

Biologia Molecular I

Protocolos das aulas experimentais

Rui Oliveira
Departamento de Biologia
Universidade do Minho
Braga

Extracção de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

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

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

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

O DNA deve ser guardado solubilizado a -70°C para prevenir mutações espontâneas e acção de DNases que possam contaminar a solução. No entanto, a congelação e descongelação sucessivas provoca quebras nas cadeias de DNA. Por isso, para

armazenamento por longos períodos de tempo, deve-se guardar o DNA em alíquotas a -70°C. Se o armazenamento for por um período curto, deve-se então guardar a 4°C. Regra geral, o DNA é dissolvido, para armazenamento, em tampão TE (pH8,0) em que o EDTA previne a degradação do DNA por acção queladora de metais pesados que promovem a quebra das ligações fosfodiéster e doutros catiões necessários à acção das DNases.

Extracção de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

(Protocolo simplificado segundo Holm *et al.*, 1986)

1º dia

1 - Inocular 10ml de meio YPD (em Erlenmeyer de 50ml) com a estirpe de levedura em estudo e incubar a 30°C, 160r.p.m. durante a noite.

2º dia

2 - Colher as células por centrifugação a 7000g, 2min a 4°C e ressuspender o sedimento celular em 1ml de água ultra-pura. Transferir para um microtubo de 1,5ml.

3 - Centrifugar 20-30seg à velocidade máxima numa microcentrífuga e ressuspender o sedimento em 0,15ml de SZB. Incubar a 37°C durante 30-40min com agitação frequente. Verificar a ocorrência de lise celular por observação microscópica de suspensões em triton X-100 5% (v/v). Considerar o tratamento completo quando mais de 80% das células foram lisadas.

4 - Adicionar 0,15ml de solução SDS-TE, agitar brevemente em vortex e incubar a 60°C-65°C durante 5-10min.

A partir deste passo, usar luvas nas manipulações para proteger o DNA

5 - Adicionar 0,15ml de acetato de potássio 5M, agitar brevemente em vortex e incubar em gelo durante 30-45min.

6 - Centrifugar em microcentrífuga à velocidade máxima durante 15min a 4°C. Transferir 0,3ml do sobrenadante para um novo microtubo.

7 - Adicionar 0,2ml de acetato de amónio 5M e 1ml de isopropanol pré-arrefecido. Incubar a -20°C entre 10min até várias horas.

8 - Centrifugar à velocidade máxima numa microcentrífuga, a 0°C durante 5min,

rejeitar o sobrenadante e lavar o sedimento com etanol 80% frio. Secar ligeiramente o sedimento (pode ser feito com o recurso a uma bomba de vácuo).

9 - Dissolver o sedimento em 200µl de água ultra-pura, adicionar 2µl de RNAase 10mg/ml e incubar a 37°C durante 10min.

10 - Adicionar 4µl de NaCl 5M e 2µl de proteinase K 20mg/ml. Incubar a 37°C durante 10min.

11 - Extrair com 200µl de fenol, centrifugar à velocidade máxima durante 30seg numa microcentrifuga e transferir o sobrenadante (fase aquosa) para um novo microtubo.

Ter o máximo de cuidado com o fenol pois é um forte oxidante: evitar inalar e entrar em contacto com a pele. Colocar os restos de fenol e o material com que tenha entrado em contacto em recipientes próprios.

12 - Adicionar 2 volumes de etanol absoluto frio, misturar bem e centrifugar a 12000g, 10min a 0°C.

13 - Remover com cuidado o sobrenadante com uma micropipeta. Adicionar etanol 70% até metade do volume do microtubo e centrifugar a 12000g, 2min a 4°C.

14 - Remover o sobrenadante como no passo 13, tentando eliminar todas as gotas de etanol que tenham ficado aderentes às paredes do microtubo e deixar o microtubo aberto para secar completamente o sedimento.

15 - Dissolver o sedimento em 50µl de TE.

Referências

•Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

(Pags.: E.10-E.14)

•Strathern JN and Higgins DR.1991. Recovery of Plasmids from Yeast into *Escherichia coli*: Shuttle vectors. *In: Methods in Enzymology*, vol.194, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Guthrie, C, and Fink, G (eds). Academic Press, Inc. San Diego. (Pags.: 319-329)

“Sites” da internet úteis

<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html>

“Site” completíssimo com protocolos para muitas aplicações em biologia molecular.

