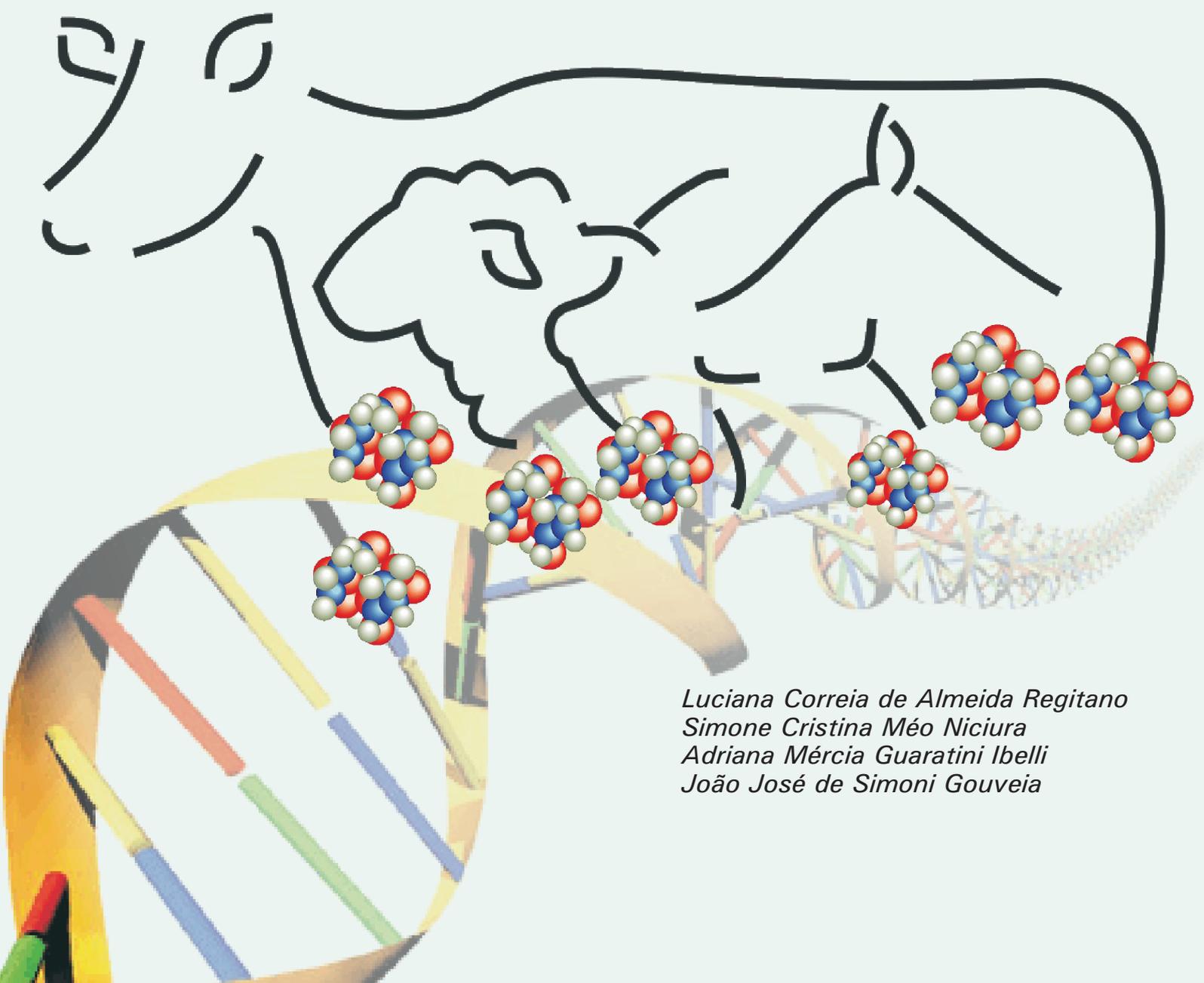


PROTÓCOLOS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL



*Luciana Correia de Almeida Regitano
Simone Cristina Méo Niciura
Adriana Mércia Guaratini Ibelli
João José de Simoni Gouveia*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal

Editores

*Luciana Correia de Almeida Regitano
Simone Cristina Méo Niciura
Adriana Mércia Guaratini Ibelli
João José de Simoni Gouveia*

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2007

Embrapa Pecuária Sudeste

Rodovia Washington Luiz, km 234
Caixa Postal 339 – CEP – 13560-970 - São Carlos, SP
Fone: (16) 3361-5611
Fax: (16) 3361-5754
Home page: <http://www.cppse.embrapa.br>
Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi
Secretário-Executivo: Edison Beno Pott
Membros: Carlos Eduardo Silva Santos, Maria Cristina Campanelli Brito,
Odo Primavesi, Sônia Borges de Alencar

Revisor de texto: Edison Beno Pott
Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar
Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

1ª edição on-line 2007

Todos os direitos reservados.

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP
Embrapa Pecuária Sudeste**

Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal
[recurso eletrônico]. / Luciana Correia de Almeida Regitano [et al.] –
São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

Modo de Acesso:

<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/e-books/LVProtocolos.pdf>

Publicações gratuitas (acesso em 21/12/2007)

Disponível também em CD-ROM (250 exemplares)

ISBN: 978-85-86764-19-6

1. Protocolos – Biologia molecular – Produção animal. I. Niciura, Simone Cristina de M. Ibelli, Adriana Mércia G. III Gouveia, João José de S. IV. Título.

CDD: 572.8

© Embrapa 2007

Autores

Luciana Correia de Almeida Regitano

Médica Veterinária, Dra., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: luciana@cppse.embrapa.br

Simone Cristina Méo Niciura

Médica Veterinária, Dra., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: simone@cppse.embrapa.br

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Bióloga, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: adriana.ibelli@gmail.com

João José de Simoni Gouveia

Médico Veterinário, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: jjsgouveia@gmail.com

Gisele Batista Veneroni

Bióloga, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: giseleveneroni@yahoo.com.br

Gustavo Gasparin

Biólogo, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, São Carlos, SP.

Endereço eletrônico: gustavo_gasparin@yahoo.com.br

ÍNDICE

1. <u>Regras de segurança no laboratório</u>.....	1
<i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
2. <u>Extração de DNA</u>	3
<i>João José de Simoni Gouveia</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
3. <u>Extração de RNA</u>	9
<i>Adriana Mércia Guaratini Ibelli</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i> <i>Simone Cristina Méo</i>	
4. <u>Quantificação em espectrofotômetro</u>	12
<i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
5. <u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u>	14
<i>Adelita Carolina Santiago</i> <i>Gisele Batista Veneroni</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
6. <u>Enzimas de restrição</u>	18
<i>Gisele Batista Veneroni</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
7. <u>Eletroforese de ácidos nucléicos</u>	22
<i>João José de Simoni Gouveia</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	
8. <u>Seqüenciamento</u>	31
<i>Kerli Ninov</i> <i>Lilian Giotto Zaros</i>	
9. <u>Síntese de DNA complementar (cDNA)</u>	38
<i>Adriana Mércia Guaratini Ibelli</i> <i>Luciana Correia de Almeida Regitano</i>	

10. <u>PCR quantitativo em tempo real</u>	42
<i>Helena Javiel Alves</i>	
11. <u>Mapeamento de QTLs – QTL Express</u>	49
<i>Millor Fernandes do Rosário</i> <i>Kátia Nones</i>	
12. <u>Arranjos de DNA</u>	55
<i>Erika Cristina Jorge</i> <i>Luiz Lehman Coutinho</i>	
13. <u>Preparo de Soluções</u>	61
Referências	64

1. REGRAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIOS

Luciana Correia de Almeida Regitano

Segurança é a prioridade “número um” em qualquer laboratório químico.

É importante conhecer sempre o laboratório como um ambiente global de trabalho experimental.

Já no início deve-se familiarizar com todo equipamento de segurança disponível no laboratório, sabendo onde encontrá-lo e como utilizá-lo:

- lava-olhos;
- chuveiro de emergência;
- extintores;
- saídas de emergência;

Muitas regras de segurança envolvem apenas bom “senso”:

- não tocar em itens quentes;
- não comer, nem beber no laboratório;
- não fumar dentro do laboratório;
- não fazer brincadeiras;

O uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) é obrigatório, assim como o uso de capela de exaustão em caso de solventes.

Manter vidrarias sempre em condições adequadas de trabalho.

Manter as soluções sempre identificadas e com os cuidados a serem tomados em caso de acidentes.

Manter os frascos de reagentes sempre limpos, sem respingos para manter uma boa condição de uso dos técnicos e estagiários.

Usar sempre óculos de segurança e avental de preferências de algodão e mangas longas.

Não use saias, bermudas, ou calçados abertos.

Pessoas de cabelos longos, mantê-los sempre preso.

Não trabalhe sozinho, principalmente fora do horário de expediente.

Lave bem as mãos ao deixar o laboratório

Ao executar qualquer experimento esteja consciente de como proceder e os cuidados.

Leia atentamente o protocolo até o fim, verificando se compreendeu todos os procedimentos e se possui todo o material necessário.

Nunca brinque no laboratório.

Certifique-se da tensão de trabalho da aparelhagem antes de conectá-lo à rede elétrica. Quando não estiverem em uso, os aparelhos devem ficar desconectados.

Não use nenhum equipamento para o qual não tenha sido autorizado ou treinado a utilizar.

Respeite seus amigos de trabalho, não os distraindo com conversas paralelas.

Caso perceba algo diferente ou mesmo anormal, recorra ao técnico responsável, para tirar suas dúvidas.

2. EXTRAÇÃO DE DNA

João José de Simoni Gouveia

Luciana Correia de Almeida Regitano

A extração dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Pode-se obter DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos para realização de tal procedimento. A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de diversos fatores como: tipo de tecido a ser utilizado, grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será utilizado (PCR, seqüenciamento, clonagem gênica, etc.) (Bartlett, 2003).

O primeiro relato sobre isolamento de DNA data de 1869 e foi realizado por Friedrich Miescher, a partir de leucócitos presentes em pus. Miescher lisou estas células com uma solução alcalina e precipitou o material nuclear com solução salina. Este material nuclear que posteriormente seria conhecido como DNA, foi chamado de nucleína (<http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/historico2004.pdf>, <http://www.dnai.org>).

Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira etapa é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares (e conseqüente exteriorização do DNA). A segunda fase consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (restos de membrana, proteínas, RNA) (Romano, 1999).

O rompimento das membranas celulares geralmente é feito com detergentes (SDS ou CTAB). A utilização de agentes caotrópicos como o tiocianato de guanidina

impede o DNA de se ligar nas outras moléculas, facilitando sua separação na segunda fase do processo. Após esta fase, deve-se separar o DNA dos outros componentes celulares. Isto é feito por meio da adição de substâncias que façam com que a solução torne-se heterogênea e que o DNA fique dissolvido em apenas uma das fases, como por exemplo, quando se utiliza fenol para desnaturar as proteínas, ficando o DNA na fase aquosa e as proteínas na interface entre as fases orgânica e aquosa. Uma alternativa à utilização dos solventes orgânicos como o fenol é fazer a separação das proteínas utilizando altas concentrações de sal (*salting-out*). Após separar o DNA dos outros componentes celulares, pode-se proceder uma precipitação do DNA para garantir a máxima pureza do material, esta precipitação geralmente faz-se utilizando álcool (etanol ou isopropanol) que, em presença de cátions monovalentes, promove uma transição estrutural na molécula de ácido nucléico, resultando em agregação e precipitação (Regitano, 2001; Azevedo, 2003; <http://www.etall.hpg.ig.com.br/cursopcr.html>).

