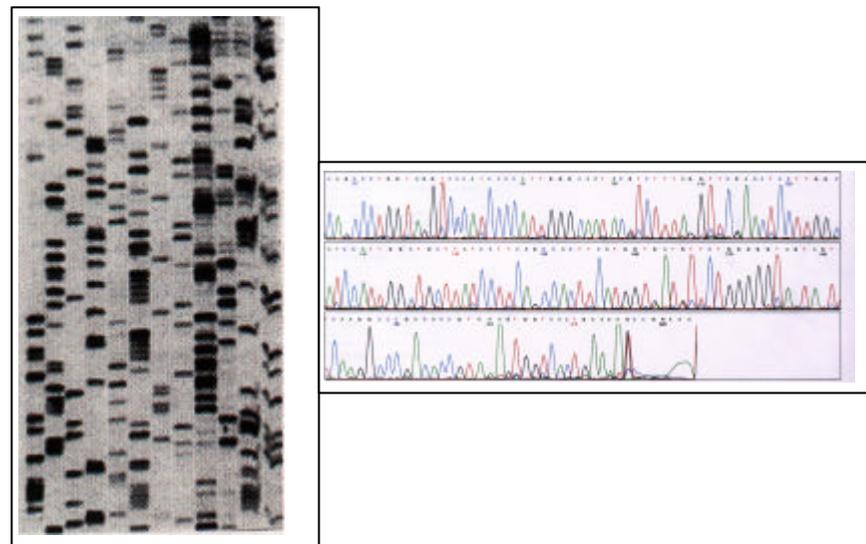


6 MÉTODOS DE ESTUDO EM GENÉTICA MOLECULAR..... 6.1

6.1	CUIDADOS GERAIS NUM LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR	6.3
6.2	PREPARAÇÃO DE DNA E RNA.....	6.7
6.2.1	<i>ELECTROFORESE</i>	6.15
6.2.1.1	Géis de Agarose.....	6.15
6.2.1.2	Géis de acrilamida.....	6.16
6.2.2	<i>Reacção de polimerase em cadeia (PCR)</i>	6.17
6.2.2.1	Princípios do método.....	6.17
6.2.2.2	RT-PCR.....	6.19
6.2.3	<i>Southern Blot</i>	6.20
6.2.3.1	Princípios do método.....	6.20
6.2.3.2	Endonucleases de restrição.....	6.21
6.2.3.2.1	Funções biológicas dos sistemas R-M.....	6.21
6.2.3.2.2	Sistemas R-M tipo II.....	6.22
6.2.3.2.3	Sistemas R-M tipo IIs.....	6.23
6.2.3.2.4	Montar uma reacção de restrição.....	6.23
6.2.3.3	Métodos de marcação da sonda.....	6.25
6.2.3.3.1	RADIOISÓTOPOS.....	6.25
6.2.3.3.2	POLIMERASES DO DNA.....	6.26
6.2.4	<i>Dot-Blot</i>	6.27
6.3	MÉTODOS COMERCIAIS.....	6.28
6.3.1	<i>Amplicor</i>	6.29
6.3.2	<i>"Branched DNA"</i>	6.30
6.3.3	<i>NASBA/Nuclisens</i>	6.32
6.3.4	<i>Ligase Chain Reaction</i>	6.34
6.3.5	<i>DEIA</i>	6.36

Capítulo 6

6 MÉTODOS DE ESTUDO EM GENÉTICA MOLECULAR



6.1 Cuidados Gerais num Laboratório de Genética Molecular

O manuseamento de ácidos nucleicos purificados, ou dos espécimens biológicos de onde estes serão extraídos requer alguns cuidados especiais. Em primeiro lugar, como em qualquer outro laboratório, o manuseamento de espécimens biológicos requer cuidados no sentido de proteger o operador de quaisquer riscos microbiológicos e/ou químicos associados à amostra. No entanto, e para além destas precauções universais, deve-se num laboratório de Genética molecular assumir grandes cuidados com outro tipo de perigos. Em primeiro lugar é necessário proteger as amostras do operador. Tal facto advém de todos os seres humanos possuírem nos dedos e palmas das mãos quantidades significativas de Dnases e Rnases. A função biológica destas enzimas consiste em atacar todo e qualquer DNA e RNA potencialmente viral e portanto com risco patológico. Obviamente que a mesma actividade enzimática, se aplicada às amostras biológicas a estudar *in vitro* terá como consequência a destruição dos ácidos nucleicos antes de estes poderem ser estudados. Assim, é essencial em todo o processo de estudo genético isolar os espécimens das mãos do operador, o que se consegue utilizando luvas durante todos os procedimentos.

O mesmo tipo de preocupações obriga a que as amostras biológicas sejam também processadas com recurso a reagentes e produtos descartáveis isentos de Dnases e Rnases (chamados de *molecular biology grade*). No entanto, as próprias amostras biológicas são potenciais fontes destas enzimas, pelo que se torna imperativo inactivá-las. Por este motivo, o processamento de RNA é bem mais difícil que o de DNA, já que as RNases são bem mais estáveis que as DNases, e ao contrário destas não necessitam de cofactores para funcionarem. Desta forma, não é possível inactivá-las com a adição de quelantes do magnésio (EDTA) como acontece para as DNases.

A inactivação das RNAses é eficiente com a utilização de dietilpirocarbonato (DEPC), mas a alta toxicidade deste composto, aliada à necessidade da sua eliminação por autoclavagem, impede a sua utilização em todas as soluções. Em reacções enzimáticas é possível utilizar inibidores específicos de RNAses (RNase inibidor ou abreviadamente RNasin), como o extraído do tecido placentário, para inactivar as RNAses provenientes do material celular donde é extraído o RNA.

Também os equipamentos e superfícies de trabalho devem ser descontaminados, existindo para tal reagentes que degradam as DNAses e RNases (ver fig. 6.1).



Fig 6.1 – Reagentes para descontaminar equipamentos e bancas de trabalho.

Finalmente, é necessário proteger os espécimens a analisar de contaminações cruzadas provenientes de outros trabalhos em curso no mesmo laboratório e referentes a outras amostras. Tal facto advém de os métodos de estudo genético em uso nos laboratórios de rotina terem uma elevadíssima sensibilidade, envolvendo habitualmente fases de amplificação do material genético em estudo. Por exemplo, as reacções de PCR habitualmente executadas permitem tipicamente amplificar cerca de mil milhões de vezes o material genético de que se parte. Como estas reacções raramente excedem os 50 μ L, facilmente se compreende que qualquer partícula de aerosol formado a partir dos produtos de reacção contém muito mais material genético que toda a amostra a estudar. Assim, é necessário desenvolver estratégias de protecção deste tipo de contaminação, e são essencialmente a dois níveis: 1) O trabalho num laboratório de genética molecular decorre em pelo menos três áreas físicas separadas (uma para o armazenamento de reagentes e preparação de misturas de reacção, uma para a recepção e processamento de amostras, uma para a execução das amplificações e manuseamento dos produtos de amplificação). Cada uma destas áreas deve possuir equipamento próprio e estar separadas das demais de modo automático (portas com molas e se possível corredores de separação das salas). O fluxo de trabalho deve ser unidirecional, nunca sendo possível retroceder com os produtos de reacção para a sala anterior. Em alguns casos é necessário incluir uma quarta zona de trabalho, onde se efectua a adição dos produtos de uma reacção de amplificação à reacção seguinte (reacções tipo *nested*).

2) Em todas as áreas devem ser sempre utilizadas pontas com filtros hidrófobos, por forma a impedir a contaminação das micropipetas e do ambiente com aerossóis formados durante a pipetagem. Como os filtros constituem também um potencial obstáculo ao correcto ajuste das pipetas às pontas descartáveis, devem ser utilizadas pontas

adequadas a cada pipeta e a cada função (ver fig 6.2 para exemplo de diversos tipos de pontas).

