esteja diluída o suficiente na amostra, a PCR pode funcionar bem.

1 - Transfira o sangue para um tubo de centrífuga e centrifugue a 1300 g por 15 minutos a 4 °C.

2 - Remova o sobrenadante. Transfira, com uma pipeta Pasteur ou ponteira P-1000, a camada superior de células, correspondente aos leucócitos, para um outro tubo. Descarte o pellet de hemácias.

3 - Centrifugue novamente a porção correspondente aos leucócitos. Remova o sobrenadante residual. Ressuspensa o pellet em 15 ml de tampão de lise.

Incube a solução a 37°C por 1 hora.

Solução de lise:

Tris-HCl, pH 8,0 - 10 mM

EDTA, pH 8,0 - 10 mM

SDS - 0,5%

RNase-DNase free - 20 µg/ml

A solução sem a RNase é preparada e deixada em temperatura ambiente. RNase é adicionada em uma alíquota só no momento do uso.

Se for sangue congelado:

1 - Descongele o sangue em um banho maria a temperatura ambiente. Adicione igual volume de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS), à temperatura ambiente.

2 - Transfira a mistura para um tubo para centrifuação. Centrifugue a 3.500g, po 15 minutos, a 4 °C.

3 - Remova o sobrenadante que contém as hemácias lisadas. Ressuspenda o pellet em 15 ml de tampão de lise.

Incube a solução a 37°C por 1 hora.

Na fase de lise é essencial que toda a amostra entre em contato com o tampão de lise. Este deve estar sempre em quantidade suficiente e a homogeneização deve ser tal que garanta realmente o contato de todas as células com o tampão de lise.

4 - Transfira o material lisado para outros tubos de centrifugação, de tal modo que ocupe apenas 1/3 do tubo.

Adicione proteinase K (20 mg/ml) a uma concentração final de 100 µg/ml. Misture delicadamente. Pode-se usar um bastão de vidro para isso.

Certifique-se de que a proteinase K é de boa procedência (genomic grade – livre de DNases e RNases), está dentro do tempo de validade e não foi estocada de forma de incorreta. O melhor é preparar a solução estoque de proteinase K (20 mg/ml) a partir do liofilizado quando for usar. Se for estocar, separe em alíquotas e guarde a –20°C.

5 - Incube em um banho maria a 50°C por 3 horas. Misture algumas vezes durante este período.

6 - Resfrie a solução até a temperatura ambiente e adicione igual volume de fenol equilibrado com Tris-HCL - 0,1 M (pH 8.0). Misture delicadamente as duas fases - para isso ponha o tubo com boca para baixo em um agitador de tubos por cerca de 10 minutos (agitação leve - não vortex). Alternativamente, inverta o tubo várias vezes, delicadamente.

É importante que o pH do fenol seja ~ 8,0. Se for mais ácido, o DNA poderá ficar na interface.

A qualidade do fenol é outro ponto crítico. Após ter sido equilibrado com Tris o fenol não pode ser estocado por anos. Ele tende a ser oxidado, e neste estado levará a quebras na cadeia de DNA, além disso, o rendimento da extração será muito ruim.

7 - Separe as fases por centrifugação a 5.000 g, 15 minutos, temp. ambiente.

8 - Com uma pipeta graduada larga, transfira o sobrenadante (que é uma solução viscosa) para um outro tubo. Faça isso delicadamente, sem perturbar a interface e sem submeter o DNA a choques mecânicos.

9 - Repita a extração com fenol por mais duas vezes.

Se for necessário obter moléculas na faixa de 150-200 kb, purifique o DNA por diálise:

- Transfira a fase aquosa do procedimento anterior para um saco de diálise. Feche o saco, deixando espaço para que o volume possa aumentar 1,5 a 2 vezes durante a diálise.
- Dialise a solução a 4 °C em 4 L de tampão de diálise. Troque o tampão 3 vezes, a cada 6 horas. Para diálise completa é necessário cerca de 24 horas.

Tampão de diálise:

Tris-HCl (pH 8,0) - 50 mM

EDTA (pH 8,0) - 10 mM

Se não for necessário DNA com tamanhos tão elevados, precipite o DNA com etanol.

10 - Adicione à fase aquosa do passo anterior (extração com fenol) 0,2 volume de acetato de amônio 10 M. Adicione 2 volumes de etanol (100%), a temperatura ambiente. Misture bem, porém delicadamente.

11 - Imediatamente se forma um precipitado de DNA. Usando uma pipeta Pasteur com ponta selada em forma de alça, remova o DNA e transfira para outro tubo.

Se o DNA já estiver muito fragmentado e não for possível pescá-lo desta maneira, centrifugue a 5.000 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente.

Despreze o sobrenadante após a centrifugação.

12 - Lave o DNA precipitado com etanol 70%. Centrifugue novamente e remova o máximo possível sobrenadante.

Deixe o tubo aberto até que se evapore todo o etanol (alguns minutos). Não deixe o pellet secar, pois será difícil dissolvê-lo.

13 - Adicione 1 ml de TE (pH 8.0) para cada 0,1 ml de células iniciais.

Deixe agitando levemente a 4 °C, até que o pellet se dissolva completamente.

Quantifique e verifique a qualidade do DNA em gel de agarose 0,6 %.

Existem numerosos protocolos para extração de DNA, das mais diversas fontes.

Os kits comerciais, com utilização de resinas, são muito convenientes e fornecem DNA de boa qualidade.

A purificação de ácidos nucleicos com fenol e clorofórmio é um procedimento rotineiro em laboratórios de biologia molecular. Descreveremos o procedimento a seguir.

Técnica de extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Fundamentos

O método mais comumente utilizado para desproteinização do DNA é a extração com fenol, que desnatura as proteínas de modo eficiente e, provavelmente, as solubiliza. O clorofórmio também é um bom desnaturante de proteínas com propriedades um pouco diferentes, que determinam maior estabilidade da interface entre o solvente e a fase aquosa; a interface fenol puro-água é bastante instável. A mistura fenol-clorofórmio reduz o volume da solução aquosa retida na fase orgânica (comparada ao fenol puro), aumentando o rendimento final. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada em vórtex, o que torna mais fácil a separação das fases orgânica e aquosa. A proteína desnaturada forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa.

Em seguida o DNA é precipitado por etanol absoluto, na presença de concentrações relativamente altas (100 a 500 mM) de um sal de cátion monovalente. Etanol depleta a camada de hidratação dos ácidos nucleicos e expõe as cargas negativas dos grupos fosfato. Contra-íons, como Na^+ se ligam, aos grupos carregados reduzindo a força repulsiva entre as cadeias polinucleotídicas, até o ponto em que possa se formar um precipitado. O precipitado se formará apenas se houver cátions monovalentes em

quantidade suficiente para neutralizar das cargas dos grupos fosfato.

A precipitação com etanol absoluto é necessária para concentrar o DNA e para remover resíduos de fenol e clorofórmio da solução aquosa desproteínizada. Como a maioria dos solutos inorgânicos e moléculas orgânicas pequenas são solúveis em etanol 70%, a lavagem do precipitado com etanol-70% irá dessalinizar o DNA de forma eficiente. Embora tanto cloreto de sódio, como acetato de sódio e acetato de amônio sejam eficazes para precipitação do DNA, é mais difícil remover NaCl, devido a sua menor solubilidade em etanol. O processo, ao final, fornece uma solução de DNA praticamente livre de eletrólitos (sais) o que será necessário quando o DNA for utilizado na presença de tampões cuja composição bem definida é fundamental para o sucesso do procedimento.

Finalmente o DNA, precipitado pelo etanol, é dissolvido em água.