Os protocolos abordados neste capítulo são utilizados na rotina do laboratório de Biotecnologia Animal do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste e são adaptações dos protocolos descritos em Regitano (2001).

O objetivo deste capítulo é fazer com que o aluno entenda os princípios deste processo, a finalidade de cada reagente em um protocolo de extração de DNA e, a partir daí, possa utilizar e adaptar os protocolos já existentes de acordo com sua necessidade e disponibilidade de reagentes.

2.1. Extração de DNA de Leucócitos

A) Obtenção de Leucócitos

1. Coletar 5mL de sangue em tubos contendo EDTA potássico [50µL de EDTA(K₃) a 15%]

O EDTA é uma substância anticoagulante. Existem outras substâncias com esta finalidade (citrato e heparina), porém se o DNA for utilizado para PCR não se deve utilizar heparina, pois esta substância interfere na atividade da enzima Taq DNA polimerase.

2. Transferir 2,5 mL do sangue para um tubo Falcon de 15mL

3. Adicionar 10mL de Solução A e vortexar até homogeneizar

4. Centrifugar por 10 min a 700 xg

5. Dispensar o sobrenadante

6. Ressuspender o pellet em 5mL de Solução A

7. Vortexar até dissolver completamente o pellet

8. Centrifugar por 10 min a 700 xg

9. Repetir os passos 4 – 9 até obter somente as células brancas (o pellet deve estar branco cremoso).

Resíduos de hemoglobina inibem a reação de PCR

10. Ressuspender o pellet em 500µL de Solução A e transferir para microtubos de 1,5mL

11. Centrifugar 5 min a 16.000 xg e descartar o sobrenadante.

As células brancas assim preparadas podem ser armazenadas entre -20°C e -80°C

B) Extração e purificação do DNA

1. Ressuspender o pellet em 500µL de Solução B
2. Vortexar até o pellet desprender do fundo do tubo
3. Incubar a 55°C por 4-6 horas (ou *overnight*). Vortexar periodicamente durante a incubação para que a dissolução do pellet seja completa

A Solução B contém Tris HCl (pH 8,0) que é uma solução tampão, cuja finalidade é manter o pH constante. Como o pH ótimo para a ação de DNases endógenas é por volta de 7,0, este reagente ajuda a evitar a ação destas nucleases. O SDS é um detergente iônico forte, cuja função é romper as membranas celulares, o EDTA age quelando íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (que são co-fatores de diversas enzimas nucleares como as DNases) e a proteinase K hidrolisa as proteínas.

Se houver disponibilidade de um bloco aquecido com agitador (termomixer), deve-se deixar as amostras agitando durante a incubação.

4. Adicionar 210µL de TE (pH 7,6) e 240µL de NaCl 5M

O NaCl fará com que as proteínas precipitem por excesso de íons. O TE é um tampão.

5. Agitar os tubos por inversão até formar pequenos coágulos
6. Incubar em gelo por 10 min
7. Centrifugar por 15 min a 16.000xg

8. Recolher o sobrenadante dividindo-o em dois microtubos de 1,5mL limpos (máximo de 500µL de sobrenadante por tubo)
9. Adicionar 1mL de etanol 100% (absoluto) gelado em cada tubo e misturar por inversão

É fundamental que o volume de etanol corresponda à, no mínimo, 02 vezes o volume da solução para que a precipitação do DNA seja eficiente. Alternativamente, pode-se utilizar 01 volume de isopropanol à temperatura ambiente.

O Álcool torna o meio muito hidrofóbico para o DNA, fazendo com que ele precipite sobre sua própria estrutura.

10. Centrifugar por 15 min a 16.000xg
11. Descartar o sobrenadante
12. Secar em papel
13. Adicionar 500µL de etanol 70% gelado

O álcool 100% faz com que precipitem muitos sais juntamente com o DNA, além de dificultar a ressuspensão do DNA, por isso utiliza-se uma “lavagem” com álcool 70%.

14. Centrifugar por 5 min a 16.000xg
15. Descartar o etanol e secar o pellet
16. Adicionar 250µL de TE+RNase (10µg de RNase por mL de amostra) e incubar por 1h a 37°C

Este protocolo isola juntamente com o DNA uma quantidade considerável de RNA, por isso o tratamento com RNase se faz necessário para remover este contaminante.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE UTILIZANDO O KIT GFX

Márcia Cristina de Sena Oliveira

1. Colocar 300 μ L de sangue e 900 μ L de solução de lise em microtubo de 1,5 mL
2. Homogeneizar, centrifugar a 21.000 xg por 5 minutos e descartar o sobrenadante
3. Homogeneizar e adicionar 500 μ L de solução de extração
4. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente e transferir o conteúdo do tubo para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor
5. Centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto
6. Adicionar à coluna 500 μ L de solução de extração e centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto
7. Adicionar à coluna 500 μ L de solução de lavagem e centrifugar a 21.000 xg por 3 minutos
8. Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL, limpo e livre de DNases
9. Adicionar 100 μ L de água bidestilada, autoclavada e aquecida a 70°C. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto

3. EXTRAÇÃO DE RNA

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Luciana Correia de Almeida Regitano

Simone Cristina Méo

A análise do RNA pode fornecer informações importantes sobre expressão gênica. Para que isto seja possível, é necessário que seja feita uma purificação eficaz do RNA, mantendo sua integridade e qualidade.

Os métodos para isolamento de RNA baseiam-se na lise e na desnaturação das células que permitem a liberação dos ácidos nucléicos totais e na presença de inibidores que impedem a ação de ribonucleases (RNAses) (Ausubel, 1987).

A principal dificuldade na extração de RNA é a presença de grande quantidade de ribonucleases (RNAses) estáveis e ativas nos tecidos, que permitem que o RNA (altamente instável) seja rapidamente degradado. Desta maneira, a primeira etapa em todos os métodos de isolamento de RNA após a pulverização dos tecidos, é a exposição deste material a tampões de extração. Estes apresentam substâncias como o cloreto de lítio que auxilia a precipitação do RNA e isotiocianato de guanidina que permite a manutenção do RNA intacto nas etapas posteriores da extração, através da degradação das ribonucleases endógenas (Sambrook, 2002).

Atualmente, há vários reagentes comerciais como, por exemplo, Trizol (Invitrogen®) e Brazol (Lab Trade do Brasil®) que possuem em sua composição reagentes combinados, como isotiocianato de guanidina e fenol, possibilitando uma extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garantindo a integridade do material (Sambrook, 2002).

É necessária ainda a adição de clorofórmio ao tampão contendo RNA que solubiliza os lipídios permitindo a sua remoção. Após a centrifugação, três fases poderão ser observadas: uma rósea formada pela presença do fenol, uma interfase formada pelo clorofórmio e DNA e uma fase aquosa, onde estará presente o RNA.

A precipitação do RNA é feita com um álcool, como por exemplo, o isopropanol. Nesta etapa, observa-se uma nuvem branca contendo o RNA. Posteriormente, uma limpeza com álcool permite a retirada de sais que tenham ainda aderido ao precipitado de RNA (Ausubel, 1987).

Na extração de RNA, alguns fatores além da escolha do protocolo utilizado, são extremamente importantes para a obtenção e a manutenção do RNA de qualidade.

Primeiramente, todas as soluções utilizadas deverão ser feitas com água DEPC (dietilporocarbonato) autoclavada. O DEPC atua inativando RNAses, pois degrada as histidinas presentes.

Os almofarizes, pistilos, vidrarias e outros utensílios devem ser previamente esterilizados em estufa a 180 °C por um período de quatro horas.

As ponteiros, tubos de polipropilenos devem ser novos e livres de RNAses.

As micropipetas devem ser utilizadas apenas para os procedimentos com RNA.

A bancada deve ser constantemente limpa com SDS 10% e com etanol 70% e, se possível, exclusiva para a manipulação de RNA.

E, principalmente, devem ser tomados cuidados com as luvas utilizadas, de forma a mantê-las livres das RNAses, normalmente liberadas abundantemente pelas secreções da pele.

3.1. Protocolo de Extração de RNA (adaptado de Chomczynski, 1987)

1. Macerar o tecido em nitrogênio líquido
2. Para cada 50 a 100 mg de tecido adicionar 1 mL de trizol (em tubo de polipropileno de 1,5 mL). Homogeneizar em vórtex
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente
4. Acrescentar 200 μ L de clorofórmio
5. Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos
6. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente
7. Centrifugar a 16.000 $xg/4$ °C durante 15 min
8. Remover a fase aquosa para tubo limpo
9. Adicionar 500 μ L de isopropanol. Homogeneizar com as mãos
10. Incubar por 10 min a temperatura ambiente
11. Centrifugar a 13.000 $xg/4$ °C por 10 min
12. Descartar o sobrenadante
13. Lavar com 1 mL de etanol 75% (feito com água DEPC)

(Neste ponto, pode armazenar em freezer -20 °C por até um ano)

14. Centrifugar a 10.500 $xg/4$ °C por 5 min
15. Secar o *pellet* durante 15 min a temperatura ambiente

Obs. Não pode ficar nada de etanol.

16. Ressuspender o *pellet* em água DEPC (20 μ L a 50 μ L)

Obs. Verificar o tamanho do pellet, para avaliar em que volume ressuspender.

4. QUANTIFICAÇÃO EM ESPECTROFOTÔMETRO:

Luciana Correia de Almeida Regitano

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, normalmente se utiliza uma diluição em água. Para estimar a concentração de DNA utiliza-se a seguinte relação: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g}$ DNA dupla-hélice (Regitano, 2001; Sambrook, 2002).

Dessa forma, a concentração de DNA na amostra é obtida pelo seguinte cálculo:

$$[\text{DNA}] = \text{Valor da leitura em O.D.} \times 50 \times \text{Fator de diluição}$$

As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A_{260}/A_{280} fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína.

Utilize o espaço abaixo para anotar o resultado da quantificação:

Amostra	OD₂₆₀	OD₂₈₀	Razão	Concentração

A concentração de RNA nas amostras também será avaliada por espectrofotometria, tendo uma alíquota de amostra de RNA dissolvida em água deionizada, na proporção de 1:100 (5µL de DNA: 495 µL de água deionizada

5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Adelita Carolina Santiago

Gisele Batista Veneroni

Luciana Correia de Almeida Regitano

A reação em cadeia da polimerase nada mais é do que a replicação *in vitro* do DNA. Foi desenvolvida na década de 1980 por Karry Mullis, que conseguiu pela primeira vez amplificar pequenos fragmentos de DNA. Em 1988, foi descoberta uma enzima DNA polimerase termoestável, isolada de *Thermus aquaticus*, permitindo que este processo ganhasse automação (Saiki, 1988).

O impacto deste método foi enorme, pois possibilitou facilidade, rapidez, versatilidade na manipulação de ácidos nucleicos, o que tornou a técnica poderosa e imprescindível em grande parte dos procedimentos realizados atualmente. É utilizada, por exemplo, na realização de seqüenciamento, como diagnóstico de doenças, detecção de mutações pontuais, entre outros.

Esta técnica envolve três etapas: desnaturação do DNA pelo calor entre 94-95°C, anelamento de *primers* à seqüência alvo em fita simples, atuando de 3 a 5°C abaixo da temperatura de *melting* (35 a 60°C) e uma etapa de extensão do *primers* anelados por uma DNA polimerase termoestável (72 a 78°C)

Alguns componentes são essenciais para que ocorra a PCR:

1. presença de uma DNA polimerase termoestável, como por exemplo, *Taq* (*Thermus aquaticus*) a ou *Tfl* (*T. flavus*);
2. presença de um par de *primers*, oligonucleotídeos que funcionam como ponto de início da polimerização;
3. cátions divalentes, como MgCl₂;

4. deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), com quantidades iguais de dATP, dCTP, dTTP e dGTP;
5. DNA molde, podendo ser fita simples ou fita dupla;
6. Tampão para manutenção do pH, geralmente entre 8,3 e 9 à temperatura ambiente.