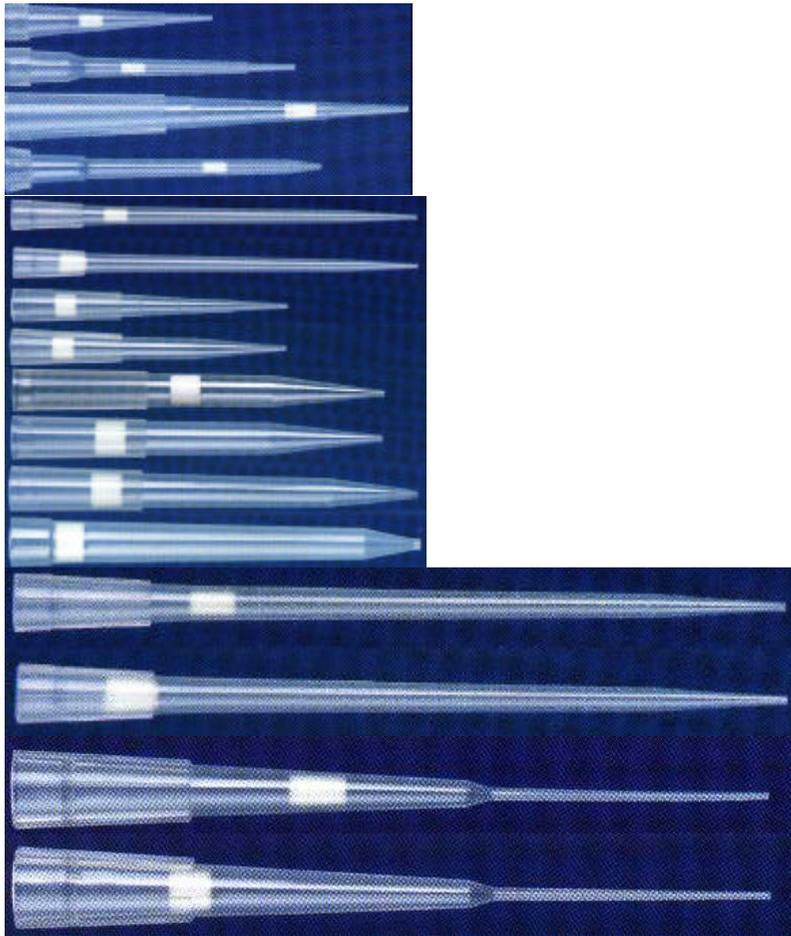


Fig. 6.2 – Exemplos de tipos de pontas com filtro

6.2 Preparação de DNA e RNA

Qualquer análise em genética molecular requer, obviamente, o estudo do DNA ou do RNA, pelo que o primeiro passo em qualquer técnica genética consiste no isolamento e purificação de uma ou mesmo das duas espécies de ácidos nucleicos.

Para o isolamento e purificação (na gíria laboratorial descritos como extracção) dos ácidos nucleicos, encontram-se disponíveis várias técnicas alternativas as quais originam DNA ou RNA com diferentes graus de pureza e de integridade física. Na maioria dos casos, estas técnicas iniciam-se com o processo de libertação dos ácidos nucleicos, o que envolve a lise das células a estudar, seguida de ataques enzimáticos e/ou químicos para destruir os componentes proteicos da mistura. Já no que diz respeito ao processo de purificação dos ácidos, várias alternativas se encontram disponíveis.

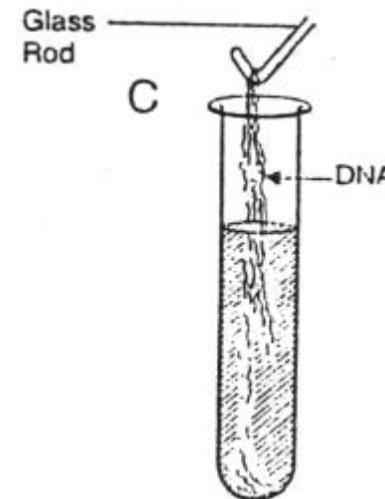


Fig 6.3- *Salting-out*

O processo de purificação mais económico e simples é denominado de *salting-out* e consiste na insolubilização dos longos filamentos de DNA por acção da concentração salina da solução (Fig.6.3). Neste método, o DNA obtido é de baixa pureza, sendo recolhido por suave enrolamento com uma vareta de vidro após adição de um sal. O DNA assim preparado necessita depois de ser submetido a um

longo processo de ressolubilização, após o que se encontra pronto para ser estudado. Note-se que apesar do baixo custo envolvido, este é um processo muito ineficiente devido á baixa pureza do DNA obtido, ao elevado teor de mão de obra necessário, e ao longo tempo de preparação que envolve.

O processo tradicional de preparação de DNA de elevada pureza e integridade física é denominado de fenol-clorofórmio (fi. 6.4). Este processo deve o seu nome ao facto de envolver o ataque químico de

proteínas e outros compostos celulares por acção do fenol dissolvido em clorofórmio. Esta mistura contém ainda habitualmente δ -hidroxiquinelona como corante (facultativo) e álcool isoamilico como regulador da densidade. Neste processo, após a libertação dos ácidos nucleicos, a solução aquosa é misturada com igual volume de solução de fenol/clorofórmio, e após homogeneização suave, é centrifugada. Como as soluções aquosa(contendo o DNA) e orgânica(contendo o fenol) são imiscíveis, após a centrifugação podemos facilmente recolher a fase aquosa (no topo do tubo) e rejeitar a fase orgânica (no fundo do tubo) e a interfase contendo um anel esbranquiçado proteínas oxidadas e precipitadas. Note-se que a remoção da fase aquosa deve ser executada com muito cuidado, para que a alta viscosidade não acarrete o arrastamento de interfase proteica. O processo repete-se ciclicamente até não ser observável a presença de interfase proteica. No final, o DNA é precipitado com a adição de um sal e um álcool, e depois de centrifugado e seco brevemente é então redissolvido. Este processo, apesar de permitir obter DNA de elevada pureza, concentração e integridade física, tem como o *salting out* a desvantagem de ser exigente do ponto de vista da mão-de-obra e do tempo de execução, envolvendo ainda a manipulação de compostos tóxicos como o fenol e o clorofórmio, o que exige condições não facilmente compatíveis com um laboratório de rotina de análises clínicas.

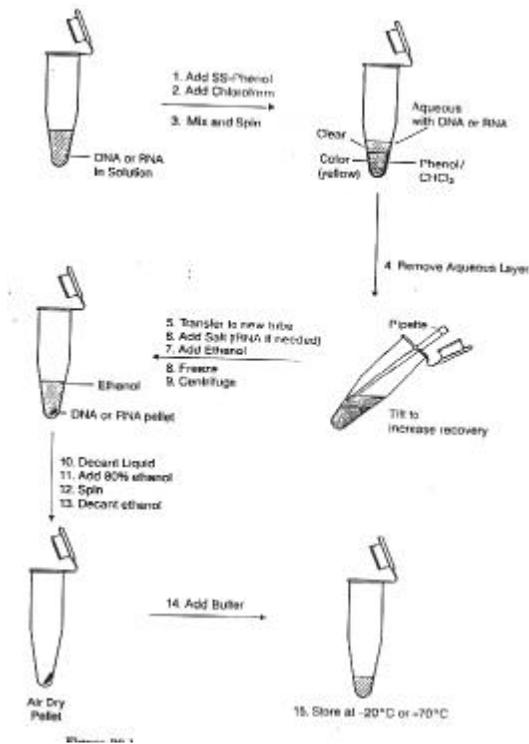


Fig.6.4– A Extração de DNA e RNA com fenol-clorofórmio

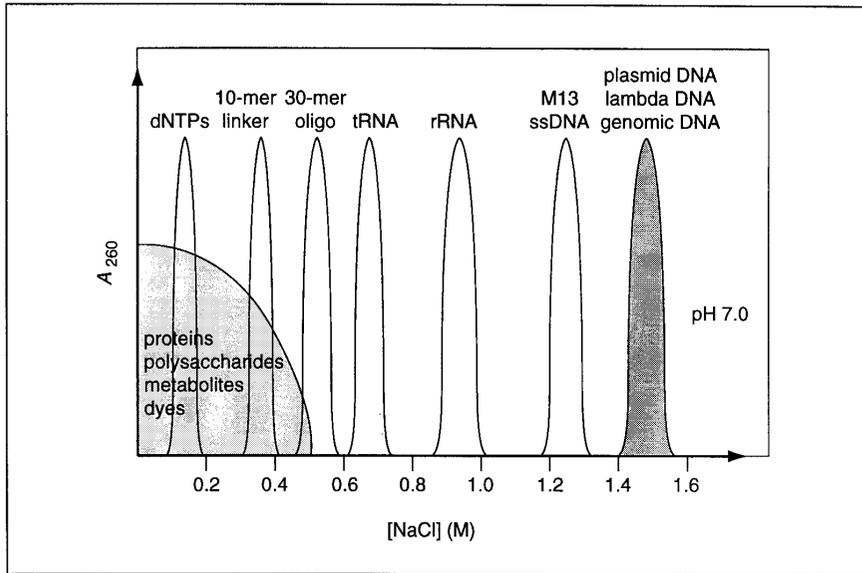


Fig. 6.5 – Separação de ácidos nucleicos e outros compostos celulares por adsorção diferencial em colunas de sílica, em função do pH e da força iônica