<http://lena.jax.org/~jcs/techniques/techniques.html>

“Site” com muitos protocolos e com conselhos práticos para determinados passos dum protocolo.

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

“Site” da Universidade de Stanford contendo uma base de dados com o genoma de levedura e ferramentas de procura e análise de genes e proteínas, bem como “links” para páginas pessoais e institucionais com protocolos de biologia molecular para leveduras.

Materiais biológicos

• *S. cerevisiae* W303-1A *a leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2*

Meios de cultura e soluções

• YPD:

Extracto de levedura 1% (p/v);

peptona 2% (p/v);

glucose 2% (p/v).

• SZB:

Sorbitol 1M;

citrato de sódio 100mM;

EDTA 60mM;

zymolase 60.000 0,5mg/ml;

2-mercaptoetanol 100mM.

• Solução SDS-TE:

SDS 2% (p/v);

tris-HCl 0,1M (pH8,0);

EDTA 10mM.

Extracção de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

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

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

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

hospedeiro, têm a sua replicação sincronizada com a replicação do cromossoma da célula, sendo o número de cópias por célula inferior a 20.

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

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

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

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

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

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

Extracção de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

Método químico por lise alcalina de preparação de DNA plasmídico em pequena escala ("miniprep")

1º dia

1 - Inocular 2ml de meio LB (contendo um antibiótico apropriado: ampicilina) com uma colónia da estirpe bacteriana. Incubar a 37°C com agitação forte (~200r.p.m.) durante a noite.

2º dia

2 - Transferir 1,5ml da cultura para um microtubo e centrifugar a 12000g, 30seg a 4°C numa microcentrífuga.

3 - Remover o sobrenadante por aspiração, deixando o sedimento o mais seco

possível.

4 - Ressuspender o sedimento em 100µl de solução I a 4°C. Agitar bem em vortex para completa dispersão do sedimento.

A partir deste passo manipular com luvas para proteger o DNA

5 - Adicionar 200µl de solução II. Misturar por inversão rápida do microtubo cinco vezes (não usar o vortex), assegurando-se que toda a superfície interna do microtubo tenha entrado em contacto com a solução. Colocar o microtubo em gelo.

6 - Adicionar 150µl de solução III. Misturar mantendo o microtubo invertido e agitando lentamente com movimentos circulares durante ~10seg.

7 - Centrifugar a 12000g, 5min a 4°C numa microcentrífuga. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo.

8 - Precipitar o DNA com 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente. Misturar no vortex e incubar 2min à mesma temperatura.

9 - Centrifugar a 12000g, 5min a 4°C numa microcentrífuga.

10 - Aspirar lentamente o sobrenadante. Colocar o tubo em posição invertida sobre papel absorvente. Remover gotas de sobrenadante que tenham ficado aderidas às paredes do microtubo.

11 - Lavar o sedimento de DNA com 1ml de etanol 70% a 4°C. Repetir o passo 10. Deixar o sedimento secar ao ar durante ~10min.

12 - Dissolver o DNA em 50µl de tampão TE (contendo RNAase A 20µg/ml), misturando brevemente em vortex. Armazenar o DNA a 4°C.

Rendimento esperado: 3-5µg DNA/ml de cultura (métodos de lise alcalina e lise por fervura)

Referências

•Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

(Pags.: 1.21-1.32)

•Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 1.6.1-1.6.10)

“Sites” da internet úteis

<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html>

“Site” completíssimo com protocolos para muitas aplicações em biologia molecular.

<http://lena.jax.org/~jcs/techniques/techniques.html>

“Site” com muitos protocolos e com conselhos práticos para determinados passos dum protocolo.

Materiais biológicos

- E. coli* DH5 α *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
- E. coli* DH5 α [pBR322]
- E. coli* DH5 α [pUC19]
- E. coli* DH5 α [YEplac195]
- E. coli* DH5 α [YEp13]

Meios de cultura e soluções

- Meio LB com ampicilina (LBamp):

Tryptone 1% (p/v);

Extracto de levedura 0,5% (p/v);

NaCl 1% (p/v).

Ajustar pH 7,5 com NaOHaq.