Roteiro para a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Todo o processo deverá ser executado em tubos de polipropileno (leitosos). Os de poliestireno (transparentes) não resistem ao fenol-clorofórmio.

a) Adicione à solução de DNA, resultante dos processos de extração, um volume igual da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (10:10:1). Misture bem, porém gentilmente, e centrifugue por 2 a 5 min (o tempo dependerá do volume: volumes menores, tempos mais curtos).

b) Remova com cuidado a fase aquosa, que fica por cima, e a transfira para outro tubo. Se houver precipitado branco na interface repita a extração com fenol-clorofórmio-isoamil, exatamente como no passo anterior.

c) Adicione à fase aquosa, separada no passo anterior, um volume 10 vezes menor de solução de acetato sódio 3M, pH 5,2, ou volume 10 vezes menor de NaCl 5M, ou ainda igual volume de acetato de amônia 4M. O acetato de amônia favorece a precipitação de fragmentos maiores de DNA, e deve ser usado quando se quer eliminar

da amostra de DNA pequenos oligonucleotídeos (< 30 pb) que possam estar presentes¹.

c) Ao volume obtido após a adição do acetato de sódio adicione agora 2 a 2,5 volumes de etanol absoluto gelado ². Misture e incube em gelo seco por 5 min ou a -70°C por 15 minutos ou a -20°C por 30 min (esses são os tempos mínimos, sem limite para o máximo).

d) Centrifugue por 5 minutos em centrífuga com rotor de ângulo fixo, em alta velocidade de rotação (10.000 a 14.000 rpm); remova o sobrenadante.

e) Adicione 1 ml de etanol 70%. Misture invertendo a tubo várias vezes e centrifugue como no passo anterior. Se o DNA a ser precipitado for pequeno (menos de 200 pares de base) faça a lavagem do “pellet” com etanol 95%.

f) Remova o sobrenadante e seque o “pellet” de DNA

g) Dissolva o “pellet” de DNA em um volume adequado de água (a concentração deverá ser menor do que 1 mg/ml) para uso em outras manipulações enzimáticas; dissolva em TE, pH 8,0, para estocagem por por tempo indeterminado.

Desproteínização por pérolas de vidro ou por sílica-gel

A desproteínização do DNA pode ser feita também com a utilização de pérolas de vidro (“glass beads”) ou partículas de sílica-gel ativadas (5µl para até 5µg de DNA), que ligam o DNA na presença de iodeto de sódio (NaI, 6M, 3 volumes para 1 volume de solução de DNA). O DNA ligado às pérolas de vidro ou às partículas de sílica-gel é lavado com solução contendo Tris.Cl 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4, três a quatro vezes para remover proteínas, e em seguida é eluído com água ou TE pH 8.0 (0,5 µg/µl).

Referências para protocolos de extração de DNA na INERNET:

<http://www.stratagene.com/>

¹ Não use acetato de amônia quando o DNA tiver que ser fosforilado, porque o NH₄⁺ inibe a enzima T4-PNK.

² A precipitação do DNA pode ser também feita com isopropanol (2-propanol). Neste caso usa-se volume de álcool igual ao da solução aquosa. Iso pode ser vantajoso quando o volume de solução aquosa é grande e, com a adição do etanol, o volume final excede a capacidade do frasco. O isopropanol é menos volátil e, com a adição do etanol, o volume final excede a capacidade do frasco. O isopropanol é menos volátil que o etanol, levando mais tempo para evaporar. Alguns sais por serem menos solúveis em isopropanol se precipitarão juntamente com os ácidos nucleicos. Serão necessárias lavagens adicionais em etanol a 70% para a remoção dos sais contaminantes.

<http://www.promega.com/tbs>

<http://www.highveld.com/protocols.html>

<http://www.dynal.no/>

Extração de RNA

Fundamentos

A maior dificuldade no processo de extração de RNA é evitar a ação das ribonucleases (RNases). Estas enzimas são muito estáveis e não requerem cofatores para suas atividades. O primeiro passo para extração de RNA, portanto, envolve a lise das células em um ambiente químico que resulte em desnaturação de ribonucleases. Em seguida o RNA é separado de outras macromoléculas constituintes das células

Além de impedir a ação de ribonucleases provenientes das células das quais estamos extraindo o RNA, tem-se de evitar a introdução accidental de traços de RNases, de outras fontes. O uso de luvas é imprescindível, pois a pele frequentemente contém bactérias e fungos que podem contaminar a preparação de RNA e serem fontes de RNases. Evitar a contaminação com microorganismos é obrigatório quando se trabalha com RNA.

Todo material de plástico utilizado tem de ser esterilizado, livre de RNases e não deve ser reutilizado. O material de vidro deve ser muito bem lavado, (tratado com DEPEC – opcional), autoclavado e deixado em estufa a 180°C por pelo menos 8 horas ou 220°C por 2 horas. Caso os recipientes a serem utilizados sejam tratados com DEPEC, preencha-os com água contendo dietil-piromcarbonato (DEPC) a 0,1%, que é um potente inibidor de RNases. Após serem preenchidos com solução de DEPC, esses recipientes devem ser incubados a 37°C por pelo menos 2 horas, lavados várias vezes com água estéril (água-DEPC autoclavada) e aquecidos a 100°C por 15 minutos ou autoclavados. Com estes procedimentos o DEPC é removido por evaporação. Traços de DEPC indevidamente persistentes nos frascos podem modificar resíduos de purinas no RNA por carboximetilação, e, assim, interferir na tradução do RNA “in vitro”. Traços de DEPC também podem inibir algumas enzimas.

As cubas para eletroforese do RNA devem receber o seguinte tratamento:

lavagem com solução contendo detergente

enxague com água (Mili-Q)

secagem com etanol (96%)

preenchimento com solução de água oxigenada (H_2O_2) 3%. O contacto com água oxigenada deve se estender por 10 min, em temperatura ambiente. enxague repetido bem com água tratada com DEPC (0,1%) e autoclavada.

Os pipetadores devem ser reservados para uso exclusivo em preparações de RNA. Se a exclusividade não for possível, os pipetadores devem ser desmontados e tratados com um dos procedimentos acima para remoção de RNAses.

As ponteiros e tubos Eppendorfs devem ser autoclavados e sem contaminação por RNAses; não devem ser reutilizados.

A água e todas as soluções usadas para preparação de RNA devem ser tratadas previamente com DEPC (0,1%) e autoclavadas. Soluções contendo Tris não devem ser tratadas com DEPC, porque Tris reage com DEPC, inativando-o. No entanto, as soluções com Tris devem ser preparadas com água previamente tratada com DEPC e autoclavada.

A criteriosa observância dos procedimentos que evitam a contaminação com RNAase e microorganismos garante a obtenção de RNA íntegro e de boa qualidade ao final do processo de extração.

Técnicas para extração de RNA

I. Extração de RNA de células em cultura, leucócitos ou células de lavado bucal:

A técnica utiliza um detergente suave para promover a lise das células. O roteiro é o que se segue

1. Lavar as células com PBS gelado (por 3 vezes) para remover meio de cultura ou outra solução em que as células estiveram previamente. Para formar o “pellet” de células, centrifugue a 300g por 5 min. Partindo de células em cultura deve se ter um número de células em torno de 2×10^7 .
2. Ressuspender as células em 375 μl de solução de lise gelada (composição dada abaixo). Após agitação cuidadosa, mas vigorosa, a suspensão deve ficar transparente, indicando citólise.

Composição da solução para lise:

Tris.Cl 10 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

0,5% (vol/vol) Nonidet P-40

pH 8

(Prepare com água-DEPC autoclavada e filtre para esterilizar)

Se as células forem particularmente ricas em RNases, use um inibidor de RNases, o inibidor de RNase de origem placentária (RNAsin), na concentração de 1000 U/ml, ou o complexo vanadyl-ribonucleosídeo, na concentração de 10 mM.

3. Transferir as células lisadas para um tubo de microcentrífuga (1,5 ml) e centrifugue por 2 min a 4°C (14.000 rpm).

4. Transferir o sobrenadante para um outro tubo de microcentrífuga contendo 4 µl de SDS 20%. Misture em um vórtex.

(O fluido sobrenadante é o extrato citoplasmático. É levemente turvo, de cor tendendo a um branco amarelado. O “pellet”, que contém os núcleos e alguns “debris” celulares, deve ser branco e bem menor que o “pellet” de células inteiras)

5. Adicionar 2,5 µl de proteinase K (20mg/ml). Incubar por 15 minutos a 37°C.

6. Adicionar 400 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (5:1:0,04). Agitar em vórtex vigorosamente. Centrifugar por 5 min ou mais a 4°C (14.000 rpm)

(Se houver a formação de um precipitado muito espesso na interface, com escassa fase aquosa sobrenadante, centrifugar por mais alguns minutos; se ainda assim não for possível separar a fase aquosa, remover a fase orgânica (de baixo) e adicionar mais 400 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (sem fenol). Agitar em vórtex e centrifugar por 2 minutos. Transferir a fase aquosa sobrenadante para outro tubo).