A grande revolução nos processos de purificação de ácidos nucleicos foi a descoberta em meados dos anos 80 de que certas formulações de sílica possuíam a capacidade de adsorver os ácidos nucleicos, de modo dependente do pH e da concentração salina. (Fig. 6.5) Esta descoberta simples, permitiu desenvolver estratégias que envolveram a adsorção dos ácidos nucleicos a uma matriz sólida de sílica após a libertação dos ácidos nucleicos e por vezes um tratamento enzimático com proteases. A formulação da matriz de sílica variou desde suspensões, a colunas de centrifugação (fig. 6.6), colunas ou matrizes de colunas de vácuo (fig 6.7), sistemas de filtração e até partículas magnéticas revestidas a sílica. Em todos os casos, o processo melhorou muito em termos de rapidez, automatibilidade, reprodutibilidade, utilização de mão de obra, rendimento e até custo.

6.10

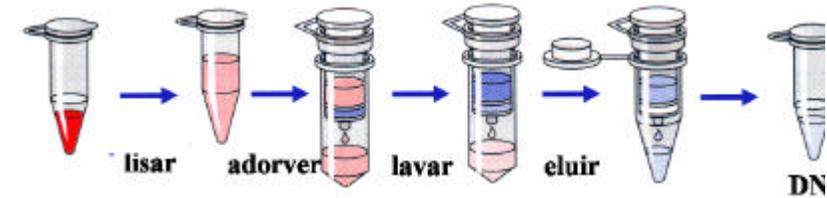


Figura 6.6 – A Purificação de DNA ou RNA por adsorção em coluna é o método mais rápido disponível. O DNA ou RN produzido é de qualidade suficiente para a realização de PCR e RT-PCR, mas devido à fragmentação que ocorre não é utilizav para Southern Blot.

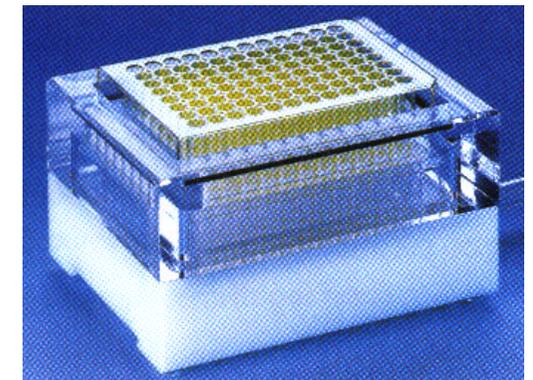


Fig 6.7 – Sistema de vácuo para a purificação de DNA recorrendo a colunas de sílica organizadas em microplaca.

Hoje em dia, a quase totalidade dos processos automáticos e semi-automáticos de extração de ácidos nucleicos envolvem a adsorção de ácidos nucleicos a partículas de sílica, num dos seus múltiplos formatos. Exemplos disto são os sistemas semiautomático da Organnon-tecknika (Nuclisens Extractor – Fig 6.8) baseado em sistemas de filtração, e os sistemas totalmente automáticos da

6.11

Roche (Magna-Pure – Fig 6.9) e da Qiagen (Biorobot – Fig 6.10) , baseados em separação magnética.

Uma técnica alternativa também utilizada por sistemas automáticos como o Ampliprep da Roche recorre á utilização de sondas de captura, o que aumenta a especificidade do processo, reduzindo no entanto a sua utilização a um restrito leque de aplicações.

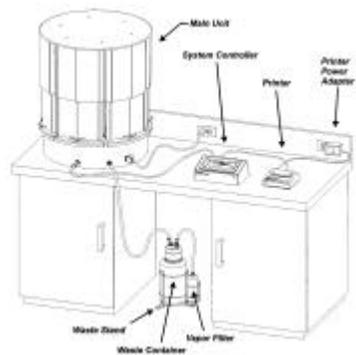


Fig.6.8 – Nuclisens Extractor



Fig. 6.9 – Magana Pure da Roche

Nos casos em que o material biológico a processar não envolve



6.10 – Biorobot da qiagen

apenas células em suspensão, mas sim tecidos, ou bactérias com parede celular resistente, os métodos de extracção devem ultrapassar ainda um obstáculo inicial que consiste em chegar às células que se encontram no interior do tecido. Como o tecido pode ser mole (biópsias, peças cirúrgicas) ou muito duro (osso, fósseis, etc), as técnicas tradicionais eram específicas para cada tipo de tecido (descalcificação para o osso, processamento em micrótomo para biópsias fixadas e degradação enzimática para tecidos frescos, ou ainda a lise por congelamento em azoto liquido seguida de maceração- Fig 6.11, ou mesmo a homogeneização típica dos preparados bioquimicos- Fig. 6.12).

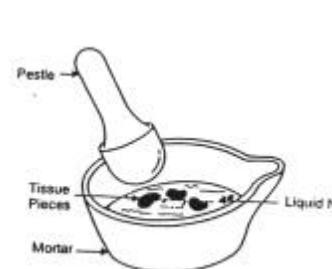


Fig. 6.11 – preparação de tecidos por congelação em azoto liquido e maceração

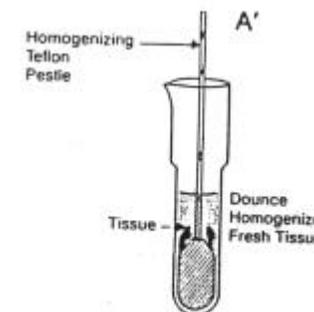


Fig. 6.12 - preparação de tecidos por homogeneização

Mais recentemente, foi lançado no mercado um equipamento (Fig 6.13), cujo nome varia com a marca (Magna Liser ou FastPrep) cujo principio de funcionamento se baseia na lise mecânica por agitação muito violenta de tubos (fig 6.14) contendo o tecido e uma matriz de lise que pode variar conforme o tecido.

O equipamento permite em muito pouco tempo e de modo autónomo ou associado aos sistemas automáticos de extracção a preparação de DNA e/ou RNA de tecidos (fig. 6.15)



Fig. 6.13 – Magna lyser



Fig 6.14 – Tubos de lise do Magna lyser ou FastPrep

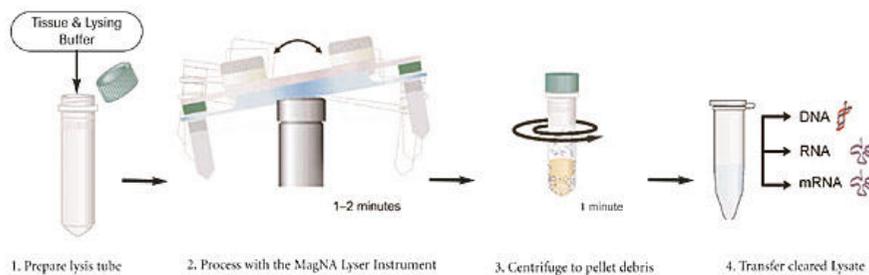


Fig. 6.15 – Esquema de funcionamento da preparação de ácidos nucleicos em Magnalyser.