Autoclavar 20min, 120°C, 1bar.

Antes de distribuir o meio pelas placas e quando estiver a uma temperatura de 50°C-60°C, adicionar ampicilina 100mg/ml em água ultra-pura esterilizada para uma concentração final de 100 μ g/ml

•Solução I:

Glucose 50mM;
tris·HCl 25mM, pH8,0;
EDTA 10mM, pH8,0.

•Solução II:

NaOH 0,2N (diluido previamente dum "stock" 10N);
SDS 1%.

•Solução III:

Acetato de potássio 5M, 60ml;
ácido acético glacial, 11,5ml;
H₂O (ultra-pura), 28,5ml.

•Tampão TE:

Tris·HCl 10mM, pH8,0;
EDTA 1mM, pH8,0.

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:

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

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

Determinação da concentração e grau de pureza de DNA por espectrofotometria

- 1 - Ligar o espectrofotômetro e regular para 260nm.
- 2 - Fazer o zero de absorvância com 1ml de água ultra-pura em "cuvette" de quartzo.
- 3 – Na mesma "cuvette" de quartzo adicionar 695µl de água ultra-pura e, depois, 5µl do DNA a quantificar (diluição de 140x). Tapar a "cuvette" com parafilm® e inverter várias vezes para misturar.
- 4 - Fazer a leitura de absorvância a 260nm.
- 5 - Repetir as leituras a 280nm e 325nm.

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"	

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (Pages.: E5)

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pages.: A.3D.1-A.3D.3)

Electroforese de DNA em gel de agarose

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

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

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

Peso molecular

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

Concentração da agarose

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

Conformação do DNA

Consideram-se três conformações do DNA: forma I é o DNA circular fechado ($_{ccc}$ DNA ou "covalently closed circular DNA"); forma II é o DNA circular com uma quebra numa ligação fosfodiéster ("nicked"); forma III é o DNA linear em cadeia dupla ($_{ds}$ DNA ou "double stranded DNA"). Duma maneira geral, sob condições usuais, $_{ccc}$ DNA migra mais rapidamente do que fragmentos do mesmo tamanho de

dsDNA porque a conformação circular tem menor raio hidrodinâmico devido aos super-enrolamentos. Na forma II, os enrolamentos desaparecem por causa da quebra dum ligação fosfodiéster o que faz com que seja a forma mais lenta em electroforese.

Voltagem aplicada

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

Composição do tampão de electroforese

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

Presença de brometo de etídeo

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

Para a visualização do DNA após a corrida, usa-se o brometo de etídeo como corante específico do DNA porque tem a capacidade de se intercalar entre pares de bases. Sob radiação ultra-violeta, o brometo de etídeo emite fluorescência, surgindo corado apenas o DNA. Este corante pode ser incorporado no tampão com a vantagem de se poder parar a corrida, verificar se a migração foi ou não suficiente, e, se necessário, continuar a electroforese. No entanto, por razões de segurança, pode-se corar o gel apenas no fim da corrida. Para este caso é particularmente conveniente a adição dum corante (azul de bromofenol ou xileno de cianol) às amostras para uma avaliação correcta da migração: o xileno de cianol migra juntamente com fragmentos de ~5Kb enquanto que o azul de bromofenol migra juntamente com fragmentos de ~0,5Kb.

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

Electroforese de DNA em gel de agarose

Preparação do gel de agarose

1 - Preparar uma solução de agarose em tampão TAE com concentração final de 0,8% (p/v). Aquecer a mistura em microondas, com agitação frequente, até toda a agarose se ter dissolvido.

2 - Colocar o tabuleiro da tina de electroforese no respectivo suporte de preparação do gel ou, na sua falta, selar com fita adesiva de autoclave. Colocar o pente em posição conveniente no tabuleiro para um correcto posicionamento dos poços: distância à extremidade e à base do gel.

3 - Verter a agarose no tabuleiro até uma altura de ~5mm. Eliminar bolhas de ar que se tenham formado, aspirando com uma micropipeta e deixar solidificar à temperatura ambiente.

4 - Quando o gel se tiver formado, retirar lentamente o pente para não danificar os poços, colocar o tabuleiro na tina de electroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eléctrodo negativo, e adicionar tampão TAE até ~1mm acima do gel.

Preparação das amostras

5 - Para cada amostra, misturar num microtubo:

100-500ng de DNA

4µl de tampão de amostra (5x conc.)

água ultra-pura q.b.p. 20µl

6 - Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos.

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

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

9 - Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente eléctrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. Retirar o gel cuidadosamente para não partir e corá-lo em banho numa solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml, durante 30-45min à temperatura ambiente.

O brometo de etídeo é um agente mutagénico potente, usar sempre luvas e colocar em recipiente próprio todo o material que tenha entrado em contacto com este corante

10 - Examinar o gel à radiação ultra-violeta e fotografar para arquivar.

As radiações U.V. são extremamente perigosas, particularmente para os olhos, provocando lesões na retina. Evitar qualquer exposição dos olhos a estas radiações. Usar sempre óculos protectores ou máscaras de material opaco aos U.V.

Referências

•Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

(Pags.: 6.3-6.20)

•Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 2.5.1-2.5.9)

“Sites” da internet úteis

http://www.scioncorp.com/frames/fr_scion_products.htm

Contém “software” grátis para análise de geles para MacOs e para Windows.

<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>

Contém “software” grátis para análise de geles com possibilidade de quantificação por densitometria.

Meios de cultura e soluções

•Tampão TAE (solução "stock" 50x conc.):

Tris base 242g;

ácido acético glacial 57,1ml;

EDTA 0,5M (pH8,0), 100ml;

água ultra-pura q.b.p. 1000ml.

•Tampão de amostra (6x conc.):

Azul de bromofenol 0,25% (p/v);

xileno de cianol FF 0,25% (p/v);

glicerol 30% (p/v).

Transformação de *Escherichia coli*

Transformação é o processo de introdução de DNA em células. A primeira descrição de transformação de *E. coli* data de 1970 quando Mandel e Higa demonstraram que células de *E. coli* tratadas com soluções geladas de cloreto de cálcio e depois brevemente aquecidas, podiam importar para o seu interior DNA do bacteriófago λ . Embora nunca se tenha conseguido compreender o mecanismo de transformação, está bem estabelecido que a exposição de células de *E. coli* a cations a baixas temperaturas induz um estado de competência em que as células são capazes de importar DNA exógeno. Através de experimentação empírica, o processo de transformação foi modificado para melhorar a eficiência e reprodutibilidade de modo a adaptar esta técnica à rotina da biologia molecular. Assim, foram feitas modificações no tempo de exposição das células ao ião cálcio; foram usados outros iões como o rubídio, manganês e potássio; e adição doutros compostos como o dimetilsulfóxido ou ditiotreitol. Muitas das alterações introduzidas levaram a uma melhoria da eficiência embora, por vezes, sem se conseguir explicar as razões, sendo frequente a adopção de protocolos diferentes de acordo com o laboratório e, também, de acordo com o experimentador.

O processo químico de transformação mais usado é o método com cloreto de cálcio. Neste método, as células são cultivadas até meio da fase exponencial e lavadas e concentradas com uma solução de cloreto de cálcio. O DNA é adicionado à suspensão e depois as células são sujeitas a um choque térmico. Após breve incubação em meio não selectivo, são espalhadas em placa com meio selectivo.

Outro processo de transformação muito usado é a electroporação, tendo sido originalmente desenvolvido para a transformação de células eucariotas. Nesta técnica é aplicado um campo eléctrico forte e breve à suspensão de células com DNA o que levará, eventualmente, à abertura de poros na membrana celular através dos quais entram os plasmídeos. Para *E. coli*, o campo eléctrico é de $\sim 12,5\text{KV/cm}$ e a descarga eléctrica através dos eléctrodos aumenta rapidamente até ao máximo de voltagem. Posteriormente, a voltagem decresce exponencialmente, sendo o tempo de pulso, normalmente, de $\sim 5\text{mseg}$. O pulso eléctrico é caracterizado por dois

parâmetros: a força do campo eléctrico, e o tempo. A força do campo eléctrico é regulada previamente no aparelho para a voltagem pretendida e o tempo constante do pulso é determinado pela resistência do circuito e pela capacitância. Normalmente, para bactérias, a resistência é regulada para 200Ω e a capacitância para $25\mu\text{F}$, obtendo-se, assim, um tempo de pulso de $\sim 5\text{mseg}$. Na preparação de células competentes faz-se a lavagem e concentração das células em água ultra-pura para que a suspensão celular tenha o mínimo de condutividade eléctrica e, posteriormente, ressuspende-se o sedimento em glicerol 10% que actuará como estabilizador osmótico.

Na transformação com o método do cloreto de cálcio podem-se obter eficiências superiores a 10^8 transformantes/ μgDNA . No entanto, na rotina laboratorial é de esperar obter 10^6 a 10^7 transformantes/ μgDNA , sendo essencial para a eficiência os seguintes factores: colheita das células em fase exponencial, manutenção das células em gelo, contacto prolongado das células com cloreto de cálcio, uso de reagentes de máxima pureza e limpeza do material. Se qualquer destes parâmetros não for cumprido com rigor (por exemplo a existência de impurezas nos reagentes, de restos de detergente no material de vidro ou uma subida momentânea da temperatura das células), a eficiência da transformação pode ser drasticamente reduzida. Por electroporação, a transformação é efectuada com uma eficiência que poderá ser da ordem de 10^{10} transformantes/ μgDNA desde que se cumpram com rigor todos os parâmetros referidos para o método com cloreto de cálcio. Para ambos os métodos de transformação, é possível preparar as células competentes previamente e congelá-las a -70°C sem que haja perda de competência.

Para ambos os métodos considerados, há variações de eficiência, em maior ou menor grau, em função do tamanho e concentração do plasmídeo e da estirpe bacteriana. Por isso, cada tipo de experiência de transformação deve ser precedido por um estudo de eficiência para otimizar o protocolo. Imediatamente a seguir à transformação (choque térmico no método do cloreto de cálcio ou descarga eléctrica na electroporação), é adicionado meio não selectivo às células e procede-se a uma incubação breve (30-60min a 37°C) para que ocorra expressão do gene plasmídico de resistência ao antibiótico, de modo a haver suficiente proteína sintetizada para

conferir resistência no momento em que as células forem espalhadas no meio selectivo.

No caso frequente de selecção de transformantes resistentes à ampicilina, o gene plasmídico que confere a resistência codifica uma enzima (β -lactamase) que degrada o antibiótico. Depois de sintetizada, esta enzima é segregada para o exterior celular, formando-se uma zona em redor das colónias de transformantes com menor concentração do antibiótico ao fim de mais de 16 horas de incubação. Assim, em placas com incubação muito prolongada, pode ocorrer o surgimento de colónias satélite, identificáveis por serem muito pequenas comparadas com as colónias de transformantes, e que são resultantes do desenvolvimento de células não transformantes que, deste modo, são viáveis. O problema que estas colónias satélites poderão provocar é o de dificultar a repicagem dos transformantes para sua recuperação, bastando, para ultrapassar esta situação, analisar as placas com menos tempo de incubação.

Transformação de *Escherichia coli*

Transformação química com CaCl_2

I) Preparação de células competentes

1 - Inocular 50ml de meio LB (em Erlenmeyer de 250ml) com uma só colónia da estirpe de *E. coli*. Incubar durante a noite a 37°C, a 250r.p.m.

2 - Inocular 400ml de LB (em Erlenmeyer de 2000ml) com 4ml da cultura e incubar nas mesmas condições de temperatura e agitação até DO_{590} de 0,375.

3 - Transferir a cultura para 8 tubos de 50ml de polipropileno pré-arrefecidos e deixar no gelo durante 5-10min.

4 - Centrifugar a 1600g durante 7min, a 4°C.

5 - Ressuspender lentamente cada sedimento em 10ml de solução de CaCl_2 gelada.

6 - Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C.

7 - Ressuspender cada sedimento em 10ml de solução de CaCl_2 gelada. Manter a suspensão em gelo durante 30min.

8 - Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C.

9 - Ressuspender cada sedimento em 2ml de solução de CaCl₂.

10 - Distribuir alíquotas de 250µl por microtubos esterilizados e arrefecidos.

Congelar imediatamente a -70°C.

II) Transformação das células competentes

11 - Descongelar uma alíquota de células competentes em banho de gelo e colocar 100µl num microtubo arrefecido. Manter no gelo.

12 - Adicionar 10ng de DNA (10 a 25µl) e misturar com movimentos circulares da ponta da micropipeta. Manter em gelo durante 10min.

13 - Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo num banho a 42°C e deixar durante 2min.

14 - Adicionar 1ml de meio LB. Incubar 60min, 37°C a 250r.p.m.

15 - Espalhar em placa de LB suplementado com o antibiótico apropriado (ampicilina), diluições de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Incubar a 37°C durante 12 a 16 horas.

Fazer um controle com células competentes sem adição de DNA

Eficiência esperada: 10⁷-10⁸ transformantes/µg pDNA

Referências

•Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 13.7.1-13.7.10)

•Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E. coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition. Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK

“Sites” da internet úteis

<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html>

“Site” completíssimo com protocolos para muitas aplicações em biologia molecular.

Meios de cultura e soluções

•Meio LB ("Luria broth"):

Tryptone 1% (p/v);
extracto de levedura 0,5% (p/v);
NaCl 1% (p/v);
ajustar pH 7,5 com NaOHaq.;
autoclavar 20min, 120°C, 1bar.

•Solução de CaCl₂:

CaCl₂ 60mM
glicerol 15% (p/v)

•LB sólido com ampicilina:

Meio LB;
agar 2% (p/v);
autoclavar a 120°C, 1bar durante 20min.

Antes da distribuição pelas placas, adicionar ampicilina 100mg/ml esterilizada por filtração, para uma concentração final de 100µg/ml. Guardar as placas a 4°C.

Digestão total e parcial com enzimas de restrição. Mapas de restrição

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

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

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

De acordo com o modo de corte da cadeia dupla, há enzimas que originam extremidades sem nenhuma das duas cadeias protuberante ("blunt ends"), quando o corte é feito no eixo de simetria (*DraI* por exemplo). Enzimas que não cortam ao longo do eixo de simetria da sequência de reconhecimento deixam extremidades com uma das cadeias protuberante que pode ser a extremidade 3' (*KpnI*) ou 5' (*BamHI*). Endonucleases com a mesma sequência de reconhecimento são

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

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

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

Um factor que pode ser importante em alguns casos é o grau de metilação do DNA. A produção de enzimas de restrição é um mecanismo de defesa contra a

infecção por DNA exógeno em bactérias. Para precaver a acção contra o próprio DNA, estas enzimas de restrição promovem a metilação de nucleótidos, ficando então a sequência de reconhecimento imune à sua acção. Assim, quando se trabalha com DNA plasmídico proveniente de estirpes bacterianas com capacidade de metilação, deve-se ter em atenção, também, a sensibilidade da enzima a usar para a metilação dos nucleótidos da sequência de reconhecimento. A estratégia mais usada é o uso de estirpes bacterianas manipuladas geneticamente para a perda desta capacidade.

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

Digestão total e parcial de DNA com enzimas de restrição

Digestão total

1 - A um microtubo colocado no gelo adicionar:

0,2-1µg de DNA

2µl de tampão conveniente (10x conc.)

água ultra-pura esterilizada q.b.p. 19µl.

Misturar suavemente agitando no vortex. Manter o microtubo no gelo.

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

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

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

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

1U digere 1µg DNA/hora

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

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

5 - Analisar os produtos da reacção em electroforese em gel de agarose.

Digestão parcial

Proceder segundo o protocolo da digestão total excepto nos tempos de incubação. Para a amostra de DNA genómico, aumentar o volume de reacção para 60µl e retirar alíquotas de 20µl ao fim de 15min, 30min e 45min de incubação. Uma vez retirada cada alíquota, proceder imediatamente à inactivação da enzima por aquecimento a 65°C durante 15min ou adição de EDTA para uma concentração final de 10mM. Analisar igualmente o DNA por electroforese em gel de agarose, incluindo um controle com DNA genómico não digerido (tempo de incubação 0min).

Referências

•Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

(Pags.: 5.3-5.14)

•Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 3.0.3-3.3.2)

“Sites” da internet úteis

<http://www.promega.com/reguide/default.htm>

“Site” da empresa Promega contendo um guia dedicado a enzimas de restrição com informação exaustiva e conselhos na utilização de destas enzimas.

Meios de cultura e soluções

Consultar as fichas técnicas do fabricante das enzimas.