7. Repetir uma vez o procedimento de extração com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico.

8. Fazer extração com 400µl de clorofórmio-álcool isoamílico. Transferir a fase aquosa sobrenadante para outro tubo.

9. Adicionar à fase aquosa obtida (cerca de 400 µl), 40 µl (1/10 do volume de material) da solução de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Acrescentar 1 ml de etanol absoluto e misturar por inversão do frasco.

10. Incubar em gelo por 30 minutos ou deixar no freezer, a -20°C durante a noite.
11. Recuperar o RNA centrifugando por 15 min a 4°C a 14.000 rpm.
12. Lavar o “pellet” com 1 ml de etanol 75%
13. Secar o “pellet” e ressuspendê-lo em um volume de 50 a 100 µl de água-DEPC autoclavada.
14. Quantificar por espectrofotometria (A_{260}).
15. Guardar o RNA em solução em freezer a -70°C .

2. Extração de RNA de células em cultura ou em tecidos

Nesta técnica as células ou tecidos são homogeneizados em meio com tiocianato de guanidina, um dos mais potentes desnaturantes de proteínas. O método se baseia na característica do RNA de permanecer na solução aquosa, contendo guanidine thiocyanate 4M, pH 4, na presença da fase orgânica fenol/clorofórmio. Neste pH baixo, a maioria das proteínas e pequenos fragmentos de DNA (5 a 10 kpb) permanecerão na fase orgânica, enquanto que os fragmentos maiores de DNA e algumas proteínas ficarão na interface. A fragmentação do DNA durante o processo de homogeneização (em geral feito com Polytron) ajuda a remover o DNA da fase aquosa.

Após a homogeneização em tiocianato de guanidina, o RNA pode também ser separado do DNA e das proteínas por centrifugação em gradiente de cloreto de cério, explorando o fato de o RNA ser mais pesado que DNA e proteínas. É uma técnica simples, com pouca manipulação da amostra, mas requer ultracentrifugação.

Técnica

Solução de tiocianato de guanidina (GIT) 4M:

GIT para 100 ml de solução: 47,26g

Citrato de Sódio 1M, pH 7.0 - 2,5 ml

Sarkosyl (N-laurylsarcosine)) - 0,5%

Completar para 100 ml com água-DEPC autoclavada

No momento do uso adicionar 8 µl/ml de BetaMercapto Etanol (BME - Sigma)

1. Adicionar 1 ml de GIT para cada 100g de tecido ou 10^7 células (cultura de células) e homogeneizar em Polytron (16.000 rpm/15 sec).
2. Adicionar 0,1 ml de acetato de sódio (2M, pH 4,0) para cada 1 ml de GIT adicionado anteriormente. Misturar muito bem. Adicionar 1 ml de fenol saturado com água (pH 4,0) para cada 1 ml de GIT, e misturar vigorosamente. Adicionar 0,2 ml (para cada 1 ml de GIT) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Misturar muito bem em vórtex e incubar essa suspensão por 15 minutos em temperatura de 0 a 4 °C.
3. Centrifugar por 20 minutos a 4 °C, 10.000 rpm (alternativamente, 5.000 rpm por 45 minutos) . Transferir a fase aquosa sobrenadante (que deve ter o mesmo volume de GIT adicionado no início) para um outro tubo.
4. Precipitar o RNA adicionando um volume igual de isopropanol 100%. Incubar a amostra por 20 min a -20°C. Centrifugar por 10 min a 4 °C, a 10.000 rpm. Desprezar o sobrenadante.
5. Dissolver o “pellet” de RNA em 0,3 ml de solução desnaturante (GIT) e transferir para um tubo Eppendorf de 1,5 ml (se já não estiver em um Eppendorf).
6. Precipitar o RNA com igual volume (0,3 ml) de isopropanol 100% (20 min a -20°C). Centrifugar novamente por 10 min a 4 °C, 10.000 rpm. Descarte o sobrenadante e seque o “pellet”.
7. Dissolver o RNA em 50-100 µl de H₂O-DEPC autoclavada. Quantificar e armazenar a -70°C.

Para verificar a pureza do RNA determinar a razão de absorbância 260/280 (260 nm para ácidos nucleicos e 280nm para proteínas), que deve ser 1,8-1,9.

Ao secar o pellet não permitir que esse seque completamente, o que dificultará muito a dissolução do RNA. Se secar exageradamente, as proteínas ainda presentes como contaminantes se dissolverão com maior facilidade que o RNA, o que resultará em baixas razões 260/280.

A água utilizada para diluir o RNA para espectrofotometria deve ter pH $\geq 7,5$. pH ácido afeta o espectro de absorção UV do RNA e diminui significativamente a razão 260/280. Ajuste o pH da água para valores levemente alcalinos adicionando Na₂HPO₄ para uma concentração final de 1 mM.

3. Extração de RNA de sangue:

1. 100 µl de sangue anticoagulado com 1 mL de tampão de lise de hemáceas.

Tampão de lise de hemáceas:

- Sacarose 1,6 M
- Triron X-100 5%
- MgCl₂ 25 mM
- Tris.HCl 60 mM - pH 7,5

2. Deixe em temperatura ambiente agitando de vez em quando até que as células vermelhas tenham sido lisadas.

3. Centrifugue por 30s a 13.000g para separar leucócitos no pellet. Remova e descarte o sobrenadante.

4. Adicione 200 µL de tampão de extração e ressuspensa o pellet aspirando e ejetando de uma seringa com agulha fina, várias vezes.

Tampão de extração:

- Guanidinium tiocianato 5,25 M
- Tris.HCl 50 mM, pH 6,4
- EDTA 20 mM
- Triton X-100 1%
- β-mercaptoethanol 0,1 M

5. Adicione 20 µL de acetato de sódio (2 M, pH 4,0) e misture por inversão.

6. Adicione 220 µL de phenol e misture por inversão.

7. Adicione 60 µL de chloroform/isoamyl alcohol (24:1) e vortex vigorosamente.

8. Ponha no gelo por 15min.

9. Centrifugue a 12.000g por 5 min e transfira a o sobrenadante para um novo tubo.

10. Adicione 200 µL de isopropanol gelado, misture e ponha no freezer a -20oC por 30 min.

11. Centrifugue a 12.000g por 15 min e descarte o sobrenadante.

12. Ressuspensa o pellet em 200 µL de tampão de extração.

13. Repita os passos de 3 a 9.
14. Lave o pellet com 400 μ L de etanol-70% gelado.
15. Centrifugue a 12.000g por 5 min e descarte o sobrenadante.
16. Remova o etanol completamente (com micropipeta e secando o restante com lenço de papel para laboratório).
17. Ressuspenda em 100 mL de H₂O (deixe a 50°C por 15 min para dissolver o pellet).

Como pode ser observado, os diferentes protocolos têm muito em comum. Certamente, você poderá fazer adaptações no protocolo dependendo dos resultados que obtiver.

Eletroforese em gel de agarose:

Sob influência de uma diferença de potencial elétrico átomos, moléculas e partículas com carga, em solução aquosa, migram na direção do eletródio com carga oposta. Como as moléculas têm cargas e massas variáveis, a migração em um meio de viscosidade definida se dará em diferentes velocidades, com separação das várias frações de uma mistura.

A mobilidade eletroforética, que é a velocidade de migração por unidade de campo elétrico, é um parâmetro característico da molécula em um determinado meio de eletroforese. Este parâmetro depende da densidade de cargas da molécula e do seu tamanho. Depende, portanto, do pK do grupo ionizável e do pH do tampão que dissolve a amostra. Como a viscosidade do gel determina o atrito, limitando a velocidade de propagação, a mobilidade eletroforética será dependente da temperatura. O que normalmente analisamos é a mobilidade eletroforética relativa da molécula, comparando-se as distâncias de migração com as de uma substância padrão, aplicada na mesma corrida eletroforética. Estas substâncias constituirão marcadores que tornam a avaliação da separação eletroforética relativamente independente de variações na diferença de potencial elétrico e do tempo de eletroforese.