6.2.1 ELECTROFORESE

A grande maioria dos métodos de genética molecular requer num determinado momento o fraccionamento de ácidos nucleicos segundo o seu comprimento. Para tal utilizam-se as técnicas de electroforese, que consistem na separação dos ácidos nucleicos

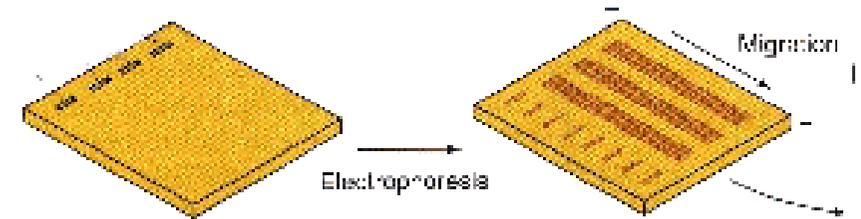


Figura 6.2 – Separação de ácidos nucleicos por electroforese em gel horizontal.

numa matriz porosa (habitualmente géis de agarose, ou acrilamida) sob a força de um campo eléctrico (os ácidos nucleicos têm carga negativa, pelo que migram em direcção ao polo positivo).

A matriz na qual os ácidos nucleicos devem ser separados depende essencialmente do tamanho dos fragmentos a separar, mas também do destino final a dar a estes uma vez separados. Existem diferentes tipos matrizes:

6.2.1.1 Géis de Agarose

- **agarose** - A agarose tem relativamente à acrilamida a vantagem de constituir uma matriz não tóxica de muito fácil preparação (basta solubilizar a agarose em pó num tampão (TAE ou TBE) a quente, e deixar então arrefecer. Várias agaroses existem, as quais permitem separar fragmentos com mais ou menos nucleótidos. A agarose normal, permite uma

boa resolução para fragmentos relativamente grandes, utilizando-se em baixas concentrações (0.8-2%). Já a agarose Nusieve (FMC-bioproducts) permite separar com grande resolução fragmentos com menos de 1000bp, pelo que se adapta melhor aos fragmentos habitualmente obtidos por PCR. Uma variação destas duas agaroses (Nusieve 3:1), não é mais que uma mistura de 3 partes de Nusieve com uma parte de agarose normal, o que origina um gel com uma viscosidade aceitável em altas concentrações (normalmente até 4%, tal como a Nusieve), mas com um poder de resolução superior quer à Nusieve, quer à agarose normal. Existem ainda agaroses com baixa temperatura de fusão. Estas agaroses têm a desvantagem de ser mais sensíveis a aumentos de temperatura durante a electroforese, mas a vantagem de facilitarem a purificação do DNA separado.

6.2.1.2 Géis de acrilamida

- **Acrilamida** - Os géis de acrilamida baseiam-se na formação de uma matriz porosa, de polímeros de acrilamida. Para a fazer, utilizam-se monómeros de acrilamida, um reagente bifuncional (bis-acrilamida), e um gerador de radicais livres (iniciador da reacção de polimerização; normalmente peróxido de amónio), bem como um catalisador da polimerização (temed). A resolução dos géis de acrilamida é muito grande podendo facilmente separar fragmentos com apenas um nucleótido de diferença, pelo que habitualmente se utiliza como matriz nos géis de sequenciação. A grande desvantagem deste tipo de matriz consiste na sua grande fragilidade, toxicidade e complexidade de preparação.

6.2.2 Reacção de polimerase em cadeia (PCR)

6.2.2.1 Princípios do método

O PCR (Polimerase Chain Reaction) é um procedimento rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de segmentos específicos de DNA. A descoberta desta tecnologia teve um enorme impacto na genética molecular, provocando uma revolução de tal ordem que em 1994 foi atribuído ao “inventor” do PCR um Prémio Nobel.

A base teórica do PCR é muito simples, baseando-se na propriedade das polimerases do DNA para catalisar a formação de uma cópia de uma cadeia de DNA, apenas quando encontram uma extremidade 3' livre. Desta forma, foi possível partir de uma molécula de DNA de cadeia dupla, desnaturá-la pelo calor, baixando de seguida a temperatura até um valor que permita a ligação específica de um oligonucleótido sintético, específico para a região 5' do segmento a amplificar. Depois desta hibridação específica, a polimerase inicia então a síntese da cadeia complementar ao “molde”. Entretanto, um processo semelhante deverá ter ocorrido em simultâneo para a restante cadeia da dupla hélice inicial, pelo que no fim deste ciclo, efectivamente foi duplicada a quantidade de DNA da zona de interesse. O processo prossegue com nova desnaturação pela temperatura, repetindo-se este ciclo um número definido de vezes. Como em cada ciclo se duplica a quantidade de DNA de interesse que existia no início do ciclo, no final do processo amplificamos 2^n vezes o segmento de DNA em que se estava interessado. Na maior parte dos casos, utilizam-se entre 24 e 35 ciclos de temperatura, pelo que no final existem $2^{24}=16,777,216$ a $2^{35}=34,359,738,368$ vezes mais cópias do segmento de interesse que inicialmente.

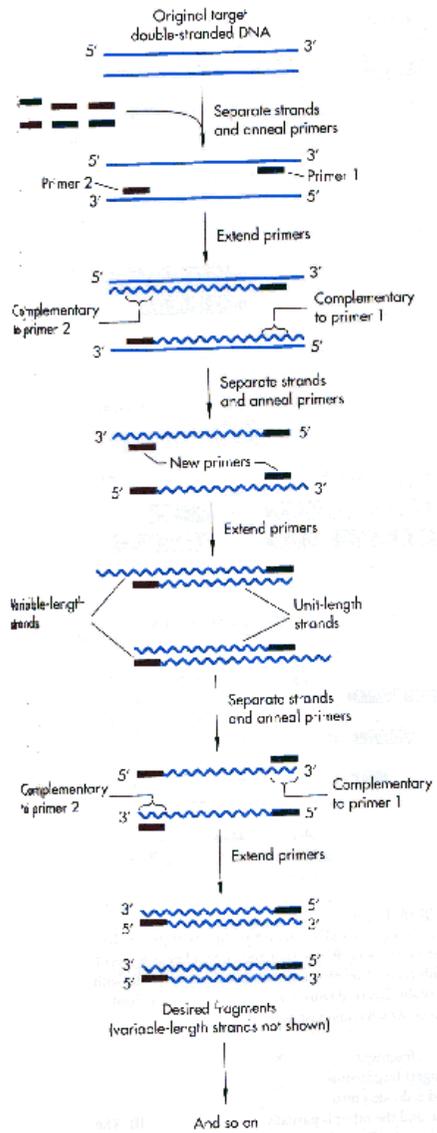


Figura 6.3 – Esquema de funcionamento de um PCR

Para implementar este procedimento é necessário incluir na mistura de reacção não só o DNA a estudar, mas também os oligonucleótidos específicos (primers), desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), e uma polimerase do DNA termoestável (para resistir às flutuações de temperatura necessárias para realizar as várias fases da reacção). Na prática outros componentes são também adicionados, para que as condições de reacção serem as ideais para a enzima utilizada. Um dos componentes que todas as enzimas até agora descobertas utilizam é o $MgCl_2$, de cuja concentração dependente em larga medida a especificidade, e qualidade do DNA amplificado.

Os primers são utilizados num largo excesso relativamente ao DNA a ser amplificado, já que são

necessárias pelo menos tantas moléculas de primer quantas as cadeias de DNA que se deseja formar. Os primers são desenhados por forma a que um tenha a sequência complementar invertida da extremidade 3' do segmento a amplificar (pelo que hibridiza directamente com esta zona do molde, deixando livre uma extremidade 3' para que a polimerase inicie o seu trabalho produzindo uma nova cadeia na direcção 5'→3'). O restante primer é desenhado por forma a ter a sequência da extremidade 5' do fragmento a amplificar. Desta forma este primer hibridiza com esta extremidade da cadeia complementar do DNA, deixando livre uma extremidade para a cópia da respectiva cadeia. Como a polimerização só termina quando a temperatura se eleva para a fase de desnaturação, no primeiro ciclo produzimos 2 tipos de fragmentos, ambos com inicio bem definido, mas com terminação incerta. No entanto, como os fragmentos produzidos no primeiro ciclo vão ser os moldes para a polimerização da cadeia complementar no ciclo seguinte, aos poucos, o produto preponderante tem ambas as extremidades determinadas pelos locais de ligação de ambos os primers.

