

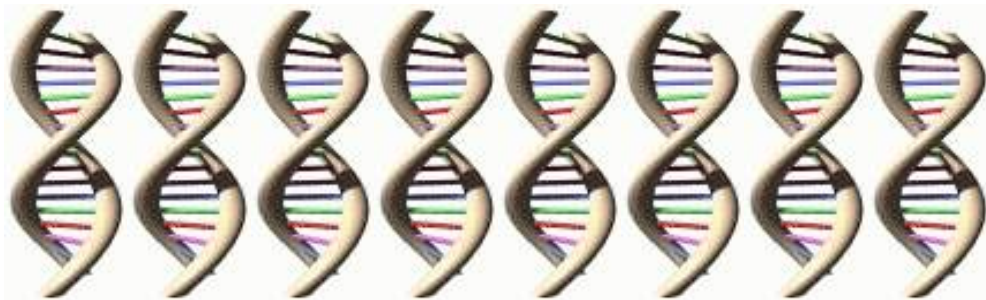


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras  
Via Anhanguera, km 174 – C.Postal 153  
13600-970 – Araras – SP.



# ***TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR***



***Sandra Regina Ceccato Antonini***

***Silvana Perissatto Meneghin***

***Alfredo Seiti Urashima***

## COORDENADORES

- **Profª Sandra Regina Ceccato Antonini** – Doutora no Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-economia Rural, CCA/UFSCar, com pós-doutorado em genética molecular de leveduras na Universidade de Sheffield, Inglaterra.
- **Profª Silvana Perissatto Meneghin** – Assistente no Depto. Biotecnologia Vegetal, CCA/UFSCar, doutoranda em Microbiologia.
- **Prof. Alfredo Seiiti Urashima** - Doutor no Depto. Biotecnologia Vegetal, CCA/UFSCar, com pós-doutorado em fitopatologia e biologia molecular na Universidade de Kobe, Japão.

Esta apostila se refere ao curso de extensão universitária “*Técnicas básicas de biologia molecular*”, oferecido no período de 12 a 16 de julho de 2004, no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), Depto. Biotecnologia Vegetal / Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos.

Endereço: LAMAM - UFSCar

Via Anhanguera, km 174 – Fone : (19) 3543-2612 / 3543-2614

13600-970 – Araras - SP

e-mail: [lamam@cca.ufscar.br](mailto:lamam@cca.ufscar.br)

Julho/2004

## INDICE

1. Introdução.....	03
2. Segurança no laboratório e disposição de resíduos perigosos.....	03
3. Introdução à biologia molecular e marcadores moleculares.....	05
4. Extração de DNA genômico total.....	24
5. Quantificação de DNA.....	26
6. Reação PCR.....	29
7. Polimorfismo por RAPD.....	33
8. Polimorfismo por RFLP.....	37
9. Análise dos resultados.....	45
10. Bibliografia.....	48
11. Preparo de soluções.....	49

## **1. INTRODUÇÃO**

Há várias técnicas em biologia molecular usadas numa ampla variedade de estudos tais como genética de populações, estudos sobre evolução ou filogenia, mapeamento e expressão gênica. Fica difícil cobrir as técnicas exatas em cada uma das áreas de estudo mas estas técnicas se desenvolveram a partir de métodos básicos. O objetivo desse curso é introduzir os alunos às técnicas básicas como PCR e suas variações, como RAPD, e também RFLP, discutindo que condições afetam essas técnicas, os cuidados, a forma de avaliação dos resultados e as aplicações nos mais diversos campos do conhecimento.

## **2. SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS PERIGOSOS**

Durante o trabalho experimental, trabalhar-se-á com reagentes potencialmente perigosos e equipamentos, sendo necessário adotar procedimentos de segurança no laboratório.

### Segurança no laboratório

1. É proibido comer, beber, fumar, estocar alimentos e usar cosméticos no laboratório.
2. Devem ser usados sapatos adequados, fechados, e com sola não deslizante em todas as áreas do laboratório.
3. Cabelos longos devem estar presos.
4. Jalecos devem ser usados para a proteção contra contaminação ou danos às roupas. Eles devem ser removidos ao deixar as áreas do laboratório para

evitar transferência de contaminantes do laboratório para as áreas normalmente limpas (como escritórios, copas, etc.)

5. As mãos devem ser lavadas depois da retirada das luvas, antes de deixar o laboratório, e a qualquer tempo depois do manuseio de materiais tidos como suspeitos de contaminação.
6. A proteção da face e dos olhos (usando óculos, visores ou outros equipamentos de proteção) deve ser feita, para evitar o impacto de objetos, substâncias prejudiciais, luz ultravioleta ou outras radiações.
7. Pipetar qualquer substância com a boca é proibido.

#### Disposição de resíduos perigosos

##### Resíduos biológicos perigosos

A definição de resíduos biológicos perigosos ('biohazard') é 'qualquer material que está ou esteve em contato com carcaça de animais e/ou produtos animais'. Isto inclui todos os resíduos associados com procedimentos microbiológicos (bactérias e vírus) e qualquer item que esteve em contato com enzimas e DNA recombinante. Portanto, a maioria das ponteiros e tubos são perigosos ('biohazardous'). Todos os materiais líquidos e sólidos contaminados ou infectados devem ser autoclavados por 40 minutos antes de serem dispostos ou reutilizados.

##### Resíduos orgânicos

Solventes orgânicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico não devem ser despejados na pia. A maioria dos materiais contaminados com solventes orgânicos devem ser colocados num recipiente reforçado. Quando estes recipientes estiverem cheios, devem ser encaminhados ao serviço de coleta especializado.

### Brometo de etídio

Os materiais contaminados com brometo de etídio (luvas, ponteiros, tubos e géis) devem ser colocados num recipiente reforçado e dispostos como os resíduos orgânicos. A disposição de solução de brometo de etídio com concentração inferior a 0,5 µg/mL pode ser feita da seguinte maneira:

- acrescentar 1 g de carvão ativado por litro de solução
- agitar por 1 hora a temperatura ambiente
- filtrar usando papel de filtro Whatman no. 1 e dispor como sólido contaminado com luvas, ponteiros, etc.

### Outras soluções

Soluções solúveis em água, não perigosas, podem ser despejadas na pia.

## **3. INTRODUÇÃO À BIOLOGIA MOLECULAR E MARCADORES MOLECULARES**

Entre todas as propriedades dos organismos vivos, a capacidade de auto-replicação é fundamental. Conter a informação genética significa não somente armazenar e transmitir ao longo das gerações, mas expressar, ou seja, servir de molde para a síntese de RNAs e alguns desses serem traduzidos nas proteínas correspondentes. Com o desenvolvimento técnico, vários avanços significativos têm sido obtidos através do isolamento, análise e síntese de seqüência de DNA e genes, e da introdução desses DNAs recombinantes em células vivas para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam sua expressão. Atualmente, os esforços estão voltados para o entendimento das relações entre ácidos nucleicos e proteínas que resultam em, virtualmente, todos os eventos genéticos na célula.