As amostras para eletroforese não poderão conter partículas grandes ou gotículas de óleo em suspensão, pois estas interferem com a separação por bloquear os poros da matriz de eletroforese. Pode-se centrifugar as soluções antes de colocá-las no gel.

Separar substâncias que têm ou cargas positivas ou cargas negativas, como os ácidos nucleicos, que só têm cargas negativas, não constitui, em geral, problema. As moléculas como as proteínas cuja carga resultante depende do pH do meio terão as migrações eletroforéticas fortemente influenciadas pelo pH do tampão.

A força iônica (concentração total de íons) do tampão utilizado deve ser tão baixa quanto possível (o mínimo que garanta um pH constante), reduzindo-se, desta forma, as correntes iônicas que fluem pelo gel e a dissipação térmica excessiva (lembrar que os íons que constituem o tampão também migram eletroforéticamente, contribuindo para a corrente total). *Quem já se confundiu com os tampões, colocando na cuba de eletroforese 2 X SSC (SSC - tampão usado para Northern e Southern blot), sabe o quanto aquece o gel e do tampão.*

A voltagem deve ser 1 a 5 Volts/cm (distância entre os dois eletrodos).

Para se avaliar o progresso da separação e reconhecer o fim da corrida, corantes com alta mobilidade eletroforética são adicionados juntamente com a amostra.

A matriz do gel de eletroforese deve ter poros de tamanhos regulares e ajustáveis, deve ser quimicamente inerte. A eletro-osmose, que é o arraste do solvente pela migração eletroforética do soluto, quando os poros são pequenos, não deve ocorrer, pois alteraria a mobilidade dos íons.

Os géis de agarose, um polissarídeo extraído de algas marinhas, são adequados para separar moléculas com diâmetro igual ou superior a 10 nm. Com a remoção da agaropectina, se obtém tipos de agarose com diferentes graus de pureza e de eletrosmose. As diferentes agaroses se caracterizam pelo seu ponto de fusão (melting point), que pode variar entre 35°C e 95°C e pelo grau de eletrosmose (m_r), que depende do número de grupos polares que persistem após a purificação.

O tamanho dos poros depende da concentração de agarose. A concentração em geral é dada como peso de agarose por volume de água. Em geral, géis a 1% têm poros em torno de 150 nm e géis a 0,16% têm poros em torno de 500 nm. A agarose é dissolvida em água fervendo e forma um gel quando esfria. Durante esse processo há

formação de duplas hélices que se juntam lateralmente, de modo a formar filamentos finos. Durante a geleificação há formação de polímeros.

Eletroforese em gel de agarose é o método de escolha para separação, purificação e identificação DNA e RNA. São utilizados, para isso, géis horizontais, submarinos: o gel fica diretamente mergulhado no tampão. O nível do tampão deve ser 3 a 5 mm acima do gel. Excesso de tampão resulta em aquecimento. O gel de agarose tem menor resolução que o de acrilamida (que veremos posteriormente), mas tem uma faixa de separação maior (entre 200 pb e cerca de 50 kpb).

Coloração de ácidos nucleicos no gel de agarose:

O DNA ou o RNA podem ser facilmente visualizados pela coloração com brometo de etídeo (EthB) em baixas concentrações. O brometo de etídeo é um corante fluorescente, excitado por luz ultravioleta, que se intercala entre as fitas da dupla hélice de DNA ou de segmentos antiparalelos complementares dentro de uma mesma molécula de RNA (que é fita simples). Quando desejamos diferenciar a migração eletroforética de fragmentos de DNA parecidos, é melhor fazer a coloração do gel após amigração, porque o EthB intercalado na fitas de DNA modificam levemente a migração.

O DNA ou o RNA podem ser revelados colocando-se o gel no transiluminador com luz ultravioleta (254 nm). De 1 a 10 ng de DNA ou RNA são necessários para um sinal que se possa perceber a vista desarmada.

Justamente por se intercalar entre fitas da dupla hélice, o brometo de etídeo é um agente mutagênico e deve ser sempre manuseado com luvas, evitando-se qualquer tipo de contaminação do pesquisador. O lixo contendo brometo de etídeo também necessita tratamento especial, que comentaremos posteriormente.

Uma alternativa ao brometo de etídeo é o corante *SYBR Green I* (para DNA) e *SYBR Green II* (para RNA) - da Molecular Probes, que pode ser utilizado tanto em gel de agarose como de poliacrilamida. Este corante pode detectar até 20 pg de DNA-dupla fita e até 100 pg de RNA ou de DNA-fita simples. A excitação máxima é obtida a 497nm; em 254 nm a sensibilidade é cerca de 3 a 5 vezes menor. A emissão tem o pico em 520 nm. O que torna o SYBR green superior ao brometo de etídeo é a sensibilidade de 50 a 100 vezes maior, podendo detectar 1-2 ng de oligonucleotídeos em gel de

poliacrilamida 5% (UV/450 nm). O SYBR Green tem excepcional afinidade por DNA e apresenta um grande aumento de fluorescência após a ligação. *É muito menos mutagênico que o brometo de etídeo, mas como ainda são poucos os dados referentes a sua mutagenicidade.*

Técnica para eletroforese de DNA

Tampões:

Podem ser usados o TBE (Tris/base-Borato-EDTA) ou TAE (Tri/Acetato-EDTA). Utilizamos na rotina de nosso laboratório o TBE que tem maior capacidade tamponante.

Ao preparar as soluções de tampão use água destilada e deionizada, proveniente de um sistema de purificação tipo *Nono-Pure* ou *MiliQ*.

Solução estoque de TBE concentrada em 10 vezes (por litro):

108g de Tris base/l (890 mM)

55g de ácido bórico/l (890 mM)

40 ml de EDTA 0,5 M - pH 8,0 (20 mM)

Concentração de trabalho: diluir 10. Para gel de agarose pode-se usar diluições de 20 vezes, sem problemas. A concentração elevada da solução estoque tende a produzir precipitação dos sais. Pode-se, para evitá-la, preparar soluções estoque 5 vezes concentrado.

Solução estoque de TAE concentrada 50 vezes (para 1 l):

242g de Tris base

57,1 ml de ácido cético glacial (Tris.acetato 2M)

37,2g de Na₂EDTA.2H₂O (100 mM)

H₂O para 1 l

Concentração de trabalho: diluir 50 vezes (40 mM Tris.acetato; 2 mM Na₂EDTA.2H₂O; pH ~8,5)

TAE tem menor poder tamponante, e a capacidade de tamponamento pode se esgotar se o tempo de eletroforese for muito longo.

Preparação do gel de agarose a 1 %

1. Adicione 100 ml de TBE ou TAE a 1g de *DNA Typing Grade Agarose*.
2. Misture e aqueça no forno de micro-ondas por tempo de 1 min a 1 min e 30 seg.
3. Misture, agitando levemente o frasco, e verifique se não há fragmentos íntegros de agarose. Se houver aqueça por mais alguns segundos.
4. Coloque a agarose fundida num cilindro graduado de 100 ml e complete o volume com água (alguma água terá evaporado)
5. Retorne a agarose para o frasco anterior e adicione 5 µl de solução de Brometo de Etídeo (10mg/ml). Se for corar com SYBER Green, não execute este passo.
6. Coloque a agarose na bandeja de eletroforese previamente vedada e com o pente que formará as pocinhas onde serão colocadas as amostras de DNA.
7. Deixe esfriar.

Prepare 1 l de TBE ou TAE para cobrir o gel de agarose na cuba de eletroforese.

Preparo da amostra de DNA:

1. Separe o volume da amostra de DNA a ser colocado no gel de eletroforese (de acordo com a quantificação feita previamente)
2. Acrescente água (MilliQ-autoclavada) até o volume final desejado (por ex.: 18 µl)
3. Acrescente o “loading buffer” concentrado 10 vezes, de modo a diluí-lo para concentração de trabalho (no exemplo: 2 ul).