6.2.2.2 RT-PCR

A reacção de RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), não é mais do que um PCR normal realizado a partir de um DNA sintetizado por transcrição reversa a partir de RNA. Assim, são necessários neste processo dois tipos de polimerases do DNA: primeiro uma DNA polimerase dependente do RNA (isto é a transcriptase reversa), e depois a polimerase normal. Este processo pode assim ser efectuado quer pela utilização sequencial de 2 enzimas diferentes, ajustando as condições da reacção à enzima, quer através da utilização de enzimas especiais que possuem ambas as actividades, embora em condições diferentes de reacção.

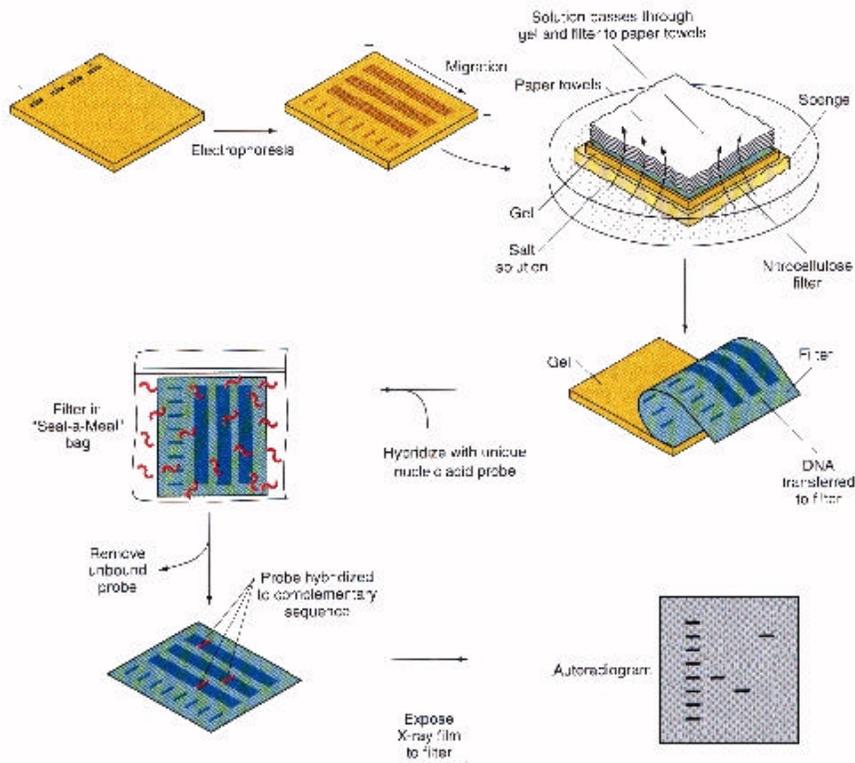


Figura 6.4 – Esquema de funcionamento de um Southern Blot

6.2.3 Southern Blot

6.2.3.1 Princípios do método

Frequentemente, após a separação dos ácidos nucleicos, torna-se necessário identificar o fragmento de interesse, numa mistura complexa de fragmentos separados.

A técnica de eleição para esse efeito é a técnica de Southern Blotting (ou Northern Blotting, conforme o ácido nucleico seja DNA ou RNA respectivamente), seguida de hibridação com uma sonda específica para o fragmento de interesse. Esta técnica consiste

na passagem dos fragmentos de DNA (ou RNA) separados, depois de desnaturados, para uma membrana de Nylon ou celulose, por capilaridade ou por vácuo, seguida da fixação do ácido nucleico à membrana. Esta é então utilizada numa reacção de hibridação, em que é colocada uma sonda de cadeia simples de DNA (ou de RNA) em contacto com a membrana, em condições químicas e de temperatura que asseguram que a sonda hibridiza apenas com o fragmento complementar. A ligação da sonda é então revelada por autorradiografia (no caso de sondas radioactivas), ou por quimoluminescência (ECL; Amersham).

6.2.3.2 Endonucleases de restrição

6.2.3.2.1 Funções biológicas dos sistemas R-M

Pensa-se que a função biológica das endonucleases de restrição é a protecção das células contra DNA externo à célula. Esta assunção

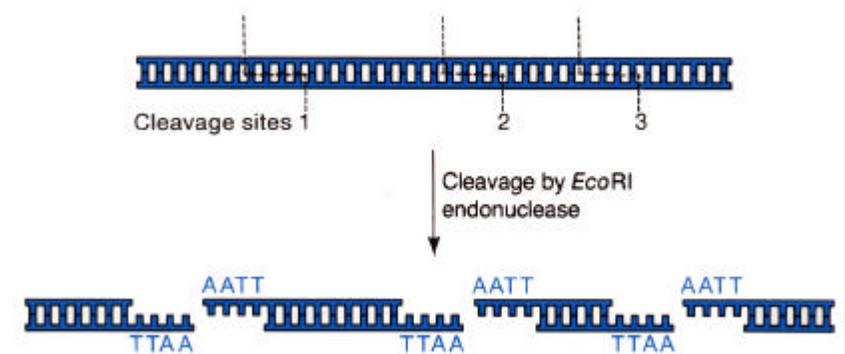


Figura 6.5 - As endonucleases de restrição fragmentam o DNA de forma específica. A especificidade é determinada pela sequência do DNA.

tem como base o facto de a grande maioria das enzimas descobertas efectivamente cortarem o DNA extracelular que in vitro se insere.

Simultaneamente o DNA endógeno é protegido devido à metilação específica de nucleótidos na sequência reconhecida, efectuada por uma metiltransferase específica. O conjunto da endonuclease de restrição e respectiva metiltransferase formam o que se designa por sistema de modificação de restrição (R-M system).

Existem pelo menos 4 tipos de sistemas R-M, distinguidos pela composição das suas subunidades, pelo tipo de sequências reconhecidas, e pelos cofactores necessários para a sua actividade. Cerca de 93% das enzimas caracterizadas pertencem ao tipo II. Juntamente com as enzimas da classe IIs (cerca de 5% das enzimas descritas) constituem o grosso das enzimas comercialmente disponíveis. As enzimas de tipo I (cerca de 1%) e as de tipo III (<1%) são relativamente pouco frequentes. Algumas outras enzimas existem que não podem ser incluídas em nenhuma destas classes.

6.2.3.2.2 *Sistemas R-M tipo II*

As enzimas de tipo II são as mais simples. Reconhecem sequências de DNA simétricas, cortando entre as sequências, deixando um terminal 3' hidroxil e um terminal 5'fosfato. Requerem apenas magnésio para a sua actividade, e as metiltransferases respectivas requerem apenas s-adenosylmetionina. Reconhecem uma variedade de sequências quase ilimitada, mas poucas reconhecem sequências com menos de 4 ou mais de 8 bp.

Estas enzimas são habitualmente compostas por um homodímero, pelo que necessariamente interactivam com uma sequência de repetição invertida, já que cada subunidade reconhece o mesmo motivo em cadeias de DNA opostas.

As metiltransferases do tipo II são habitualmente compostas por um monómero, o que pode reflectir a necessidade de metilar apenas uma das cadeias de DNA nascentes (durante a duplicação do DNA, uma das cadeias já se encontra metilada), ao contrário das

endonucleases de restrição que tem que reconhecer e cortar as duas cadeias do DNA.

6.2.3.2.3 *Sistemas R-M tipo IIs*

As enzimas do tipo IIs utilizam geralmente os mesmos cofactores que as enzimas tipo II, mas as suas sequências de reconhecimento são assimétricas e ininterrompidas, tendo 4 a 7 bp. O local de corte não se situa no interior da sequência de reconhecimento, mas a uma distância de até 20bp num dos sentidos. Nestes sistemas, a metilação é efectuada por duas metiltransferases (uma para cada cadeia), sendo em alguns sistemas metiladas bases diferentes em cada cadeia do DNA.

6.2.3.2.4 *Montar uma reacção de restrição*

6.2.3.2.4.1 *Estabilidade térmica*

As enzimas de restrição (como todas as enzimas) devem ser sujeitas a menor variação térmica possível. A temperatura a que as enzimas são habitualmente conservadas é -20°C, pelo que quando se transportam para a bancada, devem permanecer em gelo, ou idealmente num congelador de bancada, os quais mantêm uma temperatura de -20°C durante cerca de 2 horas (depende do fabricante). Devido a instabilidade das enzimas a temperatura ambiente, estas devem ser os últimos componentes da mistura de reacção a adicionar, para minimizar quer o choque entre a composição do tampão de conservação e a da mistura, quer o tempo de permanência a temperatura ambiente.