5.1. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO MICROSSATÉLITE BMS1617

1. Retirar o DNA do freezer e deixar à temperatura ambiente
2. Lavar as mãos e colocar luvas
3. Limpar a bancada com álcool 70%
4. Marcar os tubos ou identificar a placa. Deve-se criar um registro das amostras que serão amplificadas no caderno de laboratório
5. Preparar o Mix de PCR.

Mix de PCR

Reagente	[] do estoque	[] de uso	Vol. (1 amostra)	Vol. (___ amostras)
H ₂ O	-	-	8,235 µL	
Tampão*	10X	1X	1,25 µL	
MgCl ₂ *	20mM	1,5mM	0,94µL	
dNTP	20mM	0,2mM	0,125µL	
Primer F	5µM	0,1µM	0,25µL	
Primer R	5µM	0,1µM	0,25µL	
Taq	5U/µL	1U	0,2µL	
TOTAL			11,25 µL	

* Sempre verifique se o tampão contém ou não MgCl₂. Caso já contenha, não há necessidade de acrescentar. Acrescente o volume correspondente ao MgCl₂ no volume de água.

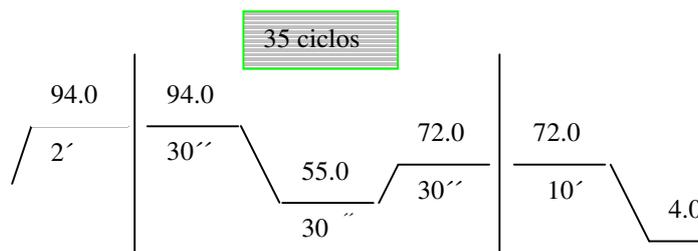
5.2. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TIREOGLOBULINA

1. Retirar o DNA do freezer
2. Lavar as mãos e colocar luvas novas
3. Limpar a bancada
4. Tirar o DNA, o gelinho e reagentes (menos a Taq) do freezer
5. Marcar os tubos ou identificar a placa
6. Preparar o Emix

	1 X	_____ X
H₂O Milli Q	15,54 µL	_____ µL
10x PCR Buffer	2,5 µL	_____ µL
MgCl₂ (20mM)	2,44 µL	_____ µL
dNTP (20mM)	0,25 µL	_____ µL
Pr up (5 µM)	0,82 µL	_____ µL
Pr down (5 µM)	0,82 µL	_____ µL
Taq (5u / µl)	0,13 µL	_____ µL

6. Distribuir 22,5µL do Emix / tubo ou poço (se for placa de PCR), sempre sobre um gelinho
7. Distribuir 2,5µL DNA / tubo ou poço (se for placa de PCR)
8. Colocar as amostras em um termociclador, escolher o programa correto para amplificação: Programa RFLP55.

Programa : RFLP55



6. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Gisele Batista Veneroni

Luciana Correia de Almeida Regitano

As enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, reconhecem uma seqüência específica de bases em uma molécula de DNA, e clivam a molécula naquela seqüência ou próximo dela. A seqüência de reconhecimento é chamada de sítio de restrição. Diferentes enzimas de restrição reconhecem e clivam diferentes sítios de restrição.

Elas são indispensáveis na análise da estrutura dos cromossomos, no seqüenciamento de DNA, no isolamento de genes, na criação de moléculas novas de DNA que podem ser clonadas e em técnicas como RFLP. Uma característica marcante de muitos desses sítios de clivagem é que eles possuem uma dupla simetria rotacional, isto é, a seqüência de reconhecimento é palindrômica e os sítios de clivagem são simetricamente posicionados.

6.1. DIGESTÃO DO DNA – Tiroglobulina

	<i>Emix 1X</i>	<i>Emix X</i>
Água Milli Q	0,5 µL	_____ µL
BUFFER 10X	1,4 µL	_____ µL
<i>Mbol</i> (10 U/µl)	0,1 µL	_____ µL
Total	2 µL	_____ µL

Por reação colocar: 2,0 µl Emix de digestão + 12µl DNA amplificado (produto de PCR). Realizar esta reação em uma placa de PCR ou em microtubos médios, mas sempre sobre o “gelinho”.

A reação de digestão será incubada a 37°C em aparelho Thermomixer 5436 (Eppendorff).

O volume final da reação será de 14 μL , sendo 12 μL de produto de amplificação e 2 μL de Emix de digestão. Este último consiste de 10 mM TrisHCl (pH 8.0); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM 2-mercaptoetanol; 0,1 mg/mL de BSA e 1 unidade da endonuclease de restrição *MboI* (depende do fabricante). A reação de digestão será incubada a 37°C (depende do fabricante) por 3 horas.

Para análise dos genótipos, os produtos das digestões serão separados em gel de agarose 4% com tampão de eletroforese TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0), submetidos à voltagem de 3 V/cm e, corados com Brometo de Etídeo incorporado no gel. Em cada poço do gel serão aplicados 14 μL do produto de digestão acrescidos de 2,8 μL de *loading buffer* numa proporção de 5:1 respectivamente e, no primeiro poço de cada fileira do gel será aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb também acrescido de *loading buffer* na mesma proporção acima.

Os fragmentos serão detectados sob iluminação UV e registrados por uma câmera fotográfica digital. Os tamanhos dos fragmentos serão estimados por comparação com padrão de tamanho de DNA de 100 pb em cada gel e assim será possível determinar os genótipos de cada animal.

Os “primers” utilizados na PCR amplificam uma região de 545 pares de bases do gene da tireoglobulina, como ilustrado a seguir:

>gi|790|emb|X05380.1| Bovine thyroglobulin gene exon 1 and flanks

AAGCTTCCTGCTGCCTTTTGGTTGTCTGACGTCCTGGGACAGAGGGGAAAGGG
GGATGACTACGAGTATGACTGTGCGTGTGTTTGGCTTATCTCATCAAATCTCTA
 CATTCTGTGTTAATG**GATC**TGCCTGTTTTGTTCCCTGCCATATCCTCATGGCCT
 AGAATAGTGTCTGCTTCTCTATCAGACTCTAAAGAAACATTGCTAGGAGGGGAAG
 GAAGGAGCATGGATGAGGAGGGAGGGAGCATTGTGTTTCTCTCACGGTGGGCC
 TGAACGTGTGGCCCACCAAGTTGTTAACTTTGGCCTTTACCCCTGAAGATGAATT
 ATGAAGCCACACCCCAGTTCTTCCTTGGTGGCTCAGATGGTCAAGAATCCACC
 TGCAATGCGGGAGACCTGGGTTT**GATC**CCTGGGTTGGGA**GATC**CCCTGGA
 GAAGGGAATGGCTACCCACTCCAGTATTCTGGCCTGGAGAATCCCATGGACAG
 AGGAGCCTGGCGGGATGCAGTCCATGGGGTCTCAGAGAGTCAGATGTGACTGA
 GCGACTTTCACACACATTTCGTCCCTGGTTCTGCTCCCCTACAGCCTCCACAAGA
TTTTCAC*CCCACACTGGCCACATGAGTGTCTCCAGGGGAACAGACGCAGGTG
 GAGGACCTCCTTGTGACCAGCAGAGAAAACAGGGTGGGCACTGCTTCCCTGAG
 TGCCTGTGGGTGGGGGCTAAGTACCCACAGCAGTGCTATAAAGGCTCCTTGGC
 CAGAGCCCTAAGGTGGGCAGCAGCTTCTAACCCTTCTCCCTGGAAGGCTCCCA
 AGATGGCCCTGGCCCTATGGGTCTTCGGTCTGCTGGACTTAATCTGCTTGGCAT
 CCGCCAACATCTTTGGTAAGTTCTGACCCTGCGGTCTCAGAGCATCGGGTTGG
 GAGGGACCTCTGAGGCCAACTCCTTGTTAGCCAGGACCTGCCCCAGGGCCATG
 GAACATTTGTGACCTCATTTAATCCTCAGTGTCCCGAGGTCAGTTATGCACTCTT
 TCCTTTTCAGATGAAGAGACAGAGGGTCTGAGAAGTCACAGAGTCAGTGATC

Obs. Os sítios de anelamento dos *primers* estão sublinhados.

Em negrito, podem ser observados os sítios de restrição

7. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

João José de Simoni Gouveia

Luciana Correia de Almeida Regitano

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar, identificar e purificar moléculas carregadas (como DNA e proteínas) (Maniatis, 1987). Este método foi introduzido por Tiselius, no ano de 1937 (Brammer e Iorczeski, 2002) e é simples, rápido e capaz de separar fragmentos que não são adequadamente separados por outras técnicas (Sambrook e Russel, 2002).

A técnica apresenta basicamente um sistema de suporte (gel de agarose, por exemplo), um tampão no qual está imerso o gel e os eletrodos nas extremidades da cuba onde estão contidos o tampão e o gel.

Sob a influência de um campo elétrico, moléculas carregadas e partículas migram em direção ao pólo oposto. A carga e a massa das moléculas fazem com que elas migrem em velocidades diferentes e, portanto, propiciam a separação destas (Westermeier, 2005). Como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa (devido ao grupamento fosfato) eles sempre migrarão em direção ao pólo positivo. Então, o fator determinante da taxa de migração será a massa da molécula (quando se fala em ácidos nucleicos, a massa é diretamente proporcional ao tamanho da molécula).

Existem vários meios de suporte que podem ser utilizados (papel filtro, membrana de celulose, gel de agarose, gel de poliacrilamida). No caso dos géis, a porosidade (que tem uma relação direta com a concentração de agarose) determina o poder de separação (Brammer, 2002).

Na escolha do tampão, o principal fator a ser considerado é sua capacidade tamponante. Os dois tampões mais utilizados na eletroforese de ácidos nucléicos são o TAE (Tris, Acetato e EDTA) e o TBE (Tris, Borato e EDTA). O TAE é mais utilizado que o TBE, porém é mais facilmente exaurido durante corridas longas ou com alta voltagem. O TBE, apesar da melhor capacidade tamponante, deve ser evitado quando se deseja purificar os ácidos nucléicos do gel (Ausubel, 1994).

Alguns fatores alteram a migração das moléculas através do gel, dentre eles podemos citar: concentração de agarose, conformação do DNA e intensidade da corrente.

A concentração de agarose atua de forma importante na eletroforese, pois ela determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. As relações entre concentração de agarose e resolução de moléculas lineares de DNA são apresentadas na tabela abaixo (Maniatis et al., 1982).

Tabela 1. Limites de eficiência da separação de DNA em diferentes concentrações de agarose (Maniatis, 1987)

Concentração de agarose no gel (%)	Separação de moléculas de DNA (Kb).
	Limites de eficiência
0,3	60 – 5,0
0,6	20 – 1,0
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

Para observar ácidos nucleicos em gel de agarose, deve-se corá-los e submetê-los a uma luz ultravioleta. O corante mais comum é o brometo de etídeo, que se intercala entre as bases do DNA (Ausubel, 1994).

7.1. Protocolo para análise de produtos de amplificação e fragmentos de digestão em gel de agarose

- **gel 1%** → 0,3 g de agarose para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão Tris-Borato-EDTA 1X. Para isso, aplicar 5 µl de produto de amplificação + 1 µl de *loading buffer*.
- **gel 4%** → 1,2 g de agarose de baixo ponto de fusão para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão Tris-Borato-EDTA 1X. Utilizado para analisar o resultado das digestões com enzimas de restrição. Aplicar todo o produto da digestão (13 µl) + 2,6 µl de *loading buffer*.