“Loading Buffer”:

*Para que a amostra de DNA permaneça nas poças do gel de agarose (visíveis quando se retira o pente que serve de molde), é necessário que se acrescente a ela algo que a torne mais densa que o tampão de corrida (ex: **Ficoll 400, glicerol ou sacarose**). Além disso, acrescentamos um ou dois corantes de elevada mobilidade eletroforética, que nos fornecerá informação sobre o andamento da eletroforese, indicando o momento de interrompê-la.*

Se sua banda migra junto com o corante dificultando sua visualização, dilua o "loading buffer" em glicerol-30, 1:5.

Protocolos

1- 5ml de loading buffer concentrado 10 vezes:

1 ml de EDTA 0,5 M - pH 8,0 (100 mM EDTA)

2,5 ml de glicerol (50%)

0,025g de azul de bromofenol (0,5%)

ou

2- loading buffer com TAE - concentrado 2 vezes:

2X TAE buffer pH 8,3

20 Mm EDTA

5% Ficoll 400

0,1% azul de bromofenol

Coloque a amostra no gel, sempre ao lado de um marcador de peso molecular que deve ser preparado do mesmo modo que sua amostra. Desligue a eletroforese quando o azul de bromofenol tiver percorrido cerca de 2/3 do gel ou mais.

Se tiver colocado brometo de etídeo no gel, visualise o DNA no transiluminador UV e fotografe (Polaroid, filme 667 branco e preto). Utilize uma régua transparente a UV durante a fotografia, para marcar a posição dos marcadores de peso molecular após transferência do DNA para a membrana, no passo posterior (“Southern blot”).

Se utilizar SYBR Green, dilua-o a 1:10.000 em TE (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), em TBE ou emTAE, pH entre 7,5 e 8,0 (preferencialmente 8,0). Cubra o gel com o corante diluído por 10-40 min, dependendo da espessura do gel. Remova o gel do corante, visualise o DNA no transiluminador UV (254 nm) e fotografe, ou faça o “scanning” do gel no *STORM* (Molecular Dynamic), se dispuser desse equipamento.

Quando se pretende fazer uma análise posterior dos fragmentos de DNA, separados por eletroforese, é necessário transferi-los para uma membrana (nylon) para posterior hibridização com sonda específica (ver protocolo de “Southern blot” mais adiante).

Técnica para eletroforese de RNA:

Fundamentos

Para a eletroforese de RNA o tampão usualmente utilizado é o MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid), pH 7,0 (o RNA é facilmente hidrolizado em meio alcalino). Como o objetivo mais freqüente é transferir o RNA para uma membrana (“northern-blot”), para posterior análise com sondas específicas, a eletroforese é feita em condições desnaturantes, porque embora a molécula de RNA tenha uma única fita, dupla hélice de segmentos antiparalelos complementares são freqüentes e sua persistência irá dificultar a ligação do RNA à membrana, assim como a hibridização da sonda com a molécula de RNA que está sendo analisada. O agente desnaturante mais freqüentemente utilizado é o formaldeído (embora existam outras opções, como o glioxal).

Técnica

Solução estoque de MOPS (10X):

0,4M MOPS, pH 7,0

0,1M acetato de sódio

0,1M EDTA

Preparação da solução

A 400 ml de H₂O-DEPC (autoclavada) adicione

20,9g de MOPS

8,3 ml de acetato de sódio 3M - pH 5,2 (solução tratada com DEPC e autoclavada)

Ajuste o pH para 7,0 com “pellets” de NaOH

Eleve o volume final para 500ml

Esterilize por filtração ou autoclave (se autoclavar, a solução ficará amarelada, o que é normal).

Armazene a solução protegida da luz (envolva o frasco em papel alumínio)

Gel de agarose:

1. 1,0 a 1,5 g de agarose
 2. 10 ml de 10X MOPS
 3. 87 ml de H₂O-DEPC autoclavada
 4. Dissolva a agarose, aquecendo em forno de micro-ondas
 5. Deixe esfriar em banho-maria a 50°C
 6. Adicione 5,1 ml de formaldeído a 37% (em capela para produtos químicos tóxicos)
 7. Homogenize muito bem evitando formar bolhas
 8. Coloque na bandeja de eletroforese, já com o pente, e deixe esfriar.
- (A cuba de eletroforese, a bandeja o pente devem ser previamente tratados para eliminar qualquer contaminação com RNase, como previamente descrito).*

“Loading buffer” para RNA (1 ml)

1. 0,75 ml de formamida pura (deionizada)
2. 0,15 ml de 10X MOPS
3. 0,24 ml de formaldeído 37%
4. 0,1 ml de H₂O-DEPC autoclavada
5. 0,1 ml de glicerol (autoclavado)

Preparo da amostra para eletroforese:

1. Separe as alíquotas de RNA a serem submetidas a eletroforese, de acordo com a quantificação feita previamente.
2. Se o volume for superior a 5 µl, reduza-o a 5µl no dessecador a vácuo. Se for inferior a 5 µl, complete com água para 5 µl.
3. Adicione 25 µl de “loading buffer”
4. Aqueça a 65°C por 15 min (para desnaturar) e ponha em seguida no gelo.
5. Se for corar com brometo de etídeo, acrescente à amostra 1 µl de solução de brometo de etídeo (1mg/ml) em H₂O-DEPC autoclavada. Se for corar com SYBR Green, coloque a amostra nas poças do gel, previamente coberto com tampão MOPS 1X (diluído em H₂O-DEPC autoclavada), sem a adição do brometo de etídeo.

6. Não é obrigatório o uso de marcador de peso molecular para RNA, porque como se trata de RNA total, os RNAs ribossômicos, muito abundantes, servem para indicar o tamanho das moléculas em cada posição (rRNA 28S ~ 5kb; rRNA 18S ~ 2kb).
7. Corra a eletroforese até o corante percorrer 2/3 a 3/4 da extensão do gel.
8. Visualize no transiluminador UV e fotografe (utilize uma régua transparente a UV durante a fotografia, para definir a posição das moléculas de RNA), ou
9. Core com SYBER Green II, do mesmo modo descrito para DNA. visualize no transiluminador ou faça o “scanning” no *STORM*.

Se desejar, transfira o RNA para membrana de nylon (“northern-blot”).

O gel é útil para se verificar a integridade do RNA (avaliada pelo aspecto do RNA ribossomal) que, na área de diagnóstico, quase sempre será usado para transcrição reversa e PCR (RT-PCR).

Transferência para membrana (Southern-blot):

“Southern-blotting” é a transferência de fragmentos de DNA do gel de eletroforese para uma membrana que serve de suporte. A transferência e o tratamento subsequente (secagem e exposição a luz ultravioleta) resultam em imobilização de fragmentos de DNA na membrana, de forma semi-permanente. Após a imobilização, o DNA pode ser submetido a análise por hibridização, que permite a identificação de bandas contendo moléculas de DNA similares à molécula de ácido nucleico utilizada como sonda.

Os tipos de membrana mais comumente utilizadas são as de nitrocelulose e as membranas de nylon, com ou sem cargas positivas. As membranas de nylon são mais frequentemente empregadas porque são mais resistentes, permitindo o uso sucessivo de várias sondas. A membrana de nitrocelulose, no entanto, em algumas situações pode fornecer menos “background” (ligação inespecífica da sonda).

O método básico de transferência é a transferência por capilaridade, usando um tampão com elevada concentração de sal, o que permite a ligação do DNA à membrana. Na presença de elevada concentração de sal o DNA fica preso à membrana durante a transferência, mas não de forma permanente. A imobilização permanente (ou semi-permanente) é obtida pela exposição a luz UV (membrana de nylon, com a qual o DNA estabelece ligações covalentes) ou secagem prolongada (2 horas) em forno à vácuo a 80°C (membrana de nitrocelulose, com a qual o DNA estabelece interação hidrofóbica relativamente fraca, não covalente).