6.2.3.2.4.2 *Concentração de glicerol*

Para aumentar o tempo de conservação, as enzimas de restrição são habitualmente conservadas em 50% de glicerol. No entanto, um excesso de glicerol na mistura de reacção (>5%) ocasiona um

comportamento errático da enzima. Assim, o volume de enzima adicionado nunca pode exceder os 10% do volume total da reacção.

6.2.3.2.4.3 *Tampão de reacção*

As diferentes enzimas tem actividades diferentes em determinados tampões. Assim, as companhias que as fornecem estudaram um conjunto de tampões concentrados (habitualmente 10X), os quais são otimizados para a actividade das varias enzimas. Estes tampões devem sempre que possível ser utilizados com as respectivas enzimas, pois a actividade de uma enzima num tampão diferente do sugerido pode ser quase nula. Se a experiência obrigar a utilização de varias enzimas no mesmo tubo de reacção, deve ser escolhido o tampão que apresentar o melhor compromisso entre a actividade das duas enzimas (os fornecedores fornecem habitualmente uma tabela com a %actividade de cada enzima em cada um dos tampões que fornecem). Finalmente, algumas enzimas necessitam da adição de componentes extra aos tampões padrão (ex. BSA). Também neste caso, soluções concentradas destes compostos são fornecidas com a enzima.

Actividade das enzimas: Por definição, 1 unidade de enzima de restrição digere completamente 1µg de DNA, num volume de 50µl, ao fim de 1 hora. No entanto esta actividade é apenas indicativa, já que tipos diferentes de DNA podem possuir conformações diferentes, e um número diferente de locais de restrição. Assim, utiliza-se de modo geral 2 a 3 vezes mais enzima, e entre 3 a 16 horas de incubação. O volume da reacção não deve ser inferior a 50µl, já que aumentam os erros de pipetagem, e a probabilidade de a concentração de glicerol ser superior a 5%.

Um factor crítico na boa execução de qualquer reacção enzimática e a homogeneidade da mistura. Deve-se homogeneizar a mistura de reacção por inversão e pipetagem repetida, mas nunca utilizar o

vortex já que a violência deste pode desnaturar a enzima, deixando-a inactiva.

6.2.3.2.4.4 *Temperatura de reacção*

A temperatura de incubação da maioria das endonucleases de restrição é de 37°C, mas algumas enzimas, isoladas de bactérias termofilicas necessitam de incubações entre 50-60°C (verifique a temperatura ideal para cada enzima, junto do fornecedor).

6.2.3.3 Métodos de marcação da sonda

6.2.3.3.1 *RADIOISÓTOPOS*

6.2.3.3.1.1 ³²P

O isótopo mais comumente utilizado para a marcação radioactiva de ácidos nucleicos é o ³²P. Este radioisótopo emite partículas β e tem uma actividade específica elevada (9200 Ci/mmol na sua forma pura) e um tempo de semi-vida relativamente curto (14 dias). Existem comercialmente disponíveis todas as espécies de trifosfatos de nucleótidos marcados com ³²P, e com variadíssimas actividades específicas. Note-se que o átomo radioactivo do dNTP, para a marcação de ácidos nucleicos deve ser o γ (os átomos α e β são libertados na formação da ligação com o nucleótido seguinte).

➤ ³³P

O ³³P emite menos energia que o ³²P, mas possui idêntica capacidade de penetração. Devido à sua menor energia, este radionucleótido origina bandas mais bem definidas que o ³²P.

➤ ³⁵S

O ^{35}S emite partículas com energia ainda mais baixa que a do ^{33}P (a sua actividade específica é de 1500 Ci/mmol na forma pura), tendo no entanto um tempo de semi-vida mais longo (87 dias). Os nucleótidos marcados com ^{35}S possuem um grupo tiol em substituição de um oxigénio no grupo fosfato, o que pode inibir a actividade de algumas enzimas. Por outro lado, uma vez que a sua energia é menor, este radioisótopo induz menos danos no DNA, pelo que as sondas com ele marcadas são mais estáveis. A menor energia deste nucleótido permite também obter bandas ainda mais bem definidas que as obtidas com ^{33}P , muito embora possa levar mais tempo a imprimir o filme fotográfico. É de salientar ainda o facto de este radioisótopo ser menos nocivo para o operador de laboratório, pese no entanto o facto de também ser mais difícil de detectar contaminações com o auxílio de um contador Geiger.

➤ ^3H

O trítio é o radioisótopo de menor energia que é utilizado para a marcação de ácidos nucleicos. Com a sua actividade específica de apenas 29 Ci/mmol na forma pura, e um tempo de semi-vida de 12 anos, é o isótopo mais fraco de todos os procedimentos autorradiográficos. A sua baixa capacidade de penetração torna-o também o isótopo menos perigoso no laboratório, mas também mais difícil de detectar com contadores portáteis tipo Geiger.

➤ Outros radioisótopos

Ainda que tal aconteça com muito menos frequência, também é possível utilizar ^{14}C e ^{125}I para a marcação de ácidos nucleicos.

6.2.3.3.2 POLIMERASES DO DNA

Estão hoje em dia disponíveis uma vasta gama de polimerases do DNA, com propriedades e aplicações diferentes. Os principais

factores a ter em conta na escolha da polimerase certa para cada tipo de trabalho são:

- **remoção de nucleótidos existentes:** da existência desta actividade pode depender a fidelidade do produto formado. Todas as polimerases cometem erros. Da sua capacidade de verificar o trabalho realizado, e remover os nucleótidos erroneamente incorporados depende a fidelidade do produto final. Obviamente, a existência desta actividade também resulta numa menor velocidade de reacção, o que pode dificultar a obtenção de produtos longos. Pode assim concluir-se que a opção pela existência ou não desta actividade na enzima escolhida deve ser realizada com base no resultado pretendido. Tipicamente, as reacções que se destinam a sequenciação, ou a clonagem devem ser sempre realizadas por enzimas com esta actividade.
- **Estabilidade térmica:** também esta característica pode ser benéfica ou prejudicial, dependendo do objectivo e protocolo específicos a utilizar. Por exemplo, numa reacção de PCR, a utilização de enzimas termoestáveis evita a destruição da enzima no passo de desnaturação. No entanto, se o protocolo envolver a posterior inactivação da enzima pelo calor, é necessário escolher uma enzima termossensível.

6.2.4 Dot-Blot

Uma variante à técnica do Southern Blot consiste no dot-blot. Trata-se também de uma técnica em que o DNA é covalentemente ligado a uma membrana, sendo posteriormente hibridizado com uma sonda. A diferença fundamental entre o dot-blot e o Southern-Blot consiste na separação electroforética que ocorre no Southern, mas que não existe no dot-blot. Assim, o dot-blot não proporciona qualquer tipo de informação quanto ao peso molecular e número de

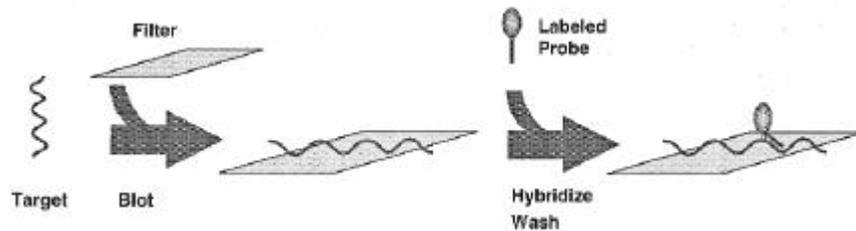


Figura 6.6 – Esquema simplificado de funcionamento do dot-blot / slot-blot

espécies de DNA responsáveis pelo sinal. Assim, este método é particularmente útil em experiências em que a discriminação qualitativa é menos importante que a quantitativa.

Uma variação ao dot-blot consiste no slot-blot. A única diferença entre estas duas técnicas consiste na forma que o sinal de hibridização origina. No dot-blot o DNA é aplicado numa fenda em círculo, originando um sinal circular. No slot-blot o DNA é aplicado numa fenda rectangular, em que uma das dimensões é muito reduzida (cerca de 1 mm), originando um sinal tipo banda. Assim, a quantificação do sinal originado pelo slot-blot é mais fácil, fiável e reproduzível.