1. Pesar a agarose
2. Colocá-la em um erlenmeyer contendo o volume necessário de tampão TBE 1X
3. Aquecer no forno de microondas até iniciar a ebulição (aproximadamente 30 segundos em potência média para um gel de 30 mL). Agitar o frasco e retornar ao forno de microondas por mais alguns segundos
4. Aguardar a redução da temperatura para aproximadamente 60 ° C e adicionar Brometo de Etídeo, na quantidade indicada para cada gel
5. Verter no molde previamente nivelado e colocar os pentes
6. Após a solidificação, colocar o gel na cuba de eletroforese e cobrir com tampão TBE 1X

7. Aplicar as amostras acrescidas de *loading buffer* e aplicar a corrente de acordo com o tamanho do gel
 - A eletroforese deve ser realizada em TBE 1X, a uma voltagem constante na faixa de 2 a 5 V/cm (considerando a distância entre os eletrodos). Após a corrida, submergir o gel por 20 minutos em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL e visualizá-lo sob luz ultra-violeta. Caso o fundo do gel esteja muito corado, pode-se lavar o excesso de brometo por submersão em TBE 1X por 5 a 10 minutos
- ☛ O Brometo de etídio é um potente agente mutagênico. Utilizar luvas e máscara para preparar a solução estoque e manipular os géis
- ☛ A luz ultra-violeta produz queimaduras severas. Utilize máscara/óculos de proteção adequados

7.2. GEL DESNATURANTE PARA RNA

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Para analisar moléculas de RNA podem ser utilizados géis de agarose e poli(acrilamida), desnaturantes ou não. As propriedades desta eletroforese são basicamente semelhantes às de eletroforese de DNA (Patel, 1994).

A qualidade das moléculas de RNA pode ser analisada em gel de agarose normal, feito com tampão (TBE, TAE) com água DEPC ou em gel desnaturante. Devido a interações intramoleculares, as moléculas de RNA podem dobrar-se, alterando a estrutura secundária e afetando a migração das moléculas no gel. O gel desnaturante soluciona este problema, pois sob condições desnaturantes as pontes de hidrogênio são rompidas e o RNA migra como molécula de fita simples. Isto

permite avaliar com acurácia a qualidade e o peso molecular do RNA (Sambrook, 2002; Maseka, 2005).

Dentre os desnaturantes existentes, o mais poderoso, além de caro e altamente tóxico é o hidróxido de metil mercúrio. Porém, o mais freqüentemente utilizado é o formaldeído, mas pode haver variantes de géis utilizando tiocianato de guanidina, formamida e DMSO. A utilização de cada um deles apresenta vantagens e desvantagens de acordo com a escolha do tipo de gel, poliacrilamida ou agarose, diferentes níveis de toxicidade e potencial de desnaturação (Patel, 1994).

Os géis polimerizados com formaldeído não coram satisfatoriamente as amostras, de forma que o brometo de etidíó deve ser colocado em cada amostra individualmente, e não no gel, como comumente utilizado (Regitano, 2001).

Outro diferencial no gel desnaturante de agarose é a utilização de MOPS (3-N-morfolino ácido propanosulfônico). O MOPS é um excelente tampão para manutenção de sistemas biológicos em pH neutro. É muito utilizado em biologia molecular e bioquímica.

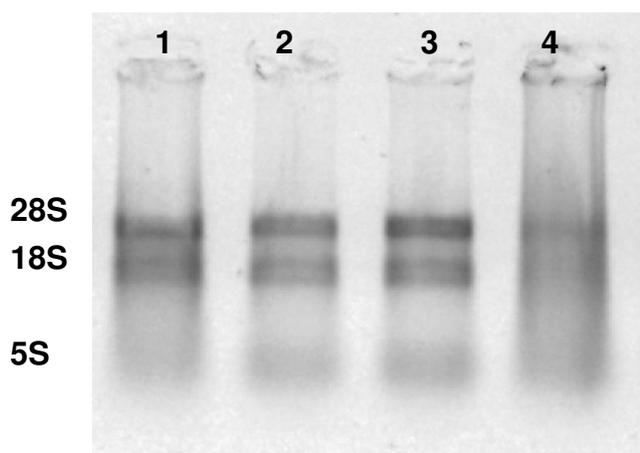


Figura 2. Exemplo de separação eletroforética. Nos números 1 a 3 são mostradas as bandas 28S, 18S e 5S do RNA, indicando integridade das amostras. O número 4 exemplifica uma amostra de RNA degradada.

7.2. PROTOCOLO DE GEL DESNATURANTE DE AGAROSE 1% COM FORMALDEÍDO (adaptado de Lúcia Elvira Alvares (2001):

Reagente	Quantidade
Agarose (1%)	0,3 g
Buffer 5X (1 x)	6,0 mL
Formaldeído (2,2M)*	5,4 mL
Água DEPC	18,6 mL
Total	30 mL

* verificar se o pH do formaldeído é superior a 4

A vidraria utilizada para a preparação do gel, assim como a cuba de eletroforese devem estar previamente tratadas contra ação de RNAses. Todas as soluções empregadas devem ser feitas com água DEPC.

Tampão de corrida 5X

Reagente	Quantidade
MOPS (100 mM)	20,6 g
Acetato de sódio 0,05 M (40 mM)	800 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0 (5 mM)	10 mL

1. Pesar o MOPS
2. Dissolvê-lo em acetato de sódio 0,05 M. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 2N e completar o volume para um litro de água DEPC
3. Adicionar o EDTA 0,5 M pH 8,0. Guardar protegido da luz
4. Diluir este tampão para concentração final de 1X com água DEPC

Tampão da Amostra

Reagente	Quantidade
Tampão de Corrida 5X	300 µL
Formamida (50 %)	750 µL
Formaldeído (10 %)	150 µL
Azul de bromofenol (0,4 %)	0,004 g
Água DEPC	300 µL

1. Acrescentar 3 μL do tampão da amostra para cada 1 μL de RNA
2. Acrescentar 1 μL de brometo de etídio (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
3. Incubar as amostras por 15 minutos à 65 °C
4. Transferir para um recipiente contendo gelo
5. Centrifugar rapidamente para recolher o conteúdo no fundo do tubo
6. Manter em gelo até aplicar as amostras no gel

7.3. ELETROFORESE EM SISTEMA CAPILAR

Gustavo Gasparin

Durante décadas, a eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose foi intensamente utilizada como uma das ferramentas mais importantes dos laboratórios de biotecnologia e bioquímica para a análise de macromoléculas. Nos últimos anos, porém, a eletroforese capilar tem apresentado vantagens em relação à técnica de eletroforese em placas. Para a análise simultânea de amostras, instrumentos de eletroforese capilar com arranjo de capilares são os mais utilizados. Existem aparelhos que possuem desde um único capilar, até 384 capilares, possibilitando a maximização do tempo necessário para as mais diferentes análises, desde detecção de resíduos de explosivos e drogas, até testes de paternidade.

A separação das macromoléculas é conduzida em tubos de dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 36 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito. O uso do capilar fornece vantagens sobre as placas de gel devido às razões geométricas, em que há uma elevada relação entre a área superficial e o volume interno, permitindo a dissipação eficiente do calor gerado pela corrente elétrica, e possibilitando a aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm),

o que resulta em separações de alta eficiência, alto poder de resolução, e reduzido tempo de análise.

Em geral, um aparelho de eletroforese capilar básico consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (de platina, normalmente), e um detector apropriado. A fonte de alta tensão é aplicada nos eletrodos de platina situados nos reservatórios contendo uma solução eletrolítica apropriada. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução, para completar o contato elétrico. As amostras normalmente são introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos, nos quais uma diferença de potencial é estabelecida entre o capilar e o recipiente que contém a amostra, durante um tempo pré-determinado.

O detector localiza-se em algum ponto do capilar, próximo ao reservatório de saída.

A eletroforese capilar em gel (CGE) é utilizada exclusivamente para separação de macromoléculas, tais como oligonucleotídeos, fragmentos de DNA, e proteínas. Teve início com a aplicação nas separações de DNA por tamanho molecular, utilizando colunas preenchidas com gel, denominados géis químicos: um capilar é tratado com um reagente que estabiliza o gel junto à parede do capilar, através de ligações covalentes. Esse método foi descartado dado o grande número de problemas que surgiram, tais como aparecimento de bolhas (perda de condutividade), introdução limitada de amostra, retenção de fragmentos com alto peso molecular, e degradação do gel por hidrólise. Tais problemas levaram à formulação de novos sistemas, que foram denominados géis físicos.

Géis físicos são matrizes poliméricas hidrofílicas, dissolvidas em tampão apropriado, que não são ligados à parede do capilar, podendo assim ser substituídos

a cada separação, o que permite o aproveitamento do mesmo capilar por centenas de vezes, sem perda de eficiência. A uma dada concentração de polímero, as fitas poliméricas individuais começam a interagir umas com as outras, formando uma estrutura em rede dentro do capilar, possibilitando a separação dos fragmentos de DNA. A concentração polimérica ótima depende do tamanho do DNA a ser separado.

7.4. PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO EM SISTEMA CAPILAR

Antes da injeção no capilar, as amostras são desnaturadas em presença de formamida, para evitar que a formação de estruturas secundárias afete a velocidade de migração. Um padrão de tamanhos conhecidos é aplicado junto com as amostras para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos analisados.

Procedimento:

1. Preparar o MIX de formamida + padrão interno de tamanho de fragmentos: para cada amostra, colocar 8,85 μL de formamida Hi-Di e 0,15 μL de padrão (GS 500 ROX).
2. Aplicar esses 9 μL de MIX em um pocinho da placa de corrida
3. Aplicar 1 μL de produto de PCR da sua amostra por pocinho
4. Desnaturar as amostras (já na placa de corrida) durante 5 minutos à 95°C
5. Colocar as amostras imediatamente no gelo após a desnaturação, permanecendo por 5 minutos.
6. Preparar a injeção das amostras no computador, através do software *Data Collection*

8. SEQÜENCIAMENTO

Kerli Ninov

Lilian Giotto Zaros

As duas técnicas mais importantes para o seqüenciamento de DNA são o método químico de degradação de bases desenvolvido por Allan Maxam e Walter Gilbert em 1977 e o método didesoxi ou terminação da cadeia de Fred Sanger e colaboradores em 1978.

Os dois métodos são baseados na produção de um conjunto de fitas simples de DNA que são separadas pelo princípio de eletroforese (Okubo, 1992). Se comparado ao seqüenciamento de Maxam e Gilbert, o método de terminação da cadeia de Sanger gera dados que são mais facilmente interpretados. Por isso, essa tem sido a técnica mais utilizada em Projetos Genoma (Sterky & Lundeberg, 2000).

SEQÜENCIAMENTO DIDESOXI OU POR TERMINAÇÃO DA CADEIA

É baseado na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse.

Quando os ddNTPs são adicionados, a extensão da cadeia é interrompida pois esses didesoxinucleotídeos não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo (dNTP). Como esses ddNTPs são marcados, podem ser detectados e a seqüência dos nucleotídeos, identificada.

Esse método apresenta duas modalidades:

- Seqüenciamento Manual

No método manual, a sequência de bases do DNA é lida manualmente, após a exposição das bases identificadas em um filme de raio-X. Para isso são preparados 4 tubos de reação, cada um contendo o DNA molde, a DNA polimerase e um *primer*. Cada tubo recebe uma pequena quantidade de um dos ddNTP (dATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP) junto com um dos dNTPs (dATP, dTTP, dCTP ou dGTP) marcados com fósforo radioativo (P^{32}).