O protocolo de transferência é dividido em três etapas:

1. O gel de agarose é tratado com soluções que promovem a despurinação (necessária apenas quando se pretende transferir eficientemente moléculas maiores que 5 kpb; esse procedimento remove purinas introduzindo “nicks” nas fitas de DNA), desnaturação (separação das fitas da dupla hélice, fundamental para que o DNA se ligue à membrana e à sonda) e neutralização (quando o pH do gel cai a valores menores que 9, o que é fundamental para que o DNA se ligue à membrana).
2. A segunda etapa é a transferência propriamente dita.
3. Finalmente, o DNA é imobilizado na membrana.

Despurinação: tratamento com HCl - 0,25M.

Deixe o gel mergulhado nessa solução, sob agitação leve e contínua, por 30 minutos, à temperatura ambiente (TA).

Desnaturação: tratamento com solução de NaCl 1,5M/NaOH 0,5M

Deixe o gel mergulhado nessa solução, sob agitação leve e contínua, por 20 minutos (TA)

Neutralização: tratamento com solução de NaCl 1,5M/Tris.Cl 0,5M, pH 7,0.

descarte a solução denaturante e enxague o gel com água MiliQ. Em seguida deixe o gel mergulhado na solução de neutralização por 20 minutos. Troque a solução e lave por mais 20 minutos.

A transferência propriamente dita é feita promovendo o fluxo de um tampão (20X SSC ou 10X SSC) através do gel, em direção à membrana, de modo que o fluxo dessa solução arraste as moléculas de DNA que ficam depositadas na membrana, já que não a podem atravessar (poros de 0,45 μ m). Esse fluxo é induzido aplicando-se uma camada espessa de papel absorvente sobre a membrana que está em contato com o gel (ver esquema da montagem), ou por aplicação de pressão negativa que força a passagem do tampão através do gel e da membrana.

20X SSC:

NaCl - 3 M

Na₃-citrato - 0,3 M

Ajuste o pH PARA 7,0 com 1 N HCl

Autoclave e estoque em temperatura ambiente.

A transferência por capilaridade demora de 15 a 16 horas e a transferência por pressão negativa, bem menos demorada, demanda 1 hora. Concluída a transferência, a membrana é removida após a marcação das posições correspondentes às poças do gel de agarose (assim se poderá medir a distância de migração e comparar com a fotografia do gel, que foi feita com este ao lado de uma régua), e lavada em solução 2X SSC por 5 min, para remover o excesso de sal e vestígios de agarose. Em seguida a membrana é colocada entre dois pedaços de papel de filtro (3MM-Watmann) e submetida a secagem em forno, a 80°C, por 20 minutos, para fixação por UV, ou por 2 horas, se não se usar UV. Terminado esse passo, a membrana está pronta para hibridização com uma sonda específica, e pode ser guardada por tempo indeterminado, em ambiente bem seco.

Fixação por UV: Expõe-se a membrana a 70.000 microjoules/cm² de radiação UV, 254 nm, por 2 a 3 minutos (UV crosslinker - Amersham).

Estratégias de Hibridização:

Definições importantes:

DNA com cópia única: são as seqüências de DNA que ocorrem uma só vez no genoma haplóide (na verdade, nessa definição podem estar incluídas seqüências com um número muito pequeno de cópias).

Seqüências repetidas de DNA: seqüências que ocorrem várias vezes.

Complexidade: descreve o total de seqüências diferentes em uma amostra de ácidos nucléicos; isto é, seqüências que não pareiam entre si nas condições experimentais utilizadas.

Quando se trata de RNA, complexidade tem o mesmo significado, independente da abundância de cada transcrito.

Desnaturação: separação de seqüências complementares de ácidos nucléicos.

Reassociação ou renaturação: o restabelecimento de pontes de H⁺ entre duas seqüências complementares, previamente separadas.

Estringência: se refere às condições físicas em que a desnaturação ou a renaturação ocorre. Os fatores físicos que interferem com a estringência serão discutidos adiante.

“Zippering”: descreve o fenômeno que ocorre logo após o início da reassociação. Há formação de um núcleo de reassociação seguida de rapidíssimo pareamento do restante da seqüência.

Hibridização: utilizado atualmente para descrever o pareamento de bases (formação de duplexes) entre seqüências específicas, a partir de qualquer combinação de fragmentos de ácidos nucléicos (DNA ou RNA), usualmente “in vitro”.

“Melting Temperature” (T_m): é a temperatura na qual as fitas de ácidos nucléicos que se pareiam entre si estão desnaturadas em 50%. É um parâmetro útil para avaliação da estabilidade da dupla-fita (seja DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA).

Fatores que afetam a velocidade de reassociação

1. Temperatura: a velocidade máxima é alcançada a cerca de 25°C abaixo do T_m.
2. Concentração do sal: em concentração NaCl abaixo de 0,1 M, um aumento de 2 vezes na concentração aumenta a velocidade de reassociação entre 5 e 10 vezes. A velocidade

continua a subir até concentração de sal de cerca de 1,2 M, que corresponde a cerca de 7 vezes a concentração numa situação padrão. Cátions divalentes, que estão frequentemente presentes como impurezas nas soluções, têm um efeito muito mais intenso que os cátions monovalentes, tornando necessário o uso de EDTA como quelante em situações em que se deseja uma “estringência” elevada.

3. Pareamentos imperfeitos (“mismatch”): para cada 10% de pareamentos imperfeitos a velocidade de reassociação é reduzida de um fator de aprox. 2 vezes, quando a reação ocorre em temperaturas 25°C abaixo do T_m .

4. Comprimento do fragmento:

4.1. *Reassociação de DNA-DNA*: a velocidade de “zippering” é muito rápida quando comparada à velocidade de formação do pareamento inicial (nucleação). Se os fragmentos complementares são do mesmo tamanho, a velocidade de reassociação se eleva com a raiz quadrada do comprimento (número de bases), relação válida para fragmentos entre 100 e 100.000 pb. Isso aparentemente se relaciona com o maior número de possibilidades de nucleação, contrabalançado pela maior restrição espacial oferecida pelos fragmentos maiores. Quando os dois fragmentos são de tamanhos diferentes, o efeito do comprimento sobre a velocidade de reassociação depende de qual fragmento está presente em excesso. Se fragmento em excesso é o curto, a velocidade de reassociação aumenta com o tamanho do fragmento escasso. Se ocorre o contrário, há uma inesperada redução na velocidade de reassociação.

4.2. *Reassociação de RNA-DNA*: na reação com excesso de DNA, a velocidade de reassociação é cerca de 4 a 5 vezes menor do que a da interação DNA-DNA.

5. Viscosidade: quando se considera o efeito da viscosidade, deve-se distinguir entre viscosidade microscópica e macroscópica. Viscosidade microscópica se refere ao micro ambiente em torno do DNA e é comumente alterada pela adição de sacarose, glicerol ou perclorato de sódio. A macroviscosidade depende da presença de polímeros (entre eles o próprio DNA). A viscosidade, medida em viscosímetro, inclui ambas, a micro e a macroviscosidade. Na presença de sacarose, glicerol, etilenoglicol e perclorato de sódio, a velocidade de reassociação do DNA é inversamente proporcional à viscosidade. O aumento da macroviscosidade (presença de ficoll ou dextran sulfato), por outro lado, aumenta a velocidade de reassociação, porque provoca um aumento efetivo na

concentração de ácido nucleico em solução.

6. Composição de bases: praticamente não tem efeito sobre a velocidade da reassociação.

7. Agentes desnaturantes: em solução aquosa, a velocidade ideal de reassociação de ácidos nucleicos ocorre em temperaturas entre 60°C e 75°C. No entanto, extensos períodos de incubação nessas temperaturas podem levar a considerável quebra das moléculas de ácidos nucleicos, por agitação térmica. Para reduzir a temperatura, mantendo a estrringência, pode-se introduzir agentes desnaturantes, como a formamida, que desestabilizam a dupla hélice, o que reduz a velocidade de reassociação. Adição de 1% de formamida reduz o T_m em 0,72 °C e a velocidade de reassociação em cerca de 1,1%. A redução na velocidade de reassociação se deve a aumento da microviscosidade. A comparação da taxa de degradação de DNA observada em solução aquosa, em temperatura elevada, com a observada com formamida a baixa temperatura, mostra que a redução na degradação compensa, em muito, a redução na velocidade de renaturação. Para híbridos RNA-DNA a relação entre concentração de formamida e redução no T_m não é linear. Na presença de formamida 50%, a estabilidade do híbrido RNA-DNA é maior que a da dupla hélice de DNA. Essa é uma vantagem que pode ser explorada em técnicas de microscopia, nas quais se pretende a pareamento “in situ” com RNA mas não com DNA.