6.3 Métodos Comerciais

A tecnologia de PCR encontra-se patenteada pela Roche, pelo que só esta empresa e suas subsidiárias se encontram autorizadas a desenvolver "kits" comerciais baseados nesta técnica.

Em resposta, várias outras companhias (Chiron, Abbot, Organnon Teknika) desenvolveram técnicas alternativas independentes da amplificação por PCR. Outras companhias (Sorin) optaram por licenciar o PCR à Roche, desenvolvendo apenas técnicas de detecção próprias.

6.3.1 Amplicor

O Amplicor da Roche é uma técnica inteiramente dependente do PCR para a detecção e/ou quantificação de espécies de RNA ou DNA em amostras biológicas.

Assim, tudo o que foi dito na secção sobre PCR se aplica a este método comercial, o qual se encontra já disponível em versão semi-automática.

Deve ser realçado que este método inclui um controlo interno de amplificação, o qual consiste numa espécie de ácido nucleico introduzida na mistura de reacção, e que vai co-amplificar com o ácido nucleico alvo, já que possui a mesma sequência terminal (o que permite aos primers hibridizarem). O DNA de controlo interno assim produzido vai no entanto ser independentemente analisado,

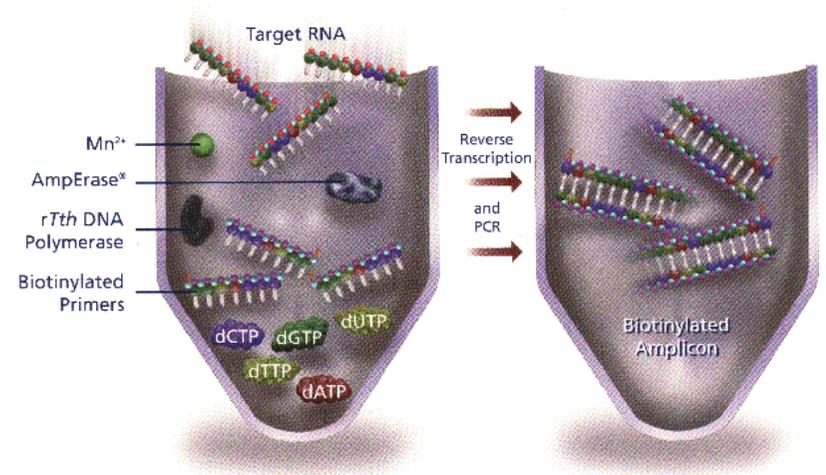


Figura 6.7 – A mistura de reacção da amplicor incorpora Amperase e dUTP para eliminação de contaminações.

pois possui uma sequência interna diferente do DNA alvo, pelo que hibridiza com sondas diferentes.

O amplicor incorpora ainda um método de eliminação de contaminação proveniente de reacções de PCR anteriores. Com efeito, em vez de dATP, o kit utiliza dUTP, pelo que se produz uma molécula de DNA com uridina. Esta é eficientemente hidrolizada pela enzima Uracil-N-glicosilase (o nome comercial da Roche é Amperase), a qual é incluída na mistura de reacção. Esta enzima tem a particularidade de não funcionar a temperatura elevada, pelo que só se encontra activa antes de se iniciar a reacção (período durante o qual elimina possíveis contaminações). No final da reacção a Amperase é inactivada por meios químicos, assegurando a preservação do produto do PCR a ser analisado.

O sistema amplicor encontra-se disponível em formato manual ou semi-automático (Cobas-Amplicor), os quais diferem no método de detecção. No primeiro caso, o amplimer encontra-se biotilado (um dos primers é biotilado), o que lhe permite ligar-se a um poço de microplaca coberto com estreptavidina. No caso do formato semi-automático, a biotina é do amplimer liga-se a uma partícula magnética, o que permite ao aparelho reter os amplimers por meio de um campo magnético. Em ambos os casos a detecção é mediada por uma sonda, e a quantificação é realizada por leitura de absorvância.

6.3.2 "Branched DNA"

A sistema da Chiron (hoje Bayer) opta não por amplificar as moléculas de ácido nucleico a serem detectadas, mas por amplificar o sinal obtido de cada molécula presente na amostra. Para tal utiliza ácidos nucleicos sintéticos com derivações ("branches") em número preciso e bem determinado, o que através de hibridizações sucessivas produz o aumento de sinal necessário.

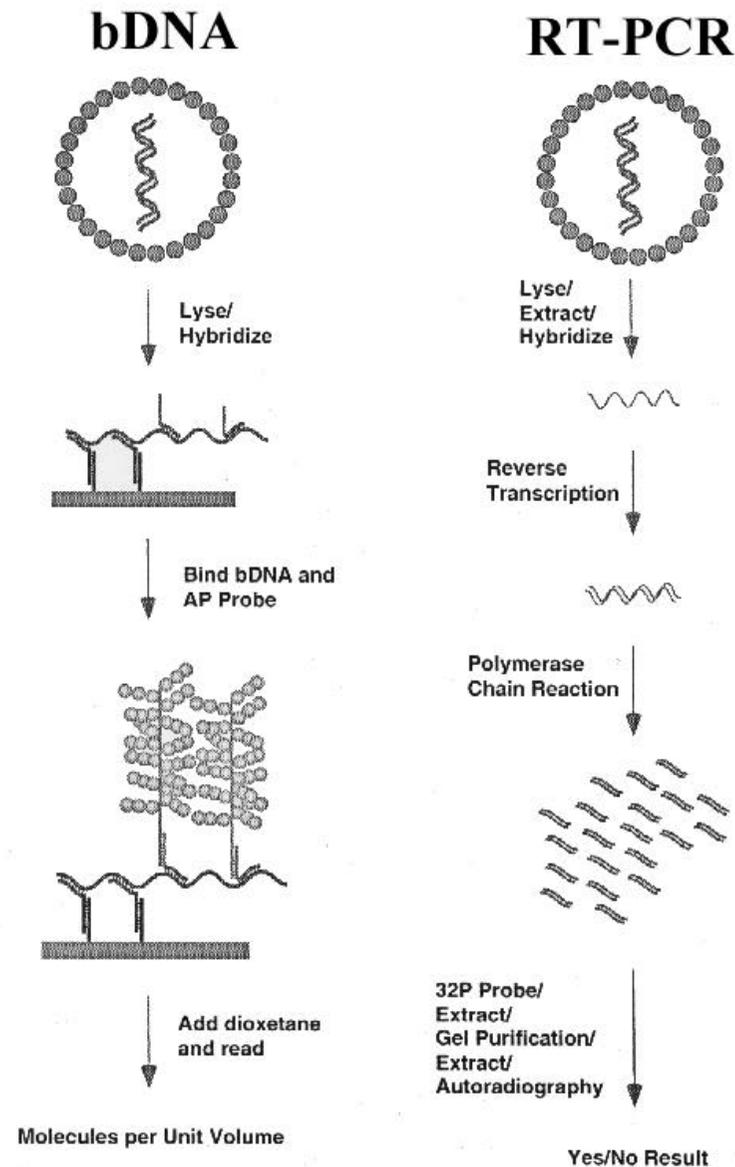


Figura 6.8 – Comparação entre o PCR e o bDNA

6.3.3 NASBA/Nuclisens

A Organon Teknika produziu um método em que com uma única temperatura, mas utilizando três enzimas diferentes se realiza à semelhança do PCR uma grande amplificação do número de moléculas de ácido nucleico em estudo. Para tal foi buscar a inspiração á própria célula, já que esta produz a partir de um único gene, milhares de cópias de transcritos.

Os métodos NASBA e o seu sucessor mais recente o NucliSens realizam assim uma série de reacções sucessivas (ver figura 6.9), que permitem produzir uma molécula de DNA a partir de uma molécula de RNA (utilizando uma RT), seguidamente a molécula de RNA inicial é degradada pela RNase H, seguindo-se a produção da cadeia complementar pela mesma RT que produziu a primeira cadeia de DNA. O facto de o primeiro primer ter incorporado uma sequência 5' não homóloga contendo o promotor da T7 RNA polimerase permite então a esta enzima produzir várias cópias de transcrito do gene alvo. Cada uma destas moléculas de transcrito pode então por sua vez ser replicada pela RT, amplificando-se o processo que passa a ser cíclico (fig. 6.9).

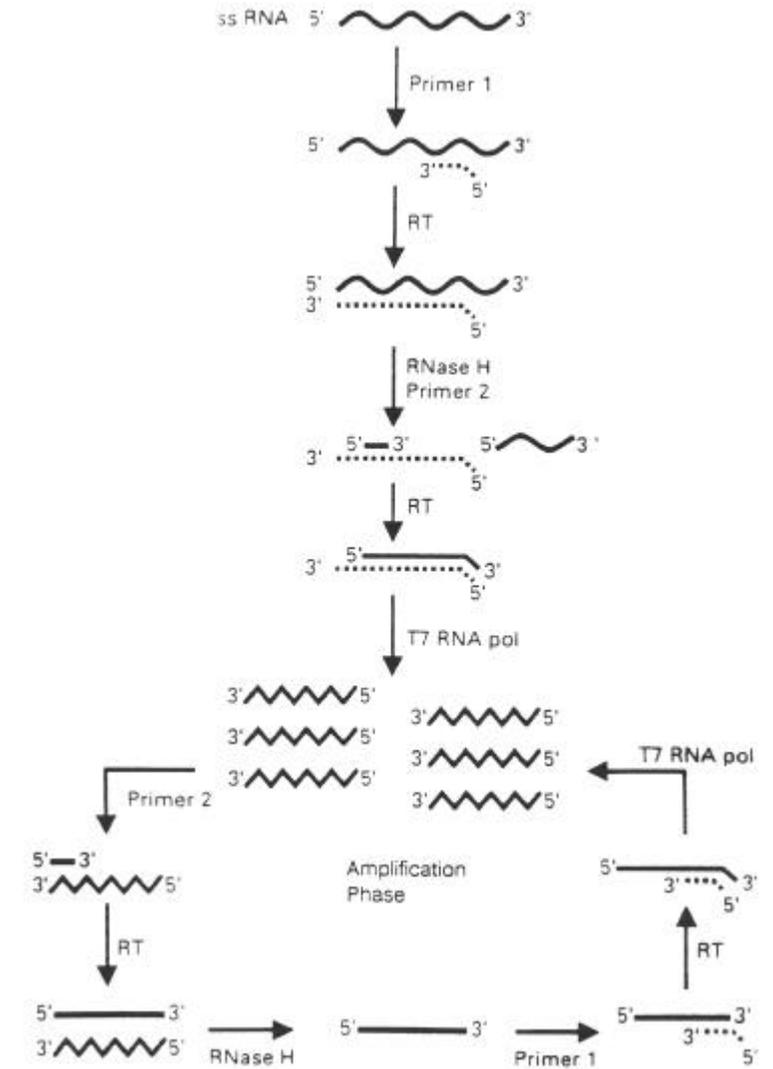


Figura 6.9 – esquema de funcionamento do NASBA/ Nuclisens

6.3.4 Ligase Chain Reaction

A técnica desenvolvida pela Abbot é em tudo semelhante ao PCR, mas não se limita a utilizar uma polimerase para produzir a amplificação da sequência alvo. Nesta técnica são utilizados primers muito longos que cobrem a quase totalidade da sequência a estudar. A parte não coberta pelos primers é uma zona central, a qual após a hibridização dos primers é sintetizada por uma polimerase, e finalmente os dois fragmentos unidos por uma ligase. Assim, a existência do gene pode ser detectada pela detecção da união dos dois primers, a qual é dependente da hibridização, e consequentemente da existência do gene alvo (fig.6.10).

A detecção foi também desenvolvida pela Abbot e denomina-se MEIA (microparticle immuno sorbent assay). Nesta técnica, micropartículas cobertas com um anticorpo reactivo contra um hapteno existente no primer A são incubadas com os "amplimers" (fig. 6.10b). Se a reacção de ligase ocorreu, esta incubação "prende" não só o primer A, mas também o primer B, o qual está conjugado com um outro hapteno identificável por um anticorpo conjugado com uma enzima que decompõe um substracto, a qual decompõe um composto e emitindo fluorescência.

Tanto o LCR como o MEIA se encontram automatizados.

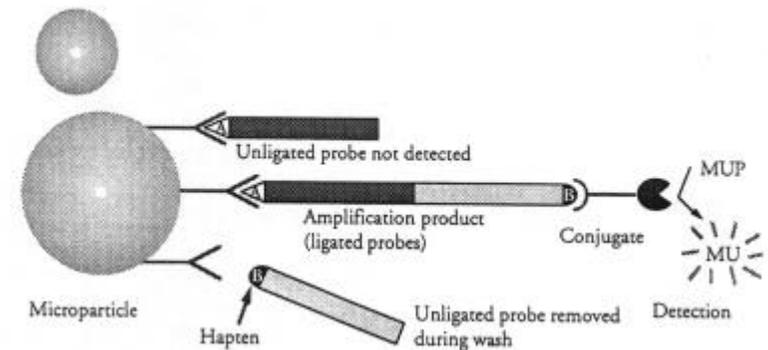
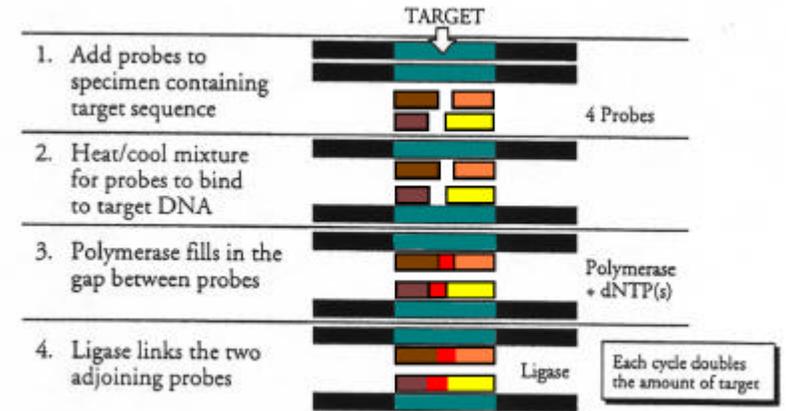


Figura 6.10 – Esquema de funcionamento da Ligase Chain Reaction (LCR) e do Microparticle Enzyme Immuno-sorbent assay (MEIA).

6.3.5 DEIA

O sistema DEIA da Sorin é um sistema genérico de detecção e quantificação da existência de moléculas de DNA complementares a uma sonda. Para o seu desenvolvimento, esta empresa isolou um anticorpo de rato reactivo contra DNA de cadeia dupla, mas não reactivo contra DNA monocatenário. Desta forma, foi possível criar um sistema em tudo idêntico a um ELISA convencional, em que o antígeno a ser estudado é a existência de DNA de cadeia dupla, ou seja DNA que hibridizou com uma sonda específica.

O desenho do sistema (figura 6.11) parte da utilização de uma placa revestida com estreptavidina, à qual é ligado uma sonda conjugada com biotina. É então efectuada uma reacção de hibridização na própria placa, que a ser eficaz produz moléculas de DNA de cadeia dupla, originando a presença do antígeno reconhecido pelo anticorpo a utilizar em seguida. Todo o resto do processo é sobreponível a um vulgar ELISA.

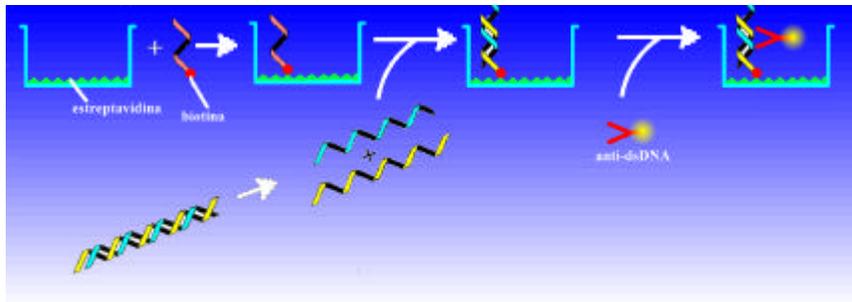


Figura 6.11 – Esquema de funcionamento do DNA Enzyme Immuno-sorbent assay (DEIA)