



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica



Componente Prática

Viseu, ESTV



CTeSP, ANÁLISES LABORATORIAIS

Técnicas de Bioquímica

EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA NUMA AMOSTRA SÓLIDA

INTRODUÇÃO

Os ácidos nucleicos são polímeros contendo sequências específicas de bases nitrogenadas ligadas a um grupo fosfórico (fosfato) e um glícido (monossacarídeo com cinco carbonos / pentoses). As bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos mais comuns são as purinas - adenina e guanina bicíclicas - e as pirimidinas - citosina, uracilo ou timina monocíclicas. Os ácidos nucleicos contêm subunidades designadas por nucleósidos (base nitrogenada + açúcar) e os nucleótidos (base nitrogenada + açúcar + fosfato). Combinações de 2 a 20 nucleótidos são definidos como oligonucleótidos e maiores combinações são os polinucleótidos.

Nos eucariontes ficam armazenados no núcleo das células e nos procariontes dispersos no hialoplasma. Podem ser de dois tipos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), ambos relacionados ao mecanismo de controlo metabólico celular (funcionamento da célula) e armazenamento da informação genética, constituindo o material genético de todos os seres vivos.

Este protocolo está dividido em várias etapas: extracção, quantificação, fraccionamento e visualização.

1 EXTRAÇÃO DE DNA

Objectivo – Extrair o DNA do interior das células, procedendo ao seu rompimento

PROCEDIMENTO

Por favor, use sempre luvas! Uso de KIT's

1. Adicionar 0,25 gramas de amostra de solo/composto nos tubos "PowerBead".
2. Agitar no vortex levemente.
3. Verifique a Solução C1.

Se a Solução C1 estiver precipitada, colocar a Solução C1 a 60°C até dissolver, antes do uso deixar baixar a temperatura da solução.

4. Adicionar 60 µl da Solução C1 e misturar por inversão várias vezes ou agitar no vortex brevemente + 1 min no ultrasons
5. Segurar os tubos "PowerBead" horizontalmente e agitar no vortex à velocidade máxima durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente.

CUIDADO: Certifique-se de não exceder 10.000 x g ou tubos podem partir.

7. Transferir o sobrenadante para um eppendorf 2 ml limpo.

Nota: Espere, entre 400 a 500 µl de sobrenadante. O Sobrenadante ainda pode conter algumas partículas do solo.

8. Adicionar 250 µl da Solução C2 e agitar no vortex durante 5 segundos.

8.1. Incubar a 4°C durante 5 minutos.

9. Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
10. Transferir até, mas não é mais do que 600 µl de sobrenadante para um eppendorf de 2 ml limpo, não tocar no pellet.
11. Adicionar 200 µl da Solução C3 e Agitar no vortex levemente.

11.1. Incubar a 4°C durante 5 minutos.

12. Centrifugar os tubos à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
13. Transferir até, mas não é mais do que 750 µl de sobrenadante para um eppendorf de 2 ml limpo, não tocar no pellet.
 14. Agite a Solução C4 para misturar antes do uso.
 - 14.1. Adicionar 1200 µl da Solução de C4 ao sobrenadante.
 - 14.2. Agitar no vortex durante 5 segundos.
15. Pipetar aproximadamente 675 µl para um tubo com filtro (Spin filter) e centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura de ambiente.
 - 15.1. Descartar o fluido que fica no tubo colector.
 - 15.2. Adicionar mais 675 µl de sobrenadante para o tubo com filtro.
 - 15.3. Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente.
 - 15.4. Adicionar o sobrenadante restante para o tubo com filtro.
 - 15.5. Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente.

Nota: é necessário um total de três cargas para cada amostra processada.
16. Adicionar 500 µl de Solução C5.
 - 16.1. Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente.
17. Descartar o fluido que fica no tubo colector.
18. Centrifugar novamente à temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g.
19. Com cuidado, colocar o filtro (Spin filter) num eppendorf de 2 ml limpo. Evite salpicar solução C5 para o filtro.
20. Adicionar 100 µl de Solução C6 no centro da membrana de filtração. (Alternativamente, estéril ADN-Free PCR Grade Water pode ser usada para a eluição a partir da membrana sílica de filtro de rotação neste passo.)
21. Centrifugar à temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g.
22. Descartar o filtro.

O DNA no tubo está agora pronto para qualquer aplicação posterior. Recomenda-se armazenar o DNA a -20°C ou -80°C . A Solução C6 não contém EDTA.

2 QUANTIFICAÇÃO

Objectivo – quantificar por espectrofotometria o DNA extraído.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E GRAU DE PUREZA DE DNA

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

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

Para a determinação do grau de pureza, faz-se a leitura da absorvância a 280nm que é proporcional à quantidade de proteínas e fenol e a 325nm que é proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes". O grau de pureza é frequentemente calculado através da relação A_{260}/A_{280} que deve ser entre 1,8 e 2,0. Para valores inferiores a 1,8, considera-se a amostra contaminada com proteína e fenol.

Em amostras contaminadas ou muito diluídas ($<250\text{ngDNA/ml}$) a concentração é determinada por emissão de fluorescência por intercalação selectiva de brometo de etídeo. Este método pode ser realizado em simultâneo com a análise da amostra por electroforese, bastando usar um padrão conveniente, aparelhagem de leitura de fluorescência em geles e "software" de tratamento de imagem.

PROCEDIMENTO

- 1 - Ligar o espectrofotômetro e regular para 260/280 e 325 nm.
- 2 - Fazer o zero de absorvância com água ultra-pura em "cuvette" de quartzo.
- 3 – Preparar as diluições da amostra de DNA (5x, 10x e 20x) em eppendorfs e agitar.
- 4- Ler as amostras nas absorvâncias definidas
- 5- Estimar a concentração de DNA pela fórmula

$(Abs_{260nm} - Abs_{325nm}) \times \text{valor tabelado} \times \text{fator de diluição} = [DNA]$ em $\mu\text{g ml}^{-1}$

Nota: No caso de amostras puras, a absorvância a 325nm dever ser aproximadamente igual a zero.