Fatores que interferem com a estabilidade da dupla hélice

1. Pareamentos imperfeitos (mismatch): 1% de “mismatch” reduz a estabilidade térmica em cerca de 1°C (avaliado pelo T_m).

2. Comprimento do fragmento: Quanto maior o fragmento, maior a estabilidade da dupla hélice.

3. Concentração de sal: na faixa de concentração de 0,01-0,1M, o T_m muda cerca de 16°C para cada 10 vezes de variação na concentração de sal. O efeito é menor em concentrações mais elevadas (1M). Os cátion divalentes têm um efeito muito mais intenso que os monovalentes sobre o T_m .

4. Composição das bases: como o pareamento GC é mais estável (3 pontes de H) que o pareamento AT (2 pontes de H), o T_m de uma dupla-hélice está relacionado com conteúdo de GC de acordo com a equação empírica:

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 69,3$$

O efeito da composição das bases, no entanto, pode ser eliminado na presença de alguns solventes caotrópicos (por exemplo, o: cloreto de tetrametilamônio 2,4 M).

5. “Criterion”: essa palavra descreve o limite mínimo de fidelidade do pareamento de bases e comprimento da duplex, estabelecido pelas condições de incubação. Na presença de tetrametilamônio, situação em que variações no T_m , decorrentes da composição das bases, são eliminadas, o “criterion” pode ser definido com precisão de 1°C.

A temperatura de incubação (T_i) para a hibridização ideal de uma sonda pode ser calculada pela equação empírica:

$$T_i = T_m - 15^\circ\text{C}$$

$$T_m = 16,6 \log[M] + 0,41[P_{gc}] + 81,5 - P_m - B/L - 0,65[P_f]$$

Onde:

M - é concentração molar de Na^+ , até um máximo de 0,5M (1 X SSC contém 0,165M de Na^+)

P_{gc} - é a porcentagem de bases G e C na sonda

P_m - é a porcentagem de “mismatched bases”

P_f - é a porcentagem de formamida

B - é 675 para sondas de até 100 bases

L - é o comprimento da sonda em número de bases

Obviamente, essa fórmula serve como uma orientação inicial, não substituindo o teste empírico, no laboratório.

Marcação de ácidos nucleicos a serem utilizados como sondas:

Marcação com isótopo radioativo:

Escolha do isótopo:

- ^{32}P : meia-vida: 14,3 dias
 tipo de decaimento: beta
 energia: alta
- ^{33}P : meia vida:
 tipo de decaimento: beta
 energia: média
- ^{35}S : meia vida - ~75 dias
 tipo de decaimento: beta
 energia: baixa
- ^{125}I : meia-vida - 60 dias
 tipo de decaimento: gama
 energia: média
- ^3H : meia-vida: 12,35 anos
 tipo de decaimento: beta
 energia: baixa

Métodos de marcação:

1- “*Nick-translation*”:

Esse processo utiliza DNAase I para gerar quebras (“nicks”) em cada fita da dupla fita de DNA. As ações de exonuclease 5'→3' e de polimerase 5'→3' da DNA polimerase I de *E. coli* são usadas para remover trechos de DNA a partir das quebras e substituí-los por segmentos de DNA-fita única, marcados pela incorporação de desoxirribonucleotídeos com átomos radioativos. Pode-se utilizar qualquer desoxirribonucleotídeo marcado com ^{32}P , ^{35}S na posição alfa. Nucleotídeos marcados ^{125}I , ^3H ou biotina também podem ser incorporados.

2- *Random oligonucleotide-primed labelling*

3- *Marcação com T4 DNA polimerase:*

A T4 DNA polimerase possui atividade de exonuclease 3'→5' e atividade de polimerase 5'→3'. Na ausência de fosfato de desoxirribonucleosídeos exógenos verifica-se apenas a atividade de exonuclease que, em condições normais (temperatura e tampão adequados), remove cerca de 25 nucleotídeos/min. Quando os nucleotídeos são adicionados, a atividade de polimerase predomina, e a extremidade previamente removida é preenchida, agora com um ou mais desoxirribonucleotídeos marcados.

4- *Marcação da extremidade com T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK):*

A polinucleotídeo quinase é usada para transferir o fosfato gama do ATP para o grupo 5'OH livre na extremidade da molécula de DNA ou RNA. Essa enzima tem também uma atividade fosfatásica. Duas reações são, portanto, possíveis: a) “forward reaction” em que a enzima cataliza a fosforilação, após remoção do fosfato do terminal 5' com fosfatase alcalina, e b) “exchange reaction” em que a enzima cataliza a troca de um fosfato 5' previamente existente pelo fosfato gama do ATP. A reação de troca tem que ser realizada na presença de excesso de ATP e ADP, para que se consiga uma fosforilação adequada. Ambas as reações são mais eficientes quando o DNA tem extremidade 5' “protusa”. A extremidade 5' “recuada” é fosforilada com muito menor eficiência. Extremidades “rombas” (“blunt”) são marcadas com eficiência intermediária.

O RNA é mais eficientemente marcado pela T4 PNK após clivagem da base com NaOH.

5- *Marcação da extremidade com desoxinucleotídeo transferase terminal (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase - TDT)*

Essa enzima adiciona desoxinucleotídeos na extremidade 3' dos fragmentos de DNA. Tanto DNA-fita dupla como DNA-fita única são substratos, na presença de cobalto como co-fator. Até mesmo a extremidade 3' “recuada” é substrato. Para evitar a formação de caudas de homopolímeros com comprimento variável pode-se usar um análogo do nucleotídeo que tenha o oxigênio do grupo 3'OH removido (alfa³²P-cordycepin trifosfato).

6- *Marcação da extremidade com o fragmento grande da DNA polimerase I de E. coli (Klenow fragment)*

O fragmento Klenow da DNA polimerase I de E. coli, que tem atividade de polimerase 5' → 3', pode ser usada para preencher extremidades 3' recuadas, que ocorram naturalmente, ou que foram geradas por enzimas de restrição, tornando a extremidade romba. Para isso se usa um ou mais dos desoxirribonucleotídeos marcados a serem incorporados.

7- *Uso de exonuclease III para criar extremidades 5' protusas (ou 3' recuadas):*

É uma alternativa à utilização de T4 DNA polimerase.

Sistemas especiais de clonagem para marcação de ácidos nucleicos com alta atividade específica:

1- Sonda universal com plasmídeo M13:

O DNA a ser utilizado como sonda deve ser clonado nas séries pares dos vetores M13 (por ex.: M13mp8), pelas técnicas usuais de clonagem em plasmídeo.. Um oligonucleotídeo de 13 mer (5' GAAATTGTTATCC 3'), complementar a um segmento do plasmídeo, localizado na região 5' que flanqueia o sítio de múltiplos pontos de clonagem deste ("multiple cloning site"), é usado como "primer" universal para síntese da fita marcada complementar (fita (-)) à sequência da fita (+) do plasmídeo, feita pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I de E. coli. A síntese da fita minus (-) não é completa, de tal modo que a inserção específica no sítio de clonagem permanece como fita única, e, portanto, disponível para a hibridização com a sequência complementar que se deseja localizar.

2 - Sistema utilizando T3 e T7 RNA polimerase ou SP6 RNA polimerase

O fragmento de DNA a ser utilizado como sonda é inserido no vetor plasmídeo SP6, derivado do pBR322, no qual foi inserido o gene da RNA polimerase SP6 (fago de Samonella) e seu promotor. Algumas bases adiante do promotor está o múltiplo sítio de clonagem, onde é inserido o DNA de interesse.

Outra possibilidade, mais versátil que a anterior devido à existências de dois promotores, é a inserção do segmento de interesse no plasmídeo Blue Script, cujo múltiplo sítio de clonagem é flanqueado pelos promotores das RNA polimerases T3 e T7.