Em qualquer um dos 4 tubos serão produzidos vários comprimentos de cadeia, cada um correspondente ao ponto no qual o respectivo ddNTP desse tubo foi incorporado e ocasionando o término do crescimento da cadeia. As amostras de cada tubo são submetidas à eletroforese e posterior exposição em filme de raio-X para que a posição das bases correspondentes possa ser determinada lendo-se ao longo das 4 colunas do gel (www.dnai.org).

- Seqüenciamento Automático

O seqüenciamento automático utiliza seqüenciadores com eletroforese vertical em placa ou eletroforese em capilar onde cada ddNTP possui marcação fluorescente, ao contrário do método manual, em que estes apresentam uma mesma marcação radioativa.

Para a geração de fragmentos durante a reação de seqüenciamento, os dNTPs são adicionados à nova fita e no momento da adição de um ddNTP, a extensão da cadeia é interrompida e conseqüentemente marcada com o último dideoxinucleotídeo incorporado. No final de vários ciclos tem-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos terminadas com diferentes ddNTPs que posteriormente serão identificados (lidos em seqüenciador automático).

A reação de seqüenciamento ocorre em termociclador e é caracterizada por várias etapas ou ciclos em diferentes temperaturas, repetidos por várias vezes por um determinado período de tempo. Suas etapas são:

1- Desnaturação - É a primeira etapa da reação de seqüenciamento na qual a molécula de DNA é separada em fita simples. Para ocorrer a desnaturação eleva-se a temperatura a 96°C durante 2 minutos.

2- Anelamento - Caracterizada pela utilização de um único primer que irá se anelar à fita de DNA na região complementar à sua seqüência. Para ocorrer o anelamento diminui-se a temperatura para 50°C durante 15 segundos.

3- Extensão - Após o anelamento do primer, ocorre a extensão do fragmento através da inserção dos dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) pela Taq DNA Polimerase. Como os ddNTPs estão em concentrações muito menores que os dNTPs, a sua inserção na cadeia é menos freqüente. Essa etapa ocorre a 60°C durante 4 minutos. Quando os ddNTPs são inseridos no lugar dos dNTPs, a extensão pára.

Após a reação de seqüenciamento, os produtos são submetidos à eletroforese capilar no seqüenciador automático. Os fragmentos marcados com fluorescência migram ordenadamente no interior dos capilares e à medida que são excitados por um feixe de *laser*, emitem luz em diferentes comprimentos de onda que são detectados por uma câmara CCD. Em seguida essa informação é transmitida ao computador e processada para que ao final da corrida, os dados possam ser recuperados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta), seguindo-se da análise de bioinformática.

8.1. PROTOCOLO DE REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Para a realização de uma reação de seqüenciamento são necessários os seguintes componentes:

- DNA template na concentração de 100 a 150 ng/ μ L para DNA plasmidial e de 50 a 80 ng/ μ L para produto de PCR;

- *Primer*: oligonucleotídeo complementar à determinada região do fragmento de interesse (Ex: *primer* universal M13 R ou F);

- dNTPs: Desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

- ddNTPs: Didesoxinucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP);

- Tampão contendo magnésio (Mg^{+2}) e Tris-HCl, que atuam como co-fator enzimático e tampão para manutenção do pH, respectivamente;

- Enzima Taq DNA Polimerase

OBS: A enzima, os dNTPs e ddNTPs estão contidos no *Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing*.

Procedimentos:

1-Retirar as amostras e os reagentes do freezer e mantê-los no gelo. Todos devem estar totalmente descongelados;

2-Preparar o seguinte mix em microtubo de 1,5 mL:

Mix	1X
Big dye (2,5 X)	2 μ L
Buffer Big Dye (5X)	1 μ L
Primer (3,2 pmol)	1 μ L
Água milliQ	5 μ L
DNA (10 ng)	1 μ L
Total	10 μL

3 - Manter o *mix* no gelo e vortexá-lo por alguns segundos;

4 - Dispensar o *mix* na placa de seqüenciamento de acordo com a quantidade estipulada;

5 - Adicionar a quantidade desejada de DNA ressuspendendo a solução e observando se o DNA está se misturando ao *mix*;

6 - Cobrir a placa com um tapete de borracha e levá-la ao termociclador utilizando o programa adequado, como por exemplo:

→ Pré-incubação: 94 °C por 2 minutos

→ Amplificação:

25 ciclos de

{	96 °C por 20 segundos
	58 °C por 10 segundos
	60 °C por 04 minutos

→ Resfriamento: 4 °C por ∞.

A tabela abaixo mostra a quantidade de amostra utilizada em uma reação de seqüenciamento:

Template	Quantity
PCR product:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	40–100 ng
Single-stranded	50–100 ng
Double-stranded	200–500 ng
Cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
Bacterial genomic DNA	2–3 µg

8.2. PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

Após a reação de seqüenciamento é necessário purificar o material para que os ddNTPs, dNTPs, *primers* e enzima não incorporados não interfiram na leitura no seqüenciador.

1. Adicionar 40 μ L de isopropanol 65% a temperatura ambiente;
2. Vortexar alguns segundos e incubar no escuro a TA por 15 minutos;
3. Centrifugar por 25 minutos a 3000 xg a TA;
4. Descartar o sobrenadante por inversão e dar um pulso em centrífuga com a placa invertida em um papel absorvente até 40 xg;
5. Adicionar 200 μ L de etanol 60% e centrifugar por 5 minutos a 3000 xg a TA;
6. Descartar o sobrenadante por inversão e dar um pulso em centrífuga com a placa invertida em um papel absorvente até 90 xg;
7. Secar no escuro por 1 hora;
8. Caso a aplicação em seqüenciador automático não seja feita imediatamente, selar a placa com adesivo, embalar em papel alumínio e armazenar em freezer -20°C .

8.3. APLICAÇÃO EM ABI 3100

1. Ressuspender as amostras com 10 μ L de formamida Hi-Di;
2. Desnaturar as amostras em termociclador por 5 minutos a 95°C ;
3. Verificar a validade e a quantidade do polímero (POP6) e tampão (EDTA 10X).

O polímero é válido por cinco dias quando já no equipamento e o tampão tem validade de 48 horas ou duas placas corridas. É recomendável a cada 15 dias retirar o capilar, desmontar o aparelho e realizar uma limpeza em seus componentes;

4. Enquanto isso, montar a planilha de corrida no software **Data Collection** em *Plate View*;
5. Nesse momento é aberta uma nova planilha:
 - Sample name (.g)
 - Dye Set (F);
 - Mobility File (DT3100POP6- BDV3-V1.mob);
 - Bio LIMS (3100Project);
 - Run Module 1 (StsSeq50_POP6 Default Module);
 - Analysis Module 1 (BC_3100_SeqOffFtoff.saz);
 - OK
6. Esfriar a placa em gelo;
7. Montar a placa nos acessórios próprios do seqüenciador;
8. Colocar a placa no seqüenciador verificando na planilha “Run View” se ela está corretamente instalada;
9. Clicar em “*Status View*” (Verificar voltagem, laser e temperatura);
10. Caso esteja tudo OK, clicar em “*Run*”.
11. Aguardar para verificar possíveis erros durante o início da corrida;
12. Após 40 minutos, é possível o acompanhamento da corrida pela visualização da imagem de cada capilar;
13. Ao término da corrida analisar os dados pelo software **Sequence Analysis**;
14. Adicionar a corrida desejada através do “*Add Files*” e clicar em “*Start*”;
15. Aguardar a execução da tarefa;
16. Abrir os eletroferogramas e avaliar os resultados obtidos.

9. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Adriana Mércia Guaratini Ibelli

Luciana Correia de Almeida Regitano

A conversão enzimática de mRNA para cDNA foi descoberta na década de 1970 por Kacia, Ross, Verma e colaboradores (Sambrook, 2002).

A síntese da primeira fita de cDNA é realizada por uma enzima transcriptase reversa dependente de RNA, geralmente isoladas de vírus, que usa amostras de RNA mensageiro (poli A) ou RNA total como molde. Atualmente, diversas espécies de transcriptases reversas são comercialmente utilizadas, como Mo-MLV, ALV e *SuperScript® RT II* (manual do usuário, 2003).

Para que esta conversão seja feita, são necessários:

- dNTPs: altas concentrações de dNTPs são importantes para a obtenção de boa eficiência na síntese do cDNA. Em baixas concentrações (< 50 μM) há decréscimo significativo na produção da primeira fita. Geralmente, são utilizados cerca de 200 a 250 μM de cada dNTP (Maniatis, 1987).

- um oligonucleotídeo, sendo o mais utilizado o oligo dT, pois sintetiza a primeira fita a partir de RNAs de cadeia poli A (manual do usuário, 2003).

- tampão: a presença deste reagente é importante, pois a alteração do pH acarreta a diminuição da eficiência da incorporação e da produção de transcritos. O pH ótimo é geralmente 8,3. Já foi observado que pequenas alterações de pH, de até 0,5 resultam em diminuição de até 5X na produção do cDNA (Maniatis, 1987).

- MgCl_2 : os cátions divalentes são importantes na transcrição reversa pois auxiliam na produção de transcritos completos em concentrações de 6 a 10 mM. Quando fragmentos muito longos serão transcritos, podem ser utilizados cátions

monovalentes, dentre eles, o mais indicado é o potássio, que auxiliam na manutenção da eficiência da transcrição.

- RNase OUT® (Invitrogen): degrada RNases presentes durante a síntese do cDNA (Manual do usuário, 2003).

- DTT ou ditioneitol: é um agente redutor que tem como principal função proteger oxidação de enzimas e proteínas (Roche, 2004).

- RNase H: é utilizada no final da reação para remover híbridos RNA:cDNA com a função de aumentar a sensibilidade e a eficiência do PCR. A presença de RNase H durante a síntese do cDNA degrada o mRNA, causando um déficit na produção desta molécula. Por isso, foram desenvolvidas transcriptases reversas que apresentam atividade reduzida de RNase H durante a produção da primeira fita e que são adicionadas apenas no final da reação, para remoção de moléculas híbridas (Manual do usuário, 2003).

É importante considerar que para que este procedimento tenha sucesso, o RNA das amostras deve ser intacto e sua quantificação, precisa, para evitar variações na utilização deste molde em técnicas futuras, como por exemplo, em arranjos de DNA ou PCR quantitativo.

9.1.PROTOCOLO DE SÍNTESE DE CDNA

1. Descongelar e homogeneizar brevemente cada componente abaixo.

Preparar o *mix* RNA/*primer*:

Componente	Para uma amostra
Até 5 µg de RNA total	Máximo de 8 µL*
10 mM dNTP <i>mix</i>	1 µL
Oligo dT 0,5 µg/µL	1 µL
Água DEPC (do kit)	Completar para 10 µL*

*o volume deste *mix* deve ser 10 µL. Assim, o volume máximo de RNA a ser utilizado é 8 µL contendo de 1 ng a 5 µg de RNA total. Se for utilizado 8 µL, a água DEPC do kit não é adicionada ao *mix*.