Significado e conversão para concentração das leituras de absorvância de amostras de ácidos nucleicos.

	Significado	Equivalências e intervalo de confiança
A_{260}	Proporcional à concentração de ácidos nucleicos	$A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 50\mu\text{g/ml dsDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 37\mu\text{g/ml ssDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 40\mu\text{g/ml ssRNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 20\mu\text{g/ml de oligonucleótidos em cadeia simples}$
A_{280}	Proporcional à concentração de fenol e proteínas	$1,8 < A_{260}/A_{280} < 2$; corresponde a DNA ou RNA puros
A_{325}	Proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes"	

3. PCR/ELECTROFERESE E VISUALIZAÇÃO

Objectivo – amplificar o DNA extraído aplicando o PCR, purificar e visualizar as bandas.

3.1. PCR

São componentes da PCR:

- Amostra de DNA que contém o segmento a ser amplificado (ex. DNA extraído);
- Nucleotídeos (dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs)
- Enzima DNA polimerase, que é responsável pela síntese de novas cadeias de DNA (Taq-DNA polimerase) em solução-tampão;
- Cloreto de magnésio ($MgCl_2$), co-factor da Taq-DNA polimerase;
- Dois indicadores, *primers*.

Preparação da reacção de PCR

1. Inicialmente deve-se identificar tubos de PCR com as amostras de DNA escolhidas anteriormente.
2. Após colocar cada 1 dos tubos de PCR dentro de tubos de centrífuga sem tampa e preparar a caixa com gelo para manter as amostras de DNA
4. De seguida preparar o Master Mix + Primers.
5. Posteriormente nos *ependorfs* colocar 14,5 μL de MMP; 12,5 μL de H_2O e 1 μL de DNA.
6. No final levar ao termociclador no programa definido.

Tabela 3.1: Reação de PCR

Reagente	Quantidade (µL)
dH ₂ O estéril	12,5
NZYTaq 2x Green Master Mix	12,5
primer R (10 mM)	1
Primer F (10mM)	1
DNA	1
V total	25

Condições de reação de amplificação

Tabela 3.2. Programa de amplificação de DNA.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	10	1
Desnaturação	95	00:30	
“Annealing”	*	00:30	30
Extensão	72	01:00	
Extensão final	72	10:00	1

* Temperatura óptima para cada par de *primers* (calculada com base no conteúdo AT – GC). *Primers* com maior quantidade de GC necessitam de uma maior temperatura. Esta é a temperatura de ligação dos *primers* à cadeia de DNA.

3.2. ELECTROFORESE

REAGENTES

Tampão de corrida 10x (Tris-acetato-EDTA – TAE)

Tris base ((hidroximetil)aminometano) – 48,4 g

Ácido acético glacial – 11,42 mL

EDTA 0,5M (pH =8,0) – 20mL

Perfazer com água destilada (1L)

Tampão de carga 10x (Loading Dye)

50% Glicerol

0,25% Azul bromofenol

0,25% Xileno cianol

TAE 1x

PROCEDIMENTO

Preparação do gel de agarose

1. Dissolver 0,60g de agarose em 40ml de TAE 1x.
2. Aquece-se a mistura até que a solução fique homogênea e transparente (aproximadamente 2 minutos).
3. Aguarda-se a diminuição de temperatura até aproximadamente 50°C.
4. Adiciona-se 0,7 µL de brometo de etídeo e verte-se para uma base com um pente que serve com um molde para o gel.
5. Ao arrefecer a mistura irá polimerizar.
6. A seguir tira-se cuidadosamente o pente.
7. O gel é colocado num recipiente denominado tina de electroforese.

8. Na tina de electroforese adiciona-se o tampão de corrida (*TAE 1x*) de modo a que o gel fique submerso.

Aplicação das amostras

9. Antes de aplicação, as amostras de DNA deverão ser misturadas a um tampão de carga de modo a obter o LD de 1x. Não esquecer do controlo negativo substituindo a amostra por água desionizada. Considerar o volume total de carga de 20 μL .

10. Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra é necessário aplicar 5 μL num dos poços o marcador de massa molecular (DNA Ladder).

“Corrida” de Electroforese

11. Após a aplicação das amostras, encaixa-se a tampa da tina de electroforese contendo os cabos que permitirão a ligação entre a tina e fonte continua.

12. Normalmente utiliza-se uma voltagem de 60V durante primeiros 10 minutos e depois a voltagem aumenta para 70V durante 40 minutos.

13. No caso da utilização do azul de bromofenol, quando este atingir $\frac{3}{4}$ do gel a corrida pode terminar.

14. As bandas são geralmente observadas através da exposição à luz ultravioleta.

3.3 VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS

Usar o equipamento Gel Doc TM EZ Gel Documentation System:

Sistema de captura e tratamento de imagem de géis, inclui, “sala escura”, transiluminador UV, câmara fotográfica para captura de imagens e integração no software para fácil tratamento dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

Berg, J.M. , Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2006). Biochemistry (6ª ed.). Ed. Freeman-A. Marcel Dekker, Inc., cop.

Campos, L.S.. Manual de bioquímica. Europa América, [S.d.]

Clark, J.M., Switzer, R.L. (1977). Experimental biochemistry. New York : W. H. Freeman and Company

Conn, E.E....[et al.] (1987). Outlines of biochemistry 5/E. New York : John Wiley & Sons, cop

Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry (5ª ed.). Ed. Worth Publishers.