Uma vez inserido o fragmento de DNA que servirá como sonda, o plasmídeo é linearizado, utilizando uma enzima de restrição que corte imediatamente após, ou bem na extremidade da sequência específica clonada, e em seguida porcede-se à síntese do RNA complementar, marcado com [alfa ^{32}P]rNTP.

Esse sistema porque fornece uma grande quantidade de transcrito marcado (até 10 µg para cada 1 µg de “template”), com elevada atividade específica. O inconveniente é a instabilidade do RNA. A sonda deve ser tratada com todos cuidados dispensados ao manuseio de moléculas de RNA. Não se presta também a hibridização “in situ”, devido à facilidade de degradação.

Marcação não radioativa de ácidos nucleicos:

Essas sondas eliminam os cuidados relacionados ao uso de radioisótopos e têm a vantagem adicional de serem estáveis, podendo ser estocadas por períodos de 6 meses a 2 anos.

Embora vários tipos de marcadores não radioativos tenham sido descritos na literatura, a biotina (GIBCO-BRL e outros) e digoxigenina (Boehringer Mannheim) são os mais comumente utilizados e estão disponíveis comercialmente. Ambos podem ser facilmente incorporados em sondas de DNA e ser detectados com os sistemas de detecção que comentaremos em seguida.

Os desoxinucleotídeos marcados com biotina podem ser detectados por complexos contendo avidina ou streptavidina, moléculas que apresentam alta afinidade por biotina. A avidina é uma glicoproteína (68.000 Da) derivada da clara do ovo, e a streptavidina é uma proteína (60.000 Da) do *Streptomyces avidinii*. A avidina ou a streptavidina podem estar ligadas a uma enzima, como a fosfatase alcalina, podendo esta ser detectada pela adição de um substrato que resulte em um produto colorido, insolúvel. O sistema de detecção pode envolver, alternativamente, a utilização de um anticorpo

anti-biotina, anti-avidina, anti-streptavidina, ou ainda anti-digoxigenina, seguida de um anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo ou a uma enzima.

Quando se usa anticorpo anti-biotina, o bloqueio da membrana não pode ser feito com leite desnatado, porque este contém biotina e causará intenso “background”.

DNA a ser marcado pode ser um fragmento isolado, ou, como nas sondas para hibridização “in situ”, um clone no fago, cosmídeo ou plasmídeo intacto.

Sondas Biotiniladas:

A incorporação de nucleotídeos biotinilados (bio-11-UTP ou bio-16-UTP no lugar de dTTP e bio-14-dATP no lugar de dATP) é feita através das técnicas previamente discutidas para marcação de ácidos nucleicos com isótopos radioativos. Os métodos comumente empregados são “nick-translation” ou síntese com oligonucleotídeos aleatórios biotinilados na extremidade 5’ (“random primed labelling”).

A Biotina é uma vitamina hidrossolúvel, que pode ser covalentemente ligada à posição C5 do anel pirimidínico por meio de um “linker” alilamina: bio-11-dUTP, ou bio-16-dUTP, no lugar de dTTP e bio-14-dATP no lugar de dATP (os números referem-se ao número de grupos CH₂ presente no “linker”). O “linker” propicia uma distância razoável entre a biotina e a base marcada, o que diminui a restrição espacial decorrente da presença da biotina.

A técnica de “Nick Translation” resulta em incorporação”, em condições normais, de cerca de 50 nucleotídeos biotinilados por cada 1000 pb.

Para “Random Primed Labelling” com oligonucleotídeos não biotinilados normalmente se usam hexâmeros. Com oligonucleotídeos biotinilados são usados octâmeros, pois a adição de mais dois nucleotídeos é necessária para a estabilização do “annealing”, devido à instabilidade decorrente da restrição espacial dada pela biotina na posição 5’ terminal. Nesse último método, é comum adicionar-se à reação de síntese pelo menos um desoxinucleotídeo biotinilado (bio-16-dUTP, por ex.), para aumentar a eficiência da marcação. O DNA que serve de “template” (com 200 pb ou mais) tem que estar linearizado e removido do vetor onde foi clonado, para maior eficiência. Podem ser marcados de 25ng a 2 µg de DNA, mas a eficiência da marcação é maior com 25 a 50ng de DNA.

Digoxigenina-11-dUTP também pode ser incorporada ao DNA tanto por “Nick Translation” como por “random oligonucleotide primed synthesis”. Os protocolos são basicamente os mesmos utilizados para marcação com biotina.

Essas sondas podem ser manuseadas normalmente, evitando-se apenas extração com fenol e desnaturação alcalina (a desnaturação deve ser feita pela incubação em temperatura elevada, seguida de transferência imediata da sonda para o gelo).

Deteção por método colorimétrico:

A biotina é detectada através de incubação com avidina ou streptavidina, ou ainda com um anticorpo anti-biotina, quimicamente acoplados a uma enzima que cataliza uma reação cujos produtos podem ser quantificados por colorimetria (fosfatase, luciferase, peroxidase).

Um exemplo de sistema de detecção é a streptoavidina conjugada a fosfatase alcalina, que se liga fortemente à biotina e é visualizada quando se adiciona um substrato da fosfatase alcalina que produz um precipitado colorido (NBT/BICP - nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate). O limite mínimo de detecção com esse método colorimétrico é cerca de 2 pg de DNA.

Deteção por quimiluminescência:

O advento de técnicas de quimiluminescência e de fluorescência tem tornado essas sondas quase tão sensíveis quanto as marcadas com isótopos radioativos (métodos de detecção com quimiluminescência são cerca de 5000 vezes mais sensíveis que os colorimétricos).

A fosfatase alcalina reage com um substrato quimiluminescente que resulta na detecção altamente sensível do DNA alvo. O substrato fluorescente é o *DIOXETANE*. Este é clivado pela fosfatase alcalina o que resulta na emissão localizada de luz que pode ser detectada por um filme de raio-X.

Os sistemas comerciais são vários, mas o princípio é o mesmo em todos eles. O fragmento de DNA marcado com biotina, após hibridização com a sequência alvo imobilizada em membrana de nylon, é ligado a fosfatase alcalina biotinilada e, em seguida exposto, ao substrato de detecção.

Outra possibilidade é a utilização de sondas de ácidos nucleicos marcadas com a própria fosfatase alcalina (*ACES* - GIBCO/BRL). Nesse caso, após a hibridização da sonda, passa-se diretamente ao sistema de detecção (*LUMI-PHOS PLUS* - GIBCO/BRL).

A detecção com quimiluminescência deve ser feita em membrana de nylon. Membranas de nitrocelulose não são indicadas, porque estas promovem o esmaecimento do sinal luminoso (“quenching”).

Sondas marcadas com substâncias fluorescentes - detecção por fluorescência e quimi fluorescência:

Para síntese se sondas fluorescentes, se utiliza um desoxinucleotídeo marcado com fluoresceína (ex.: fluoresceína-11-dUTP - Fl-dUTP). O sistema de marcação pode ser “Nick Translation” ou “Radom Primed Labelling”. O sistema comercialmente disponível até o momento é por “Random Primed Labelling” (*Vistra Florescence* - AMERSHAM). São utilizados monômeros aleatórios como “primers” para a reação de síntese da fita marcada pela Klenow DNA-polimerase. A sonda sintetizada (com rendimento de cerca de 7ng/μl por 25ng de DNA-template) pode ser estocada a -20°C por 6 meses ou mais.

Após a hibridização, a detecção pode ser feita imediatamente, sem amplificação do sinal, em FluorImager (ex.: *STORM* - Molecular Dynamics). Se for necessário, a membrana pode ser tratada com reagentes que amplificam o sinal. O sistema de amplificação consiste de um anticorpo anti-fluoresceína conjugado a fosfatase alcalina. Após a ligação do anticorpo, adiciona-se o substrato da fosfatase alcalina (*AttoPhos* reagent - Amersham - fosfato orgânico aromático, cuja estrutura é confidencial), podendo a membrana ser submetida a “scanning” em FluorImager. Embora o sinal mais intenso seja observado 24 horas após a adição do substrato, após 1 a detecção já é possível.