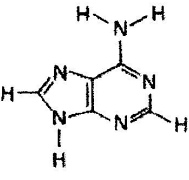
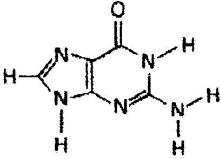
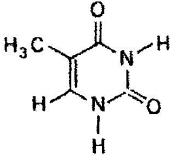
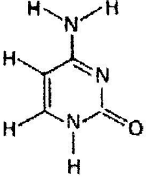
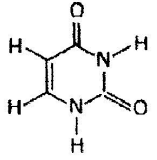
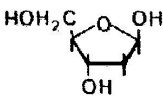
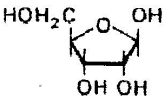
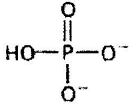
### **Estrutura do DNA**

O material genético de toda a vida neste planeta é formado por apenas seis componentes. Esses componentes são: uma molécula de açúcar

(desoxirribose), um grupamento no fosfato e quatro bases nitrogenadas diferentes: adenina, guanina, citosina e timina. A unidade essencial que forma a molécula do DNA é chamada nucleotídeo que mais precisamente, desoxinucleotídeo. Um desoxinucleotídeo consiste em uma molécula de desoxirribose com um fosfato ligado em uma posição e uma das quatro bases nitrogenadas ligada à outra posição. Os átomos de carbono da porção açúcar desoxirribose de um nucleotídeo são sempre numerados do mesmo modo. A base está sempre ligada ao carbono 1 e o grupamento fosfato está sempre ligado ao carbono 5 (Figura 1).

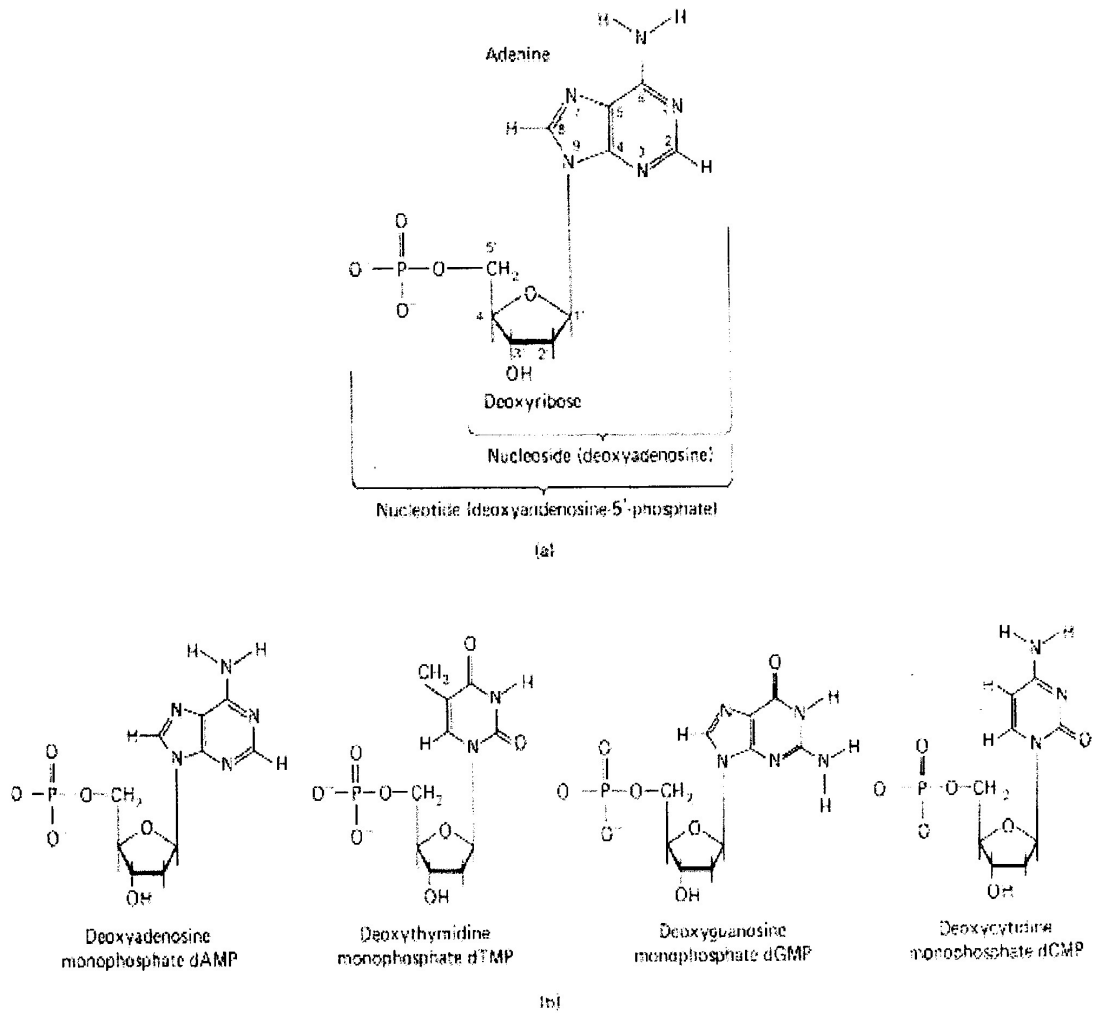
Na molécula do DNA, milhares ou milhões destes nucleotídeos estão agrupados em uma cadeia, pela união do grupamento fosfatos, ligados ao carbono número 5 de uma molécula desoxirribose, com o carbono número 3 de uma segunda molécula de desoxirribose (uma molécula de água é liberada no processo). As ligações formadas entre as moléculas de desoxirribose, através do grupamento fosfato, são chamadas ligações fosfodiéster. Como os nucleotídeos são unidos por ligações entre seus grupamentos açúcar e fosfato, freqüentemente é dito que o DNA possui um esqueleto de açúcar-fosfato (Figura 2).

O esqueleto açúcar-fosfato do DNA é um elemento estrutural importante, mas toda a informação está contida nas quatro bases nitrogenadas. A chave para a transmissão da informação genética reside em uma característica dessas bases: adenina e timina juntas formam um par químico estável e citosina e guanina formam um segundo par estável. Os pares são formados de interações químicas fracas, chamadas pontes de hidrogênio. Estes dois pares, adenina-timina e citosina-guanina, são chamadas pares de bases complementares.

	DNA only	DNA and RNA	RNA only	
Nitrogen-containing bases	Purines	 Adenine	 Guanine	
	Pyrimidines	 Thymine	 Cytosine	 Uracil
Pentoses	 Deoxyribose		 Ribose	
Phosphate		 Phosphate		

**Figura 1.** Diferenças químicas entre DNA e RNA.





**Figura 2.** O nucleótido e o nucleosídeo.

Na molécula de DNA, dois esqueletos açúcar-fosfato permanecem lado a lado, uma fita disposta da extremidade 5' para a extremidade 3' e a outra disposta da extremidade 3' para 5'. As bases ligadas a uma fita estão pareadas com suas bases complementares, ligadas à fita oposta. Assim, a seqüência de bases específicas em uma fita é refletida perfeitamente na seqüência das bases complementares na outra fita. O conhecimento da seqüência de bases de uma fita nos permite deduzir a seqüência de bases na fita complementar.

O DNA é geralmente representado como uma molécula plana, já que esta forma é mais fácil tanto para representar quanto para analisar. Na realidade, cada um dos dois esqueletos açúcar-fosfato é enrolado ao redor do outro, em uma conformação chamada dupla hélice. Os pares de bases ficam voltados para a face interna da hélice, como os degraus de uma escada. Para facilitar a representação e visualização, o DNA pode ser apresentado por um modelo no qual cada esqueleto é representado como uma fita delgada e os pares de base são representados esquematicamente. Na verdade, como a seqüência de nucleotídeos de uma fita, uma molécula de DNA ou uma região de uma molécula é freqüentemente representada pela seqüência de apenas uma fita, sempre escrita na direção de 5' para 3'.