2. Incubar a 65 °C por 5 minutos;
3. Esfriar em gelo por 1 minuto;
4. Preparar o *mix* de reação adicionando cada componente a partir da primeira linha da tabela. Este *mix* pode ser preparado em um tubo separado, junto com a preparação do *mix* anterior. Se isso for feito, mantê-lo sempre em gelo:

Componente	Para uma amostra
Buffer RT 10 X	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNAse out	1 µL
Total	9 µL

5. Adicionar os 9 µL do *mix* acima em cada tubo contendo o RNA/*primer*. Dar um *spin*;

6. Incubar a 42 °C por 2 minutos;

7. Adicionar 1 µL (50 U) da enzima *SuperScript* RTII em cada tubo

obs. Os tubos não podem ser colocados em gelo para adição da enzima RTII. A temperatura deve continuar de 42 °C;

8. Incubar a 42 °C por 50 minutos;

9. Terminar a reação a 70 °C por 15 minutos;

10. Esfriar no gelo e dar um *spin*;

11. Adicionar 1 µL de RNase H e incubar por 20 minutos a 37 °C;

12. Estocar em freezer – 20 °C.

10. PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Helena Javiel Alves

O método de PCR quantitativa em tempo real é muito sensível e pode ser usado quando é necessário quantificar a expressão de RNAs mensageiros em baixos níveis. Esse procedimento permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo.

O princípio da técnica de PCR em tempo real pode se utilizar de duas descobertas importantes: a primeira é a atividade exonuclease 5'→3' da enzima *Taq* DNA polimerase e a segunda é a construção de sondas de oligonucleotídeos marcadas duplamente. Essas sondas são baseadas no princípio FRET (do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e emitem sinal de fluorescência somente quando clivadas. Com o objetivo de detectar o sinal de fluorescência durante as reações foram desenvolvidas várias técnicas. Em PCR em tempo real utilizando sondas *TaqMan* (Figura 3), a sonda, específica para o gene de interesse, é marcada duplamente com um fluoróforo repórter em uma extremidade e um fluoróforo “silenciador” na outra. Na forma íntegra, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo repórter é absorvida pelo silenciador. Quando ocorre a degradação da sonda pela atividade exonuclease da enzima *Taq* DNA polimerase, durante a PCR, os fluoróforos repórter e silenciador são separados e a emissão de fluorescência do repórter não será mais absorvida pelo silenciador resultando em aumento de emissão de fluorescência pelo repórter que será detectada e quantificada.

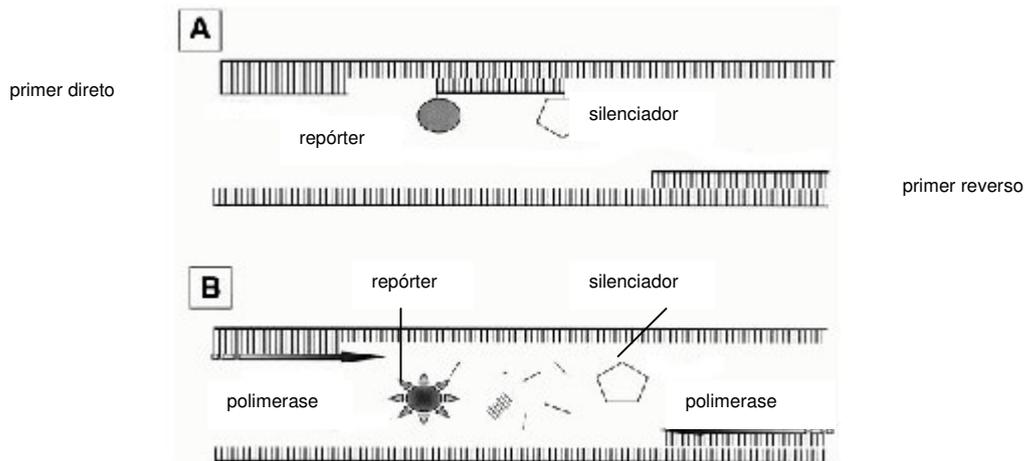


Figura 3. Sistema *TaqMan*. (A) Após a desnaturação, os *primers* e a sonda anexam-se à seqüência alvo. A emissão de fluorescência não ocorre devido à proximidade entre o repórter e o silenciador. (B) Durante a fase de extensão, a sonda é clivada (5'→3') pela atividade nucleásica da enzima *Taq* DNA polimerase. Então, repórter e silenciador são separados, permitindo a emissão de fluorescência pelo repórter.

Mais recentemente, outros sistemas sofisticados têm sido desenvolvidos como, por exemplo, *molecular beacons*, *scorpions* e sondas para hibridização. Esses sistemas são baseados no princípio FRET, porém sem a necessidade de hidrólise por atividade nucleásica.

Outra forma de detecção é a utilização de corantes como *SYBR Green* (Figura 4), que se liga ao DNA dupla fita emitindo fluorescência. O uso desse método de detecção tem sido bastante empregado em ensaios de PCR quantitativa em tempo real, pois tem a vantagem de ser mais barato em relação à construção de sondas marcadas. Um aspecto importante no uso de *SYBR Green* é que os *primers* utilizados na reação de PCR devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a

amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que esse corante se liga a qualquer DNA dupla fita.

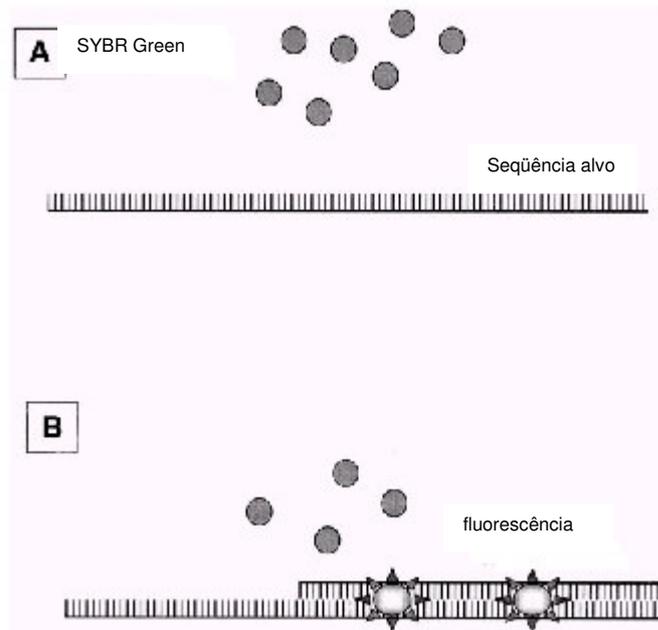


Figura 4. Sistema *SYBR Green*. (A) O corante livre na solução não emite fluorescência. (B) Quando o corante se liga ao DNA fita dupla ocorre a emissão de fluorescência.

Usando qualquer uma das químicas apresentadas, o aumento na emissão de fluorescência pode ser lido por um detector em tempo real, durante a reação de PCR e é uma consequência direta da amplificação da seqüência de DNA de interesse. Um programa de computador calcula um ΔR_n usando a seguinte equação:

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

Onde: R_n^+ = emissão de fluorescência em cada ponto;

R_n^- = emissão de fluorescência na linha de base.

O computador constrói os *plots* de amplificação usando os dados de emissão de fluorescência durante a PCR. Os valores de ΔRn são plotados vezes o número de ciclos de amplificação. Durante os ciclos iniciais da amplificação por PCR, os valores de ΔRn não excedem a linha de base. Portanto, um ciclo limiar (Ct) arbitrário é escolhido baseado na variação da linha de base. Os valores de Ct são então calculados por determinação do ponto no qual a fluorescência excede esse limiar escolhido. O Ct é definido como o número de ciclos nesse ponto (Figura 5).

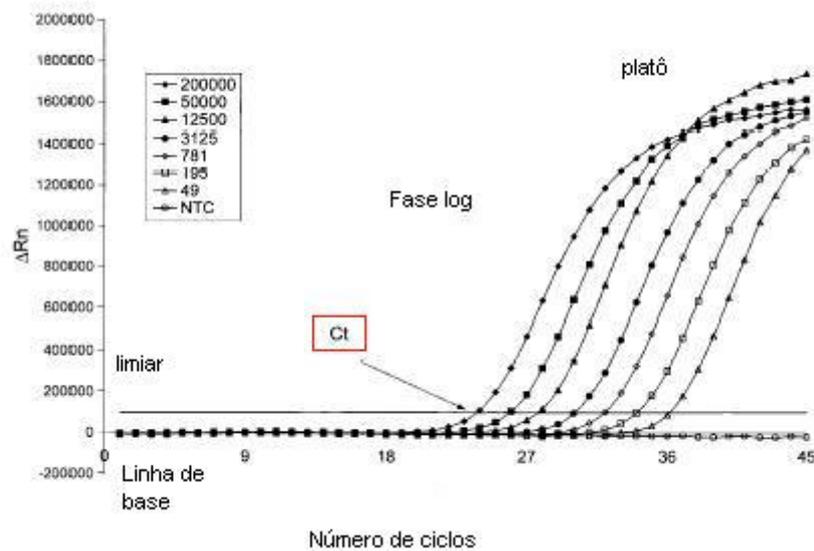


Figura 5. Exemplo de construção dos plots de amplificação, onde ΔRn é plotado contra o número de ciclos.

Existem dois métodos mais comumente utilizados para analisar dados de experimentos de PCR quantitativa em tempo real, são eles: o método de quantificação absoluta (método da curva padrão) e o método de quantificação relativa.

Método de quantificação absoluta – O número de cópias do gene de interesse é determinado relacionando-se o sinal da PCR com uma curva padrão. Para a

construção da curva padrão, são utilizadas diluições seriais de uma amostra de concentração conhecida. Esse método tem a vantagem de que a curva padrão incluída em cada PCR fornece um controle extra e correção na eficiência da PCR de cada amostra individual, tornando mais confiáveis as comparações entre experimentos.

Método de quantificação relativa – Esse método é mais usado quando existem muitos genes a serem testados em muitas amostras. Nesse caso, é feita a relação entre o sinal da PCR de um gene de interesse entre um grupo tratado com uma amostra controle (por exemplo, uma amostra não-tratada). Esse procedimento tem a vantagem de não necessitar da construção de curvas padrão. Por outro lado, as eficiências de amplificação dos genes de interesse e controle têm que ser similares para a obtenção de resultados confiáveis.

Em ambos métodos são utilizados genes constitutivos para a normalização das amostras. Tais genes devem ter expressão constante em todos os tecidos e em todas as fases de desenvolvimento, bem como não serem afetados pelos tratamentos experimentais. O gene mais utilizado com esta finalidade é o gene da β -actina.

O método de PCR quantitativa em tempo real tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância na quantificação de RNAs mensageiros em baixos níveis, tornando a quantificação mais rápida e acurada.

10.1. PROTOCOLO DE UMA PCR EM TEMPO REAL

1. Preparar o *Sybr Green mix** para 50 reações. Este procedimento é realizado com o objetivo de padronizar os componentes da reação que serão distribuídas para cada amostra. O *mix* consta de:

100 µL de tampão de reação 10X (tampão da enzima *Taq* DNA polimerase)

2 µL de *Sybr Green* I 10X concentrado **

73 µL de água (ultra-pura)

25 µL de DMSO

** Manter a solução contendo *Sybr Green* ao abrigo da luz

2. Preparo do *mix* de PCR em tempo real:

Reagente	Volume 1 reação (µL)	Concentração final	Vol. (__ amostras)
dNTP (10 mM)	0,4	0,2 mM	
Primer F (2,5 pmol/µL)	1,0	0,125 pmol/µL	
Primer R (2,5 pmol/µL)	1,0	0,125 pmol/µL	
MgCl ₂ (50 mM)	1,0	2,5 mM	
Taq (5U/µL)	0,3	1,5 U	
Sybr Green mix *	4,0		
BSA (20 mg)	0,25	0,25 µg/reação	
Água	11,05		
Volume final	19		

3. Colocar 19 µL do *mix* de PCR em cada pocinho da placa;

4. Colocar 1 µL do cDNA (25 ng/µL) de cada amostra no respectivo pocinho da placa; . Homogeneizar bem a mistura (amostra + *mix*);

5. Dar um pulso cuidadosamente (por centrifugação a 3000 rpm);

6. Colocar a placa no aparelho de PCR em tempo real;

7. Escolher o programa de amplificação do gene de interesse. Para o gene MCP-1, utiliza-se o seguinte programa :

→ Pré-incubação: 95 °C por 5 minutos

→ Amplificação:

55 ciclos de

{	95 °C por 10 segundos
	56 °C por 5 segundos
	72 °C por 12 segundos
	78 °C por 3 segundos

→ Curva de *melting*:

95 °C por 0 min

68 °C por 15 min

95 °C por 0 min

→ Resfriamento: 40 °C por 30 s

11. MAPEAMENTO DE QTLs – QTL EXPRESS

Millor Fernandes do Rosário

Kátia Nones

O QTL EXPRESS (Seaton, 2002) é o programa mais utilizado para mapear QTLs em populações parcialmente endogâmicas, como nas espécies de animais domésticos. Este programa pode ser acessado através de: <http://qtl.cap.ed.ac.uk/>. Ele implementa o mapeamento por intervalo (Lander e Botstein, 1989) através da aproximação de quadrados mínimos (Haley et al., 1994), realizando uma varredura dos intervalos entre dois locos adjacentes, testando a hipótese inicial de que não há QTL no intervalo considerado.

O programa considera que há fixação dos alelos contrastantes do possível QTL nas linhagens fundadoras da população utilizada para mapear os QTLs. Operacionalmente, a primeira linhagem parental relacionada no arquivo de genótipos é considerada como fixada para o alelo QTL Q e a segunda fixada para q. Também se baseia na estimação das probabilidades de identidade por descendência (IBD) dos alelos em cada loco considerando um conjunto de dados multilocos, além de testar um modelo estatístico, podendo incluir efeitos fixos e covariáveis para as observações (fenótipos) e os coeficientes IBD.

O programa possui diferentes opções de análises de acordo com o delineamento utilizado na população a ser estudada (F_2 e half-sib são os mais usados). Em cada uma dessas opções são encontradas instruções sobre os formatos dos arquivos a serem utilizados no programa.

A seguir é descrito o formato dos três arquivos (genótipos, mapa e fenótipos) que devem ser criados para realizar as análises no QTL EXPRESS utilizando a

opção “F₂ ANALYSIS”. Todos os arquivos devem ser tipo texto, onde os dados são separados por espaços ou tabulação.

ARQUIVO DE GENÓTIPOS:

1^a linha – Número de marcadores

2^a linha – Lista dos nomes dos marcadores – qualquer caracter alfanumérico.

3^a linha – Nome dado a cada geração (nome das linhagens parentais, F₁ e F₂)

4^a linha – Indicação de sexo (1-macho e 2-fêmea, ou M-macho e F-fêmea)

5^a linha – Símbolo que representa dados perdidos (*, ou -, ou 0)

6^a linha – Dados de cada indivíduo, na seguinte ordem:

- 1) Identificação do indivíduo, qualquer caracter alfanumérico.
- 2) Identificação do pai; no caso dos parentais onde a identificação do pai é desconhecida utilizar “*, ou -, ou 0”.
- 3) Identificação da mãe, igual à do pai.
- 4) Sexo, de acordo com o definido na linha 4.
- 5) Linhagem ou geração, como definido na linha 3
- 6) Genótipos dos marcadores, cada dois valores correspondem aos alelos de um marcador; os genótipos devem estar na mesma ordem da lista dos marcadores (linha 2)

Este arquivo pode ser obtido reformatando o arquivo “.gen” do CRIMAP ou criado através do EXCEL.

EXEMPLO:

```

14
MK1 MK2 MK3 MK4 MK5 MK6 MK7 MK8 MK9 MK10 MK11 MK12 MK13 MK14
LW MS F1 F2
1 2
0
1039 1529 1530 1 F1 4 1 4 7 1 2 1 2 5 2 1 1 2 5 4 2 1 2 1 3 2 4 6 3 1 2 5 2
1040 1529 1530 2 F1 4 1 4 7 1 2 1 2 7 2 1 1 2 5 2 5 1 2 1 3 2 4 1 3 4 2 0 0
    
```

ARQUIVO DO MAPA DE LIGAÇÃO:

1ª linha – Número de cromossomos.

2ª linha – Intervalo para cálculo das probabilidades genóticas e coeficientes em cM.

3ª linha – Nome do primeiro cromossomo, número de marcadores deste cromossomo, determinar se o mapa será construído para os dois sexos (=1) ou não (=2).

4ª linha – Para o primeiro cromossomo ou grupo de ligação, indicar os nomes dos marcadores em ordem, separados pelas distâncias entre eles em cM. Os nomes dos marcadores devem ser os mesmos utilizados no arquivo de genótipos. Se for feita a opção pela utilização do mesmo mapa para os dois sexos, esta linha aparece apenas uma vez, se os dois sexos tiverem mapas separados esta linha aparece duas vezes com diferentes distâncias.

Repetir as linhas 3 e 4 para cada cromossomo.

EXEMPLO:

```

2
1
SSC1 7 1
MK2 42 MK1 28 MK7 8 MK10 28 MK3 3 MK4 22 MK5
SSC7 7 1
MK6 35 MK8 25 MK9 17 MK11 22 MK12 25 MK13 21 MK14
    
```

ARQUIVO DE FENÓTIPOS:

1ª linha – Número de efeitos fixos, covariáveis e características, respectivamente.

2ª linha – Nome de cada efeito fixo, covariável e característica.

3ª linha – Código para dados perdidos; os indivíduos podem ter dados perdidos para as características fenotípicas, mas todos devem ter valores para efeitos fixos e covariáveis.

4ª linha – Identificação do indivíduo (mesma do arquivo de genótipos), seguida dos valores de efeitos fixos, covariáveis e características.

EXEMPLO:

```

2 1 1
Sexo Grupo Peso Esp_Toucinho
-999
1117 1 1 67800 19
1118 2 1 75400 24
1119 2 1 69800 29
1124 1 1 64800 18
1125 1 1 65800 19
    
```

Depois dos arquivos organizados conforme os modelos acima, seleciona-se o delineamento a ser utilizado na análise (Ex: F₂ Analysis). Nesta janela temos acesso aos arquivos através de um “browse” para cada um dos arquivos (genótipos, mapa e fenótipos) clicando em seguida no botão “SUBMIT”. Neste momento os genótipos são checados para erros, pela comparação dos alelos nos parentais e nas progênes, em famílias de irmãos completos e meio-irmãos. Os erros são indicados em uma janela (“Fatal errors”) para análise e correções.

Se não forem encontrados erros, a análise avançará e uma nova janela estará disponível, indicando o número de famílias de irmãos completos e o número total da progênie que será utilizada na análise. Estará também disponível uma tabela indicando o nome e número de marcadores, suas distâncias e o número de alelos observados em cada marcador.

Para continuar o procedimento de análise deve ser clicado o botão “CONTINUE”; uma nova janela aparecerá.

Nesta nova janela temos vários campos para a escolha dos parâmetros e dos modelos a serem utilizados na análise, juntamente com as características que se deseja analisar. Depois de escolhidos todos os parâmetros, clicar no botão “SUBMIT”.

Uma nova janela se abrirá apresentando o resultado do mapeamento por intervalos (em cM), da análise estatística (F, razão de verossimilhança e LOD) e estimativas do efeito aditivo e de dominância, além dos gráficos do mapeamento por intervalo, dos efeitos de aditividade e dominância e das permutações.

As permutações são implementadas de acordo com a metodologia proposta por Churchill e Doerge (1994) e têm por objetivo determinar os níveis de significância ou *threshold* no cromossomo ou no genoma. O QTL EXPRESS também permite que os intervalos de confiança de cada QTL mapeado sejam estimados de acordo com a proposta de Visscher et al. (1996) por meio do procedimento de *bootstrap* com reamostragem.

12. ARRANJOS DE DNA

Erika Cristina Jorge

Luiz Lehmann Coutinho

O seqüenciamento de etiquetas de seqüências expressas (do inglês, *Expressed Sequence Tags*, ESTs) e de genomas de organismos modelo resultam na identificação de inúmeras 'seqüências-motivo', cujos domínios estruturais conservados fornecem pistas sobre as funções biológicas que estes genes exercem no organismo. No entanto, nem sempre é possível definir a função biológica dos genes apenas com a informação da seqüência. A detecção e a quantificação do nível de expressão dos genes também contribuem para adicionar informações funcionais àquelas obtidas pelo seqüenciamento, revelando transcritos que são co-expressos espacial e temporalmente, e também as relações existentes entre eles.

O uso de ferramentas tradicionais de quantificação da expressão gênica como *Northern blot*, dot blot e RT-PCR, por exemplo, apesar de precisos e robustos, não apresentam a eficiência e a rapidez necessárias para acompanhar o ritmo de descoberta de genes novos imposta pelo seqüenciamento. Abordagens mais eficientes para a análise da expressão gênica constituem um desafio presente para o estudo de um grande número de genes simultaneamente.

Os arranjos de DNA foram desenvolvidos justamente para permitir estudos de expressão gênica em escala genômica. Surgiram como resultado da disponibilidade das seqüências obtidas em projetos genoma e da robótica de alta precisão, capaz de depositar inúmeras pequenas amostras de DNA em superfícies sólidas, usualmente em uma lâmina de microscópio ou membranas de náilon. O poder do método se deve ao fato de que os níveis de expressão de inúmeros genes de

interesse podem ser mensurados em um único experimento de hibridização, fornecendo tanto a informação de qual tecido o gene é expresso, quanto a informação 'dinâmica' da expressão, revelando como o padrão de expressão de um gene se relaciona com os outros.

A principal aplicação dos arranjos de DNA é a análise comparativa da expressão gênica em larga escala. Outras aplicações incluem ainda a análise da variação no DNA em escala genômica (genômica comparativa), caracterização de interações moleculares e a descoberta de reagentes antisense efetivos (Southern et al., 1999). Arranjos também vêm sendo desenvolvidos para promover a genotipagem de polimorfismos de base única (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) em larga escala (Meaburn et al., 2005) e a determinação do número de cópias de um segmento de DNA no genoma (Shaffer et al., 2006).

Este texto abordará os principais aspectos práticos da metodologia de microarranjos para estudos de expressão gênica, procurando indicar os passos desde a construção de uma plataforma até a análise dos dados.

A construção da plataforma microarranjo

O primeiro passo do método é a seleção do conjunto de moléculas de DNA de interesse que serão impressas sobre a plataforma. Neste método, as moléculas impressas são denominadas 'sondas' e podem ser (1) colônias de bactérias fixadas em membranas, contendo os fragmentos de DNA genômico ou cDNAs; (2) DNA ou cDNA isolados, (3) produtos de PCR ou (4) oligonucleotídeos sintéticos desenhados para ensaiar genes particulares. A coleção de sondas imobilizadas no arranjo pode representar genomas completos dos organismos de interesse, transcriptomas tecido-específicos ou qualquer outro conjunto de genes de interesse.

Além das sondas representando os genes de interesse, o arranjo deve ainda incluir espaços aleatoriamente distribuídos para genes 'referência', usados no processo de normalização dos dados de expressão. Estas referências são tanto controles positivos, que correspondem a genes que não alteram o nível de expressão entre os tratamentos testados (também conhecidos como genes constitutivos), quanto controles negativos (plasmídeo vazio) e espaços vazios, que são úteis para conferir e estabelecer o valor de *background* usado nos cálculos de expressão. A escolha destes controles e a distribuição no arranjo é crítica para a qualidade dos dados gerados.

O número de moléculas de DNA que podem ser impressas em um arranjo varia de acordo com a plataforma utilizada e o tipo de sonda a ser impressa sobre ela, sendo que os microarranjos de oligonucleotídeos sintéticos, sintetizados *in situ* sobre lâminas de microscópio, os que comportam uma maior densidade. A Affymetrix (www.affymetrix.com), umas das empresas que fabricam microarranjos comercialmente, garante a síntese de DNA-chips contendo até 500.000 oligos em uma única lâmina. Já os arranjos de membranas suportam no máximo, ~9.200 clones impressos.

12.1. O MÉTODO

O princípio deste método baseia-se na hibridização de ácidos nucleicos, que é bastante sensível e específica, em consequência das propriedades de complementaridade entre fitas de ácidos nucleicos (Duggan et al., 1999). A amostra biológica de interesse fornece a população de RNAs mensageiro (RNAm) que se pretende quantificar, aqui denominada 'alvo'. A cinética de hibridização é linear e a quantidade de alvo hibridizado em cada sonda é proporcional à abundância de

RNAm do alvo e, portanto, correspondente ao nível de expressão do gene na célula ou no tecido do qual o alvo foi obtido.

Tipicamente, a transcrição reversa é usada para obter os alvos, a partir de um oligo-dT e na presença de nucleotídeos modificados, produzindo produtos marcados na extremidade 3' de cada gene, diretamente complementar às sondas imobilizadas no arranjo. Frequentemente, *pools* de RNA total são marcados, para maximizar a quantidade de mensagem que pode ser obtida de uma dada quantidade de tecido. A pureza do RNA é um fator crítico na performance da hibridização, uma vez que lipídios, proteínas e carboidratos celulares podem interferir e causar ligações não-específicas dos alvos com as sondas. Para a detecção radioativa, P³³-dCTP é o mais usado por ser um emissor de alta energia, permitindo distinguir os sinais entre elementos fisicamente próximos um do outro. Para a detecção com marcadores fluorescentes, Cy3-dUTP e Cy5-dUTP são os mais usados porque são de maior eficiência de incorporação pela transcriptase reversa, apresentam boa fotossensibilidade e rendimento, além de serem altamente separáveis em espectros de emissão, permitindo a discriminação por filtragem óptica (Duggan et al., 1999).

Quando hibridizado ao DNA impresso na plataforma, o alvo marcado emite um sinal, que é detectado por um filme específico (chamado *phosphor imager*), no caso dos experimentos radiativos; ou diretamente pelo *scanner*, no caso dos fluorescentes, resultando em imagens digitalizadas dos arranjos. Estas imagens são então, utilizadas em programas específicos (*ArrayVision* ou *ImageQuant*, por exemplo), que geram *grids* capazes de localizar cada um dos sinais no arranjo e de convertê-los em uma leitura quantitativa, relativa ao nível de expressão do gene (Hal et al., 2000).

12.2. A ANÁLISE DOS DADOS

Experimentos seqüenciais de hibridização de arranjos geram resultados que consistem basicamente em listas de genes e de valores correspondentes que representam o nível relativo de expressão dos transcritos detectados. Estas listas podem ser extremamente complexas, uma vez que os arranjos apresentam uma alta densidade de genes e, para cada um deles, os experimentos geram informações quantitativas referentes à expressão em tratamentos diferentes (a análise de dois tratamentos com três repetições em um arranjo contendo 5.000 clones, por exemplo, permite gerar uma matriz com 30.000 entradas). O enorme volume de dados torna imperativo o uso de programas computacionais para administrar e maximizar a quantidade de informações extraídas.

Harrington e colaboradores (2000) definiram os passos necessários para uma análise eficiente dos dados de arranjos gerados após a obtenção da imagem processada: (1) normalização dos dados, (2) filtragem dos dados e (3) identificação do padrão. A normalização é necessária para permitir a comparação direta do padrão de expressão e deve ser efetuada tanto entre amostras no mesmo arranjo, quanto para o conjuntos de experimentos. A filtragem é importante para restringir o volume de dados. Por exemplo, é comum considerar apenas os genes expressos acima de um determinado valor estipulado pelo experimentador, desconsiderando aqueles que não apresentarem variação do nível de expressão entre os tratamentos.

O último passo talvez seja o mais complexo. Encontrar o padrão ou os grupos de dados que podem ser usados para a determinação do significado biológico dentro de um enorme volume de dados pode não ser uma tarefa direta. A interpretação dos dados varia desde uma lista de genes que são induzidos e reprimidos em função do tratamento, até análises de agrupamentos sofisticadas, como por agrupamento

hierárquico ou por *self organizing maps* (SOM). O agrupamento hierárquico tem sido tradicionalmente utilizado em análises filogenéticas e usa uma combinação progressiva de elementos mais similares para agrupar os genes por padrão de expressão. Os *self organizing maps* amostram o conjunto completo dos dados para determinar as distâncias entre eles e escolhe aleatoriamente pontos chamados centróides, a partir dos quais, os genes são organizados (Harrington et al., 2000).

12.3. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os arranjos fornecem um acesso ilimitado ao perfil de expressão dos genes característicos de um tecido ou de um organismo, porque os genes, as ORFs (*open reading frames*) e até mesmo regiões intergênicas podem estar representadas na plataforma. As informações geradas por diversos experimentos podem ainda ser integradas e utilizadas para a determinação de funções biológicas dos genes desconhecidos, para gerar uma visão global da atividade transcricional de um genoma em resposta a qualquer estímulo ou para compreender os mecanismos que controlam o desenvolvimento (Harrington et al., 2000).

Mas como todo método, os arranjos também apresentam algumas limitações. A necessidade de conhecimento prévio da seqüência do gene preso à plataforma é uma delas. Por isso, arranjos são construídos apenas para espécies que possuem seqüências genômicas ou ESTs disponíveis (Calsa Junior et al., 2004). Outras limitações incluem o alto custo dos equipamentos e a disponibilidade dos arranjos, tais como: problemas associados com hibridização cruzada entre transcritos e seqüências-alvo (causada pela duplicação de genes); e a restrita sensibilidade dos arranjos de ESTs para transcritos pouco freqüentes, pobremente representados nas bibliotecas e normalmente genes regulatórios importantes.

13. PREPARO DAS SOLUÇÕES

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 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 DEPC inativa essa substância.

EDTA (ethylenediamine tetraacetic 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)

Adicione água MiliQ para 1 L.

Autoclave

TE pH 7,6 (tampão Tris/EDTA)

Reagente	Concentração final
Tris HCl pH 7,6	10mM
EDTA pH 8,0	1mM
Volume para uma amostra	510 μL

TBE(Tris/Borate/EDTA) 10X – Tampão de Eletroforese**Solução Estoque**

Reagente	Quantidade
Tris Base (890 mM)	108 g
Ácido bórico (890 mM)	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0 (20 mM)	40 mL
Água deionizada	Completar para 1L
Total	1L

SOLUÇÃO DE RNase (10mg/mL)

Dissolver a enzima Ribonuclease A livre de DNase (Sigma R- 6513) em solução

Tris.HCl 10mM (pH 7.5), NaCl 15mM.

Armazenar a -20°C.

SOLUÇÃO DE PROTEINASE K (20mg/mL)

Dissolver 100 mg da enzima em 5 mL de solução Tris-HCl 10mM (pH 7.5),

Cloreto de Cálcio 20mM, Glicerol 50%.

Armazenar a -20°C.

Loading Buffer 6 x

Bromophenol Blue 0,25%

Xileno Cianol 0,25%

Glicerol 30% em água (estocar a 4°C).

Solução A (Tampão de Hemólise)

Para 1 amostra (25mL):

Reagente	Concentração final	X 1 amostra
Tris.Cl pH 7,6 1M	10mM	250 µL
MgCl ₂ 0,5M	5mM	250 µL
NaCl 5M	10mM	50 µL
Água deionizada		Completar para 25 mL

Solução B (Solução de lise)

Reagente	Volume x 1 amostra	Concentração final
Tris.Cl pH 8,0 1 M	5µL	10mM
NaCl 5 M	10µL	100mM
EDTA pH 8,0 0,5 M	10µL	10mM
SDS 20%	12,5µL	0,5%
Proteinase K (20 mg/mL)	2,5µL	
Água deionizada	460,5 µL	
Volume final	500 µL	

Água DEPC (dietilpirocarbonato):

Adicionar 100 µL de DEPC para cada 100 mL de água deionizada.

Agitar bem e incubar a 37°C por 12 horas.

Autoclavar a água DEPC por 45 minutos a 1 atm.

REFERÊNCIAS

ALVARES, L.E. Aspectos práticos da RT_PCR: Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR. In: Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. Embrapa, 2001.

AUSUBEL, F. M. **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons, v. 1, 1987.

AUSUBEL, F. M. **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons. 1994.

AZEVEDO, M. O; FELIPE, M. S. S; BRÍGIDO, M. M; MARANHÃO, A. Q; DE SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: UnB. 2003.

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. Methods in molecular biology. In: **PCR Protocols**, v. 226, 2^a. ed. Humana Press Inc. 2003.

BRAMMER, A. P. **Atualizações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. 1^a ed. Passo fundo: Embrapa Trigo, 2002.

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Análise serial da expressão gênica. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 86-98, 2004.

CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, 156-159, 1987.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 138, p. 963-971, 1994.

DUGGAN, D. J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature Genetics**, London, v. 21, sup. 1, p. 10-14, 1999.

HAL, N. L. W. van; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A.; KEIJER, J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 271-280, 2000.

HALEY, C. S.; KNOTT, S. A.; ELSEEN, J. M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v. 136, p. 1195-1207, 1994.

HARRINGTON, C. A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 285-291, 2000.

<http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/historico2004.pdf>

<http://www.dnai.org>

<http://www.etail.hpg.ig.com.br/cursopcr.html>

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, 1989.

MANIATIS T.; FRISCH E. F.; SAMBROOCK J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. 1987.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROCK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 545 p. 2001.

Manual do usuário. *SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR*. Catálogo 11904-018. version E. Invitrogen. 2003.

MASEKA, T.; VOPALENSKYA, V.; SUCHOMELOVAB, P.; POSPISEKA, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, V. 336, p. 46-50, 2005

MEABURN, E.; BUTCHER, L. M.; LIU, L.; FERNANDES, C.; HANSEN, V.; AL-CHALABI, A.; PLOMIN, R.; CRAIG, I.; SCHALKWYK, L. C. Genotyping DNA pools on microarrays: tackling the QTL problem of large samples and large numbers of SNPs. **BMC Genomics**, v. 6, p. 52, 2005.

OKUBO, K., HORI, N., MATOBA, R., NIIYAMA, T., FUKUSHIMA, A., KOJIMA, Y., MATSUBARA, K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature Genet.** 2: 173–179. 1992.

PATEL, D. **Gel eletrophoresis: essential data**. Wiley. 1994

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Embrapa. 2001.

Roche. 1,4-Dithiothreitol. **Roche Applied Science**. 2004.

ROMANO, E., BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p. 40-43, 1999.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.

SEATON, G.; HALEY, C. S.; KNOTT, S. A.; KEARSEY, M.; VISSCHER, P. M. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v. 18, p. 339-340, 2002.

SHAFFER, L. G.; BEJJANI, B. A. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. **Cytogenetical Genome Research**, v. 115, n. 3-4, p. 303-309, 2006.

SILVA JÚNIOR, J. G. da **Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2001.

SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. Molecular interactions on microarrays. **Nature Genetics**, v. 21, p. 5-9, 1999.

STERKY F, LUNDEBERG J. Sequence analysis of genes and genomes. **J. Biotechnol.** 76:1-31. 2000.

VISSCHER, P. M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S . Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, v. 143, p. 1013-1020, 1996.

WESTERMEIER, R. electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. Wiley-VCH. 2005.