### **Função do DNA: replicação fiel**

A estrutura do DNA sugere imediatamente como o DNA cumpre a primeira função crítica do material genético: a replicação fiel. Você pode observar que qualquer uma das duas fitas do DNA pode ser usada como um molde, ou padrão, para reproduzir a fita oposta, por meio do uso das regras de pareamento de bases complementares. Quando uma célula está pronta para replicar seu material genético, as duas fitas opostas são gradualmente “desenroladas”, expondo as bases individualmente. Cada fita, então, é usada como um molde para síntese de duas novas fitas. O resultado é duas moléculas de DNA filhas, cada uma composta por uma fita original e uma fita

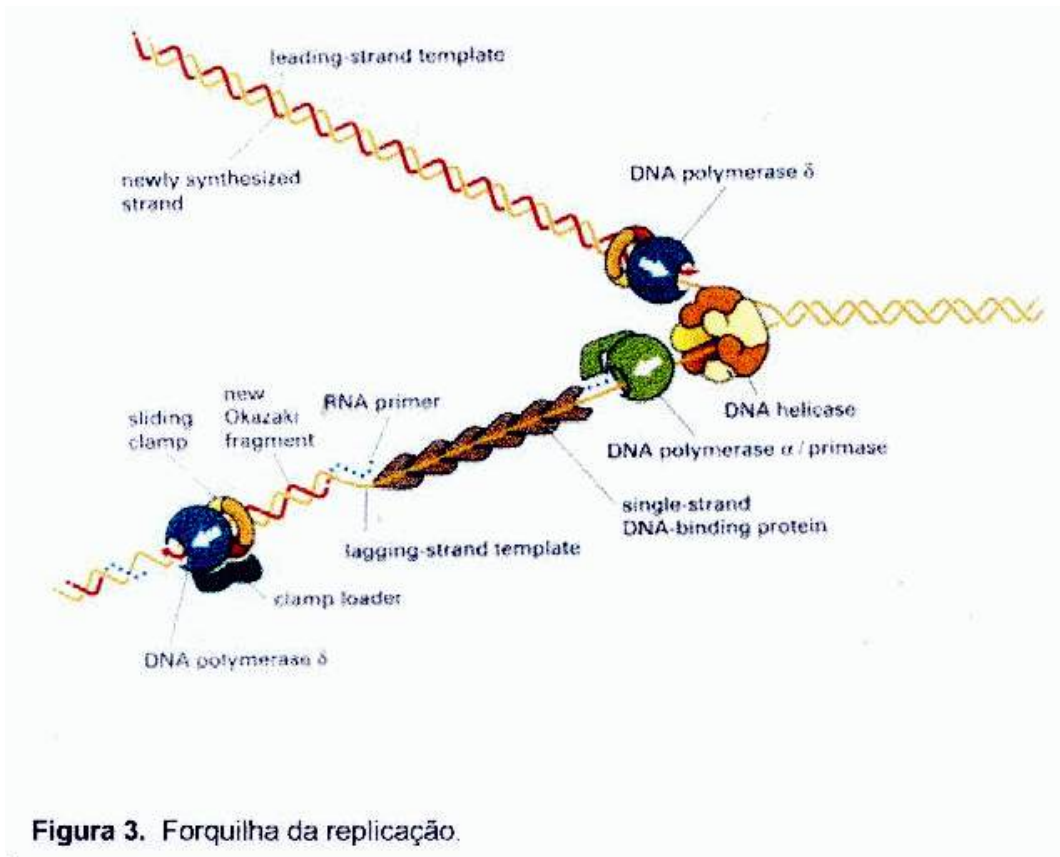
recém-sintetizada, e cada nova molécula de DNA é idêntica à molécula de DNA original.

Como ocorre a replicação do DNA na célula? O DNA é duplicado por enzimas, as proteínas que servem como cavalos de batalha das células. Enzimas celulares especializadas trabalham juntas para desenrolar a dupla hélice do DNA, capturar nucleotídeos livres, parear os novos nucleotídeos corretos com a fita-molde e formar as novas ligações do esqueleto açúcar-fosfato em crescimento. O componente principal deste conjunto de proteínas é chamado DNA polimerase. Esta é a enzima que, de fato, faz o correto pareamento das bases e forma as novas ligações fosfodiéster. Finalmente, algumas das enzimas de replicação do DNA “conferem” a nova fita de DNA, chegando erros no pareamento de bases e corrigindo quaisquer erros que tenham encontrado. Estas cuidadosas enzimas asseguram que muito poucos erros ocorram durante a replicação do DNA, de modo que a informação genética seja transmitida corretamente (Figura 3).

### **Função do DNA: transmissão da informação.**

Embora a estrutura do DNA sugira imediatamente como a molécula pode, pela duplicação, transmitir fielmente a informação genética, não é tão óbvio como uma molécula tão simples pode determinar o desenvolvimento de criaturas tão complexas e variadas quanto uma baleia azul ou uma rosa. Para entender como a estrutura do DNA elegantemente cumpre esta exigência, é necessário pensar sobre o que faz uma baleia ser uma baleia ou uma rosa ser uma rosa.

O que faz uma baleia ser uma baleia? A resposta é: suas proteínas. Assim como as proteínas cumprem a complicada tarefa de duplicar o DNA da baleia, outras proteínas cumprem praticamente todas as outras funções necessárias para a sobrevivência da baleia. Proteínas estruturais formam os tijolos e o cimento de sua pele, músculos, órgãos e tecidos; outras proteínas sintetizam componentes estruturais adicionais, como ossos e lipídeos. Proteínas transportadoras conduzem oxigênio, nutrientes, hormônios e outras



moléculas importantes através de seu corpo e entre suas células. Receptores protéicos embebidos nas superfícies celulares, ligam com grande especificidade, os hormônios da baleia, permitindo que ela cresça e se desenvolva adequadamente. Proteínas do sistema imunológico da baleia defendem-na de infecções. Proteínas catalisadoras (enzimas) digerem seus alimentos, sintetizam as gorduras que a baleia armazena, replicam seu DNA para transmissão aos filhotes e executam todas as outras tarefas metabólicas necessárias para a sobrevivência das células da baleia. Assim, as proteínas fornecem a estrutura e desempenham as funções vitais da baleia. O mesmo é verdadeiro para uma rosa, uma mosca-da-fruta, uma bactéria, um ser humano e qualquer outra forma de vida na Terra.

Não é simplesmente a natureza das proteínas de um organismo que lhe dá uma identidade particular. Afinal, as proteínas de diferentes animais podem ser muito similares – proteínas musculares, hemoglobina, enzimas de replicação do DNA e assim por diante. As proteínas de animais estreitamente relacionados podem ser muito semelhantes. Mesmo organismos tão diferentes quanto animais e plantas possuem alguns tipos de proteínas em comum.

Muito da diversidade na natureza deve-se à organização das proteínas dentro de um organismo, particularmente às proteínas estruturais e àquelas envolvidas na síntese de componentes estruturais adicionais. De certa forma, a organização de proteínas similares dentro dos diferentes corpos é análoga ao uso de uma pilha de tijolos em uma construção. Você pode usá-los para construir o muro de um edifício, uma churrasqueira ou mesmo uma calçada. Esta analogia é, obviamente, uma simplificação, já que são as proteínas que fazem os organismos diferentes, e quanto mais distantemente relacionados os organismos, mais as proteínas diferem. A organização da síntese de proteínas durante o desenvolvimento de um organismo leva à sua forma singular, quer seja uma baleia, uma rosa, um crisântemo ou um humano. Um organismo executa determinadas atividades e possui determinada aparência em razão da natureza de suas proteínas e da forma como elas são organizadas durante o desenvolvimento.

Voltando às questões. O que determina a organização da síntese de proteínas durante o desenvolvimento de um organismo? Você pode imaginar a resposta? Mais proteínas. Quando estas proteínas não funcionam adequadamente, os resultados podem ser dramáticos, como nas moscas que têm pernas no local onde deveriam ter antenas ou nas larvas de moscas com duas regiões posteriores e sem região anterior. Mas o essencial é que, no final, as proteínas organizam o corpo, compõem ou sintetizam seus componentes estruturais e cumprem suas atividades metabólicas.

Assim, para ditar o desenvolvimento dos organismos, a informação do DNA deve de algum modo ser convertida em proteínas, a “matéria-prima” do organismo. Como esta conversão ocorre? Para responder esta questão, devemos saber um pouco mais sobre as proteínas.

### **Proteínas**

Então, o que exatamente é uma proteína? Uma proteína é uma cadeia de aminoácidos. Aminoácidos são pequenas moléculas orgânicas, composta principalmente de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. As proteínas são formadas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos diferentes, pela ligação de poucos ou milhares desses aminoácidos em várias seqüências, formando cadeias. Para uma analogia simples, pense na fabricação de um colar de contas a partir de uma coleção de contas coloridas. Mas uma proteína é mais que uma cadeia linear de contas. Você deve também imaginar que a cadeia está dobrada e enrolada dentro de uma estrutura tridimensional específica.

O que torna uma proteína capaz de desempenhar sua função? Uma proteína pode desempenhar sua função graças à sua estrutura tridimensional única. Como exemplo, vamos considerar um único receptor protéico encravado na membrana externa de uma célula. Nosso receptor protéico imaginário parece uma circunferência de forma irregular, com saliências e reentrâncias. As formas dessas saliências e reentrâncias são absolutamente cruciais para a função da proteína: uma reentrância na face externa da membrana celular é o lugar onde um hormônio do crescimento deve se encaixar perfeitamente, para

transmitir à célula o sinal de crescimento. Outras saliências e reentrâncias na face interna da membrana celular são locais onde outras moléculas se encaixam perfeitamente para comunicação com o restante da célula. Por meio destas interações, o receptor protéico pode propagar à célula o sinal hormonal.

Nosso receptor imaginário ilustra um ponto crucial na função das proteínas. Uma proteína depende de sua habilidade de encaixar ou ligar-se a outras moléculas (algumas vezes outras proteínas) para desempenhar suas funções. Essa habilidade é determinada por sua estrutura tridimensional.

O que determina a estrutura tridimensional de uma proteína? Quando os aminoácidos estão unidos em uma cadeia protéica, essa cadeia imediatamente se dobra sobre ela mesma para adquirir a conformação mais “confortável” ou energeticamente mais estável. A conformação energeticamente mais estável é determinada pelas interações de todos aminoácidos que compõem a proteína. Portanto, as características dos aminoácidos que formam a proteína e a seqüência na qual eles ocorrem na cadeia protéica determinam a estrutura tridimensional final da proteína. A seqüência dos aminoácidos na cadeia é, por conseguinte, extremamente importante para a função das proteínas. Como você pode imaginar, as possibilidades para construção de cadeias protéicas diferentes e únicas são quase ilimitadas. (Imagine quantas cadeias de contas diferentes você poderia fazer usando 20 cores diferentes de contas). Esta variedade é favorável, considerando as muitas e variadas funções que as proteínas devem desempenhar. Na verdade, as formas e funções das proteínas são tão importantes à biologia molecular.

Mas, por hora, voltemos à questão de como o DNA controla o desenvolvimento de um organismo. Vimos que um organismo é a soma de suas proteínas. Vimos também que a função das proteínas depende de sua estrutura tridimensional. Além disso, sua estrutura depende da seqüência de aminoácidos na cadeia de proteína. O DNA determina as características de um organismo porque ele determina a seqüência de aminoácidos de todas as proteínas deste organismo.

Como o DNA determina seqüência de aminoácidos? O DNA contém um código genético para os aminoácidos, no qual cada aminoácido é

representado por uma seqüência de três bases do DNA. Estas trincas de bases são chamadas códons. A seqüência dos códons em uma seqüência de DNA é refletida na seqüência dos aminoácidos reunidos em uma cadeia protéica. O trecho completo de DNA necessário para determinar a seqüência de uma proteína é um gene, a unidade da hereditariedade definida pelos geneticistas clássicos. O conjunto completo dos genes de um organismo é chamado de genoma.

### **Síntese de proteínas**

O processo pelo qual proteínas são sintetizadas a partir do código genético tem diversas etapas. O DNA é , basicamente um depósito passivo de informação funcionando como um mapa. A ação da síntese de proteínas ocorre em locais especiais da célula chamados ribossomos. Por isso, a primeira etapa da síntese de proteínas é retransmitir a informação do DNA para os ribossomos. Para efetuar esta etapa, enzimas celulares sintetizam uma cópia funcional de um gene para levar seu código genético até os ribossomos . Essa cópia funcional é chamada RNA mensageiro. O mRNA transporta o código genético de uma proteína até os ribossomos. Em uma segunda etapa da síntese protéica, os códons do mRNA devem ser associados aos aminoácidos corretos. Essa etapa é cumprida por um segundo RNA chamado transportador. Finalmente, os aminoácidos devem ser ligados para formar uma cadeia protéica. O ribossomo executa essa função. Quando a cadeia proteica está completa, um sinal de terminação genético informa ao ribossomo para liberar a nova proteína na célula.



## **RNA**

A síntese de proteína, portanto, requer um segundo tipo de molécula de ácido nucléico: o RNA. Como o DNA, o RNA é formado por nucleotídeos compostos de açúcar, fosfato e uma das quatro diferentes bases orgânicas. Entretanto, existem três diferenças importantes entre o DNA e o RNA, duas delas químicas e uma estrutural. As diferenças químicas são: no lugar do açúcar desoxirribose, o RNA contém o açúcar ribose, no lugar da base Timina, o RNA tem a base Uracila. O esqueleto açúcar- fosfato do RNA é unido da mesma forma que o esqueleto do DNA. Suas bases também estão ligadas ao carbono número 1 do açúcar, como no DNA. A diferença estrutural importante é que apesar das bases do DNA também poderem formar pares complementares, o RNA é geralmente formado por apenas uma fita de esqueleto açúcar-fosfato e bases. Ele não possui a estrutura em dupla hélice com as bases pareadas como o DNA, embora seja capaz de parear com outras fitas simples de DNA ou RNA.

### **Síntese de mRNA**

O primeiro passo na síntese de proteínas é sintetizar o mRNA. Esse processo assemelha-se em muitos aspectos a replicação do DNA. Primeiro, a dupla hélice do DNA deve ser desenrolada para revelar as bases, que contém a informação. Então os nucleotídeos complementares são pareados com as bases expostas. Durante a síntese de RNA, a base Uracila substitui a Timina e pareia com a Adenina. Ligações fosfodiéster são formadas entre os nucleotídeos, e o mRNA recém-sintetizado possui uma sequência de bases que é exatamente complementar à fita-molde de DNA. O processo de usar um molde de DNA para criar uma molécula de mRNA complementar é chamado de transcrição. Moléculas de tRNA e de RNA ribossomal também são codificadas no DNA e sintetizadas por transcrição, mas diferentemente do mRNA, elas não são traduzidas em proteína.

Existem duas diferenças principais entre a transcrição e a replicação do DNA. Na replicação do DNA, ambas as fitas são usadas como molde para a geração de duas novas fitas para duas novas hélices. Na síntese de RNA, apenas uma fita do DNA é usada como molde e apenas uma fita simples de RNA é produzida. A segunda diferença é que a nova molécula de mRNA é liberada do molde de DNA à medida que é sintetizada. A dupla hélice de DNA "enrola-se de volta" a medida que o mRNA é liberado. O DNA recém sintetizado permanece como parte da nova hélice de DNA, pareado com sua fita original. Como o mRNA é sintetizado na célula? Por enzimas. A enzima que sintetiza o RNA tem uma tarefa interessante. Ela não apenas deve selecionar corretamente os nucleotídeos complementares e ligá-los, mas também deve decidir onde um gene está localizado. A hélice de DNA pode conter milhares ou milhões de pares de base. A RNA polimerase deve determinar exatamente onde iniciar e terminar a síntese de RNA de modo a transcrever um gene completo. Ela reconhece onde começar a síntese através de sinais de comandos genéticos especiais inseridos na sequência de bases do DNA. Um sinalizador importante é o promotor. Um promotor é uma sequência especial de bases de DNA que indica à RNA polimerase onde iniciar a síntese de RNA. Outros sinais informam à RNA polimerase para parar a síntese de RNA e liberar o molde de DNA, esses sinais são chamados terminadores.

### **Usando um mRNA para sintetizar uma proteína**

Após a transcrição estar completa, o mRNA desloca-se até o ribossomo, o local da síntese de proteína. O ribossomo reconhece o mRNA e o prende na posição adequada para que seus códons sejam lidos corretamente.

As moléculas de tRNA são dobradas sobre elas mesmas, parecendo-se com as folhas de um trevo. Na extremidade de um dos lóbulos, está uma sequência de três bases chamada anticódon. Esse pareia exatamente com um dos códons da fita simples de mRNA. Na outra extremidade da molécula de tRNA está um aminoácido. Cada tRNA diferente está ligado ao aminoácido correto para seu anticódon. Cada célula contém um conjunto de enzimas

extremamente específicas, cuja tarefa é reconhecer tRNAs individuais e ligá-los ao aminoácido correto, de modo que cada tipo de tRNA tenha um aminoácido específico ligado a ele. O resultado é que, quando o anticódon do tRNA pareia com seu códon do mRNA, o aminoácido correto é trazido até o ribossomo.

O ribossomo prende a molécula de mRNA para que então os tRNAs pareiem com seus códons complementares, um de cada vez, em ordem. A medida que o tRNA traz o aminoácido correto, os ribossomos ligam os aminoácidos em uma cadeia proteica crescente. Uma vez que um aminoácido tenha sido ligado à cadeia, a molécula de tRNA é separada e liberada do complexo mRNA ribossomo. Esse processo, no qual a sequência de bases do mRNA é traduzida para uma sequência de aminoácidos de uma proteína, é chamado tradução.

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”.

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações.

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação dos segmentos de DNA via PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou a reação de polimerase em cadeia), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético básico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi o pioneiro, para a análise

genética direta da variação na sequência de DNA. Tecnologias de análise molecular mais acessíveis e eficientes estão constantemente sendo aprimoradas. Métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento, e têm permitido a manipulação de enormes quantidades de dados.

### **Reação da polimerase em cadeia (PCR)**

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos.

PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Figura 4). A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*), que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo (Figuras 4 e 5).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95° C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60° C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do “primer” utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3’ dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo

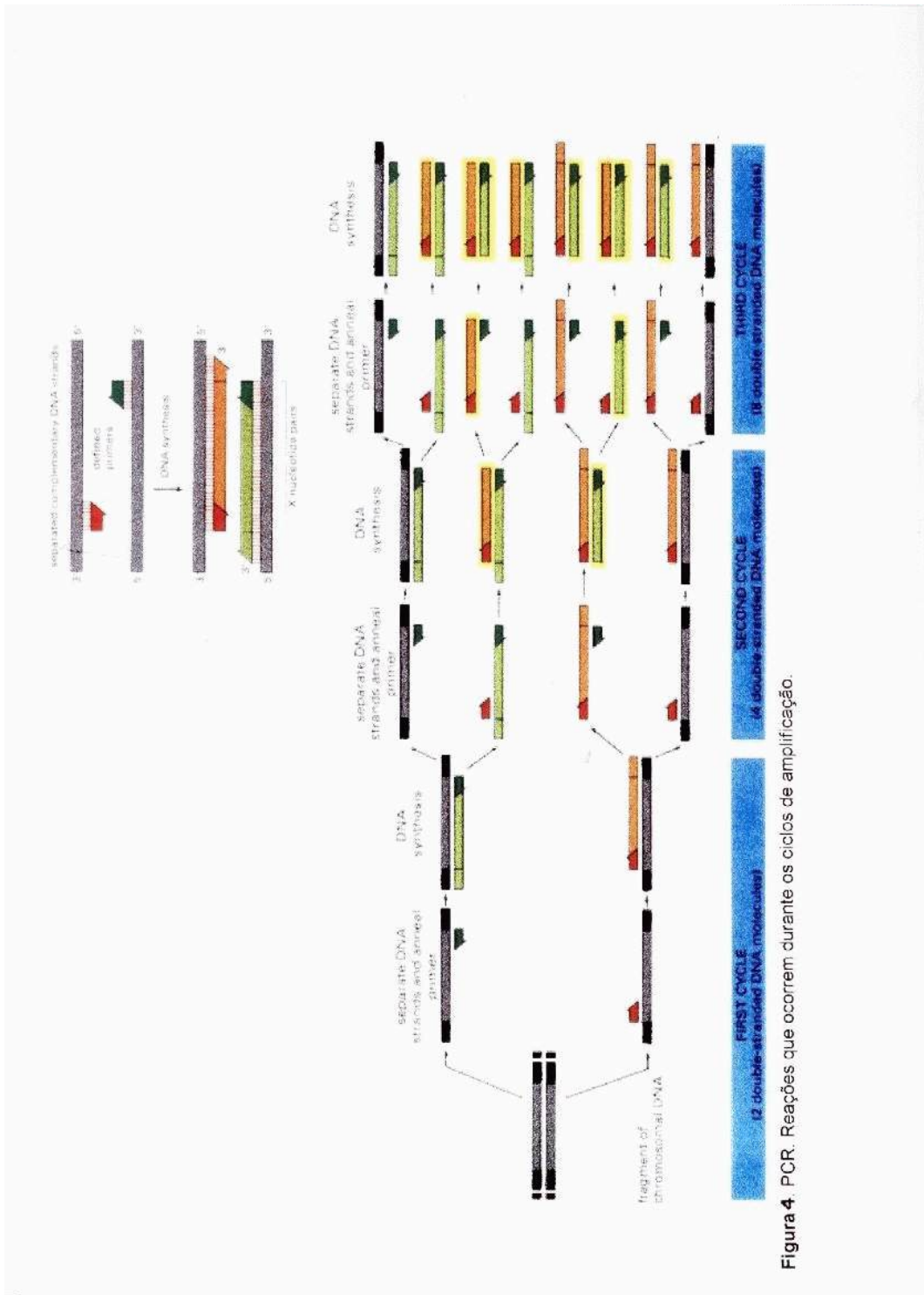
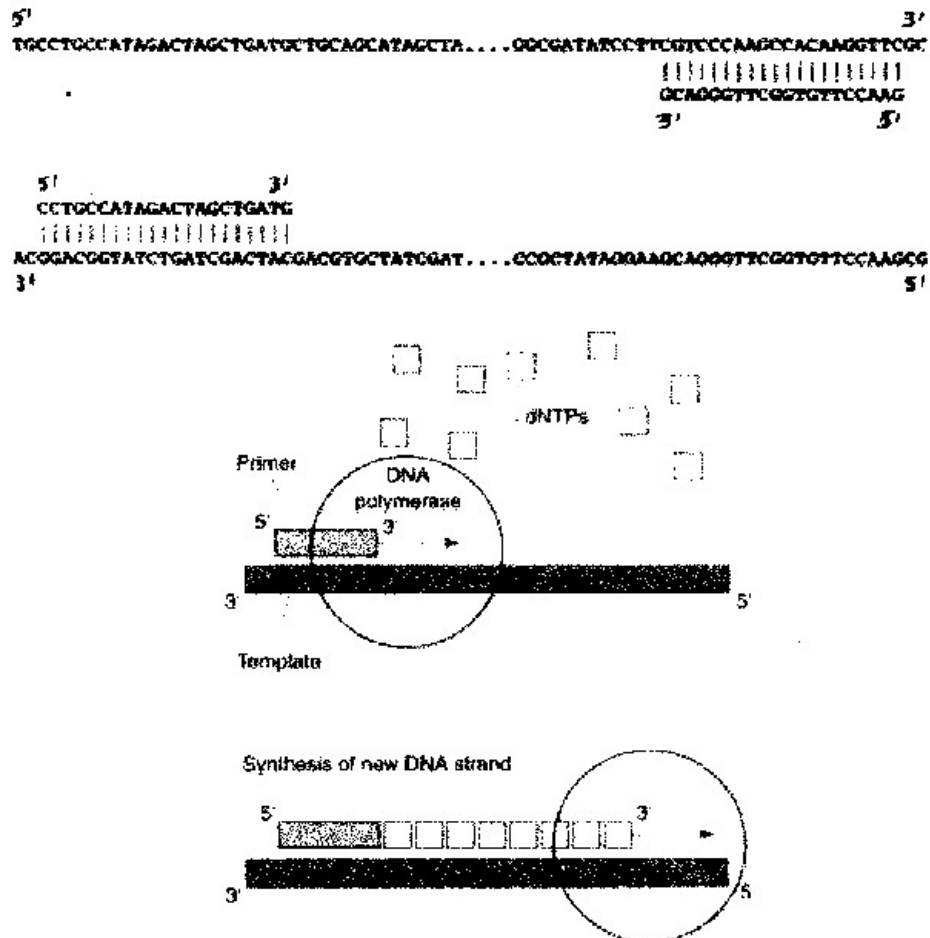


Figura 4. PCR. Reações que ocorrem durante os ciclos de amplificação.



**Figura 5.** PCR. Acima, local de anelamento dos primers. Abaixo, constituintes da reação e síntese de DNA

é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência alvo.

Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse.

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

Um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nú diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (exemplo é o brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de *primers* para amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse.

Para se conhecer estas sequências é necessária a clonagem e sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares.

### **Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)**

Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma destas variações é a tecnologia RAPD que

envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando *primers* de sequência arbitrária.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de sequência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. WILLIAMS *et al.* (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), DNA polimórfico amplificado ao acaso.

WELSH & McCLELLAND (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para a técnica, chamando-a de AP-PCR (“Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction”), uma vez que os *primers* possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma. O experimento desse grupo foi essencialmente a geração de “fingerprints” (impressões digitais) genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com *primers* um pouco mais longos.

Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR utilizando *primers* de sequência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações. Além de facilitar e acelerar os estudos que já ocorriam com as espécies tradicionais, a tecnologia RAPD trouxe uma verdadeira “democratização” da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas.



## Protocolos laboratoriais para PCR e RAPD

### 1. Extração de DNA genômico total de leveduras

Vários procedimentos de extração de DNA de tecidos vegetais ou de microrganismos têm sido descritos na literatura. O que se observa em geral é que protocolos padrão são utilizados com algumas modificações visando resolver os problemas específicos da espécie em estudo. Os protocolos se caracterizam por utilizar o detergente catiônico CTAB ('cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide') no tampão de extração e são, portanto, comumente denominados de protocolos CTAB; ou fenol (Figura 6).

A maioria dos protocolos de extração de DNA envolvem em geral cinco etapas básicas. Na primeira etapa, algum tipo de maceração mecânica é utilizada para romper as paredes e membranas celulares das células microbianas, crescidas em meio líquido e separadas desse por filtração ou centrifugação, normalmente feita na presença de nitrogênio líquido. Na segunda etapa, as células maceradas são ressuspensas em um tampão de extração, contendo algum detergente (SDS no caso da extração que utiliza fenol), antioxidantes, EDTA e agente tamponante, visando a solubilização de membranas lipoproteicas e desnaturação de proteínas enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Esta suspensão é submetida a uma temperatura entre 50 e 65<sup>o</sup> C durante 15 a 60 minutos para facilitar a solubilização e homogeneização da suspensão. Na terceira etapa, esta suspensão é submetida a uma extração com um solvente orgânico, clorofórmio-álcool isoamílico. As fases orgânica e aquosa são separadas através de centrifugação. Nesta extração, lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica inferior, enquanto que o DNA, RNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase superior (aquosa). Na quarta etapa, um álcool (isopropanol ou etanol) e sal (NaCl) são adicionados à fase aquosa. O DNA na presença de sal e álcool forma um precipitado frequentemente visível que pode ser "pescado" ou "peletizado" por centrifugação. Após lavagens do precipitado com álcool, na quinta e última

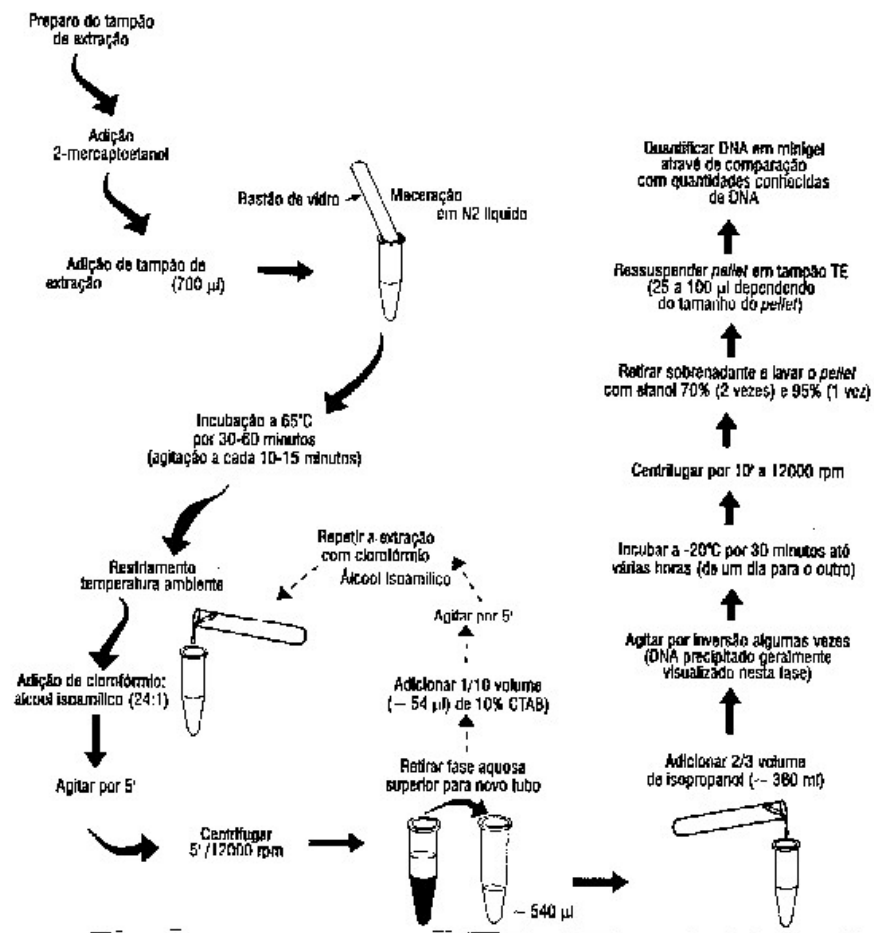


Figura 6. Diagrama esquemático do protocolo de extração de DNA

etapa, este precipitado de DNA/RNA é ressuspensionado em um tampão Tris-EDTA contendo RNase para degradar o RNA, restando apenas o DNA genômico desejado.

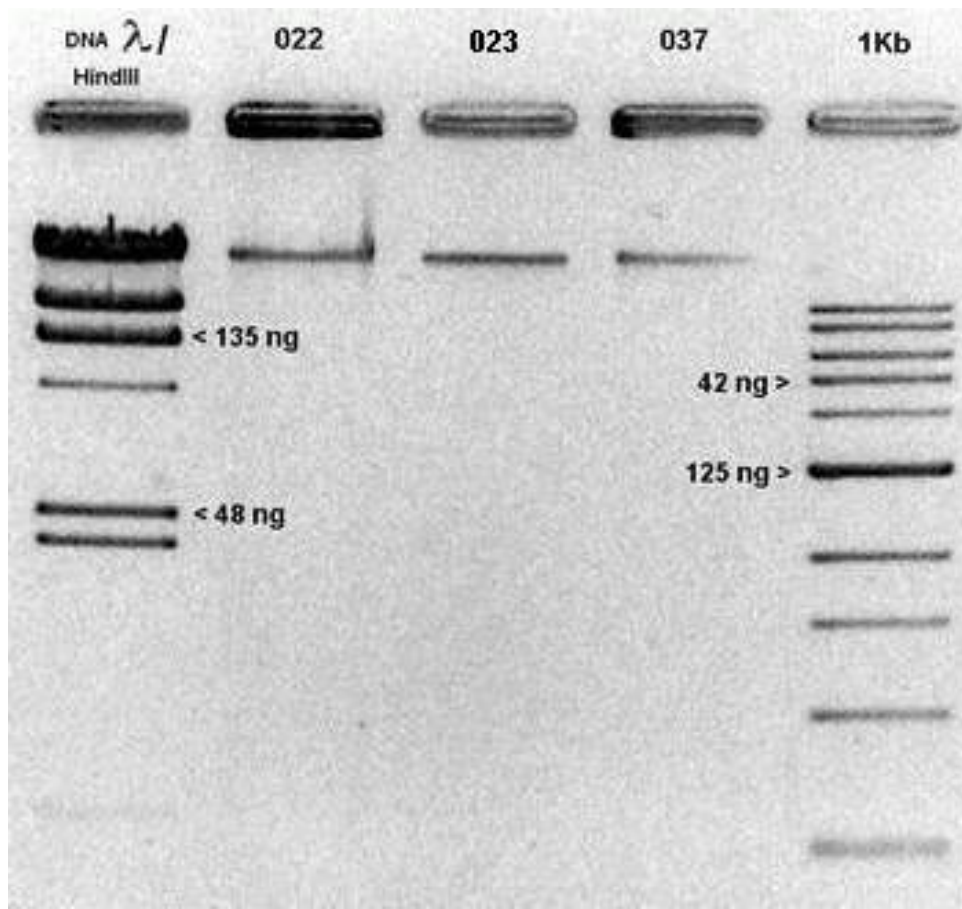
## 2. Quantificação de DNA em Gel de Agarose

Após finalizar os procedimentos de extração de ácidos nucleicos deve-se verificar a quantidade de DNA obtida. A quantidade de DNA pode ser determinada por dois métodos: a espectrofotometria ou em gel de agarose, por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio.

Neste curso, utilizaremos o método por leitura da fluorescência do brometo de etídio sob luz UV, após eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8% (p/vol). O brometo de etídio é um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucleicos sendo que a luz ultravioleta induz sua fluorescência. A quantidade observada sob UV é proporcional à massa total de DNA da amostra colocada no poço da eletroforese. Para quantificá-la, faz-se a foto em câmara polaróide (utilizamos também câmera digital) e compara-se a fluorescência da amostra àquela de um padrão conhecido (Figura 7).

Os géis de agarose são dissolvidos na presença de tampão apropriado até se obter uma solução clara e transparente. Após a sua fusão em alta temperatura (ou em forno microondas) a solução ainda quente (50°C) é colocada em um suporte ou molde em geral, de acrílico. Após ocorrer a solidificação da matriz, cuja densidade é determinada pela concentração da agarose, as amostras podem ser aplicadas.

Quando o campo elétrico é aplicado através do gel, o DNA, que é carregado negativamente em um pH neutro, migra para o ânodo. A taxa de migração é determinada por uma série de parâmetros dentre os quais podem ser citados: concentração da agarose, peso molecular do DNA, conformação do DNA, voltagem aplicada (para uma máxima resolução, a voltagem não deve ser maior que 5 V/cm – entenda-se pela medida em cm, a distância entre os eletrodos da cuba de eletroforese), direção do campo elétrico, composição do tampão, presença de agentes intercalantes, etc...



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose, onde as diferentes amostras de DNA de leveduras evidenciam a presença e integridade do DNA, juntamente com os marcadores de peso molecular (primeira e última colunas)

## Procedimento

As linhagens de leveduras serão incubadas durante 15 horas, a 30 °C, em 50mL de meio YEPD. O material a seguir será centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos em tubos Falcon de 50mL e o sobrenadante descartado. A massa celular obtida será transferida para um almofariz previamente esterilizado e congelado, onde serão adicionados aproximadamente 30mL de nitrogênio líquido, sendo o material macerado com o auxílio de um pistilo, também estéril e congelado.

No próprio almofariz serão adicionados 3mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8. Aliquotas de 1.200 µL serão transferidos para dois tubos eppendorf de 1,7mL ( 600µL em cada) e adicionados de 75µL de solução SDS 10% mais 60µL de β-mercaptoetanol, sendo os tubos agitados lentamente até que a solução se torne viscosa.

Para executar a desproteíntização do material, serão adicionados o mesmo volume (635µL) de clorofane (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico na proporção 25:24:1 vol/vol, respectivamente) aos tubos, os quais serão agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por mais 10 minutos.

Após a centrifugação, a parte superior da solução será transferida para novo tubo eppendorf com o auxílio de uma micropipeta de 100µL, sendo a parte inferior descartada. Este procedimento será repetido por 3 vezes sendo que na última vez, o clorofane será substituído por clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1 vol/vol, respectivamente.

Após a desproteíntização, será executada a precipitação dos ácidos nucleicos adicionando-se 5% do volume de Acetato de sódio 3M e o dobro do volume de Etanol absoluto resfriado a -20 °C. Os tubos serão levados ao freezer também a -20 °C onde permanecerão por 10 minutos, sendo então submetidos a centrifugação de 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante será descartado cuidadosamente evitando dispensar o pellet de ácidos nucleicos formado no fundo do tubo. Os tubos serão invertidos e deixados em temperatura ambiente para total evaporação do etanol remanescente.

O material será então ressuspensionado em 400 $\mu$ L de tampão TE 1X. A esse material serão adicionados 15 $\mu$ L de solução de RNase (10mg/mL) incubando-se a 37 °C por 1 hora, para degradação do RNA .

Será adicionado aos tubos o dobro do volume da solução Clorofórmio-Álcool isoamílico na proporção 24:1 vol/vol, sendo os mesmos agitados lentamente por inversão durante 10 minutos. A porção superior será então transferida para novo tubo eppendorf com o auxílio de uma micropipeta de 100 $\mu$ L.

Para nova separação dos ácidos nucleicos, repetir-se-á o procedimento citado anteriormente utilizando-se 5% do volume de Acetato de Sódio 3M e o dobro do volume de etanol absoluto resfriado a -20 °C. Os tubos serão levados ao freezer também a -20 °C onde permanecerão por 10 minutos, sendo então submetidos à centrifugação de 12.000 rpm por 5 minutos e lavados com cerca de 50 $\mu$ L de Etanol 70% e invertidos para a evaporação do etanol. O material genético será então ressuspensionado em 50 $\mu$ L de tampão TE 1X e congelados a -20°C.

Para estimativa da presença, quantidade e integridade do DNA o material será submetido ao processo de eletroforese em gel de agarose 0,8% junto ao marcador molecular  $\lambda$ /HindIII.

### 3. Reação PCR

#### Componentes da reação de PCR

1. **Água:** a qualidade da água do laboratório pode influenciar na reação, de preferência, use água filtrada em aparelho Milli Q e esterilize por autoclavagem, renovando os frascos semanalmente.
2. **Tampão:** o tampão da reação de PCR é fornecido juntamente com a Taq polimerase e vem 10x concentrado: faça uma leitura do folheto que acompanha a enzima para conhecer a composição do tampão de reação. A composição de tampão de reação da enzima fornecida pela Pharmacia, por

exemplo, é 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl e 15 mM MgCl<sub>2</sub>. O mais importante é observar quanto o tampão contém de Magnésio, o qual é fundamental para o funcionamento da Taq.

3. **dNTP:** os dNTPs podem vir na forma de um mix, em uma concentração de 20 mM cada. Este estoque deve ser mantido no freezer. Os estoques para uso diário podem ser preparados em volumes de 800 µl, por exemplo em 8 tubos. Para preparar este estoque de uso, pipete 100 µl de dNTP 20 mM e adicione 700 µl de água. Mantenha as aliquotas no freezer, use conforme necessidade e, renove sempre estes estoques (2,5 mM).

Além disso, os dNTPs podem vir separadamente, em concentrações por exemplo, de 100 mM. Para preparar o mix misture partes iguais de tal forma a reduzir a concentração de cada nucleotídeo para 25 mM e depois prepare os estoques de uso diário, diluindo 10X, e portanto tendo-se uma concentração de 2,5 mM. As concentrações finais de dNTP na reação variam de um laboratório para outro. Na formulação original proposta por Williams et al, 1990, a concentração é 100 µM.

4. **Primers:** os *primers* vêm na forma de pellets liofilizados. Os de sequência arbitrária são comercializados pela Operon Technologies, CA, USA, e custam cerca de US\$ 150,00 sendo fornecidos em Kits contendo 20 oligonucleotídeos. Cada Kit é designado por uma letra do alfabeto, A, B, C, D etc. e os respectivos *primers*, por algarismos: OPA-1, OPA-2, OPA-3 etc. Para cálculo do volume de TE a ser adicionado nos pellets, verifique no folheto que acompanha o Kit, o peso molecular de cada um deles. Prepare estoques de 50 µM, seguindo o raciocínio do exemplo abaixo.

As informações dadas pelo fornecedor são as seguintes:

OP-3: 5' CCTGATCACC 3' – Peso Molecular 2939 – Pellet com 17 µg

$2939 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 1 \text{ Molar}$

$2939 \mu\text{g} / 1 \times 10^{-3} \mu\text{l} = 1 \text{ mM}$

$2939 \mu\text{g} / 1 \times 10^{-6} \mu\text{l} = 1 \mu\text{M}$

$2939 \mu\text{g} / 2 \times 10^{-4} \mu\text{l} = 50 \mu\text{M}$

Se o frasco contém 17 µg, para obter uma solução 50 µM, então deve-se adicionar 116 µl sobre o pellet.

Os estoques de 50 µM devem ser mantidos no freezer. Para a obtenção dos estoques de trabalho diário dilua-o de tal forma a obter uma concentração de 2,5 µM, ou seja 1/20. Ao adicionar 2,5 µl da solução de primer (2,5 µM) na reação de RAPD de 25 µl, a concentração final de primer será de 250 nM. Concentrações entre 200 a 400 nM são as mais usuais.

5. **Mg ++:** O magnésio é um cofator da Taq polimerase. A concentração deste cofator na reação pode variar, em geral, desde 1,0 até 4,0 mM. Convém otimizar para cada enzima e material biológico, a concentração mais adequada.

O Magnésio vem na forma de  $\text{MgCl}_2$ , acompanhando o tubo de enzima, em uma concentração de 50 mM. É conveniente reduzir a concentração deste para 10 mM, por exemplo, uma vez que ocorre precipitação deste em pH alcalino (o tampão da reação tem pH em torno de 8,0) e em baixa temperatura. Verifique também, se o tampão da Taq já contém  $\text{MgCl}_2$ . No caso afirmativo, acrescente somente o volume necessário para obter a concentração final desejada.

6. **Taq DNA polimerase:** este é o componente mais caro da reação, variando de 30 até 60 centavos de dólar americano a unidade de enzima, dependendo do fabricante. A taq vem em tampão contendo glicerol, em concentrações de 5 unidades/ µl. São usuais concentrações de 1, 1,5 e 2 unidades por reação.



7. **DNA molde:** os DNAs devem ser extraídos, quantificados em gel de agarose, observando-se se há degradação ou não. Esporadicamente, deve-se verificar no gel, a integridade dos DNAs mantidos no freezer ou em geladeira. As diluições de uso (5ng/ $\mu$ l) são feitas em H<sub>2</sub>O ou em 10 mM Tris-HCl.

As concentrações de DNA genômico necessárias à reação de amplificação na presença de primers arbitrários (RAPD), varia em função da espécie. Para a maioria das espécies a concentração ideal está em torno de 25 ng.

### Procedimento

A região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal incluindo o gene 5,8S será amplificada através da reação PCR. Utilizar-se-ão os *primers* ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

A reação PCR será feita num volume de 100  $\mu$ L, contendo 100 ng de DNA genômico, 1  $\mu$ M de cada primer, 1,25 U Taq DNA polimerase, 350  $\mu$ M de cada dNTP, 2,25 mM de cloreto de magnésio, tampão 1X e água mili-Q (Tabela 1).

O termociclador utilizado para a amplificação da região ITS com os *primers* acima será programado para um ciclo inicial de 94<sup>o</sup>C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de 94<sup>o</sup>C por 1 minuto, 56<sup>o</sup>C por 1 minuto e 68<sup>o</sup>C por 1 minuto, seguidos de 1 ciclo final de 68<sup>o</sup>C por 10 minutos.

Os produtos PCR serão revelados por eletroforese em agarose 1,5% (p/vol) em TAE 1X, a 65 volts, 90 miliamperes, por 2 horas, usando o marcador de peso molecular 100 bp. Utilizar-se-á brometo de etídio 0,5 mg/mL e a visualização do DNA será feita em transiluminador de UV, sendo as imagens fotografadas em câmera digital.

Na Tabela 1, há um quadro com os componentes da reação. Faça um exercício calculando as concentrações finais com base nas concentrações estoque que serão utilizadas nesse protocolo.

Tabela 1. Reação de amplificação de DNA (PCR)

Componentes	Estoque comercial	Estoque do laboratório	Volume para 1 reação (µl)	Concentração final
Água	-			
Tampão	10X			
DNTP	100mM cada			
<i>Primer ITS-1</i>	100 µM			
<i>Primer ITS-4</i>	100 µM			
Magnésio	50 mM			
Taq polimerase	5 U/ µL			
DNA molde	-			
			100 µL	

## 2. Reação RAPD

Na Figura 8, há um esquema do protocolo para RAPD.

Para obtenção de polimorfismos, será utilizado o *primer* OPA-11 (CAATCGCCGT), onde os tubos de reação com 20 µL contendo o *primer* e os demais reagentes (5 µL primer 30 µM, 2 µL de tampão de reação 10X, 0,25 mM de cada um dos dNTPs, 0,4 µL de enzima Taq DNA polimerase 5 U/µL, 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 5-20 ng de DNA genômico e água mili-Q para completar o volume da reação), foram submetidos à 45 ciclos de 92°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos, seguidos de um ciclo final de extensão por 3 minutos.

Os produtos RAPD serão revelados por eletroforese em agarose 1,5% (p/vol) em TAE 1X, a 65 volts, 90 miliamperes, por 3 horas, usando o marcador de peso molecular 1kb. Utilizar-se-á brometo de etídio 0,5 mg/mL e a visualização do DNA será feita em transiluminador de UV, sendo as imagens fotografadas em câmera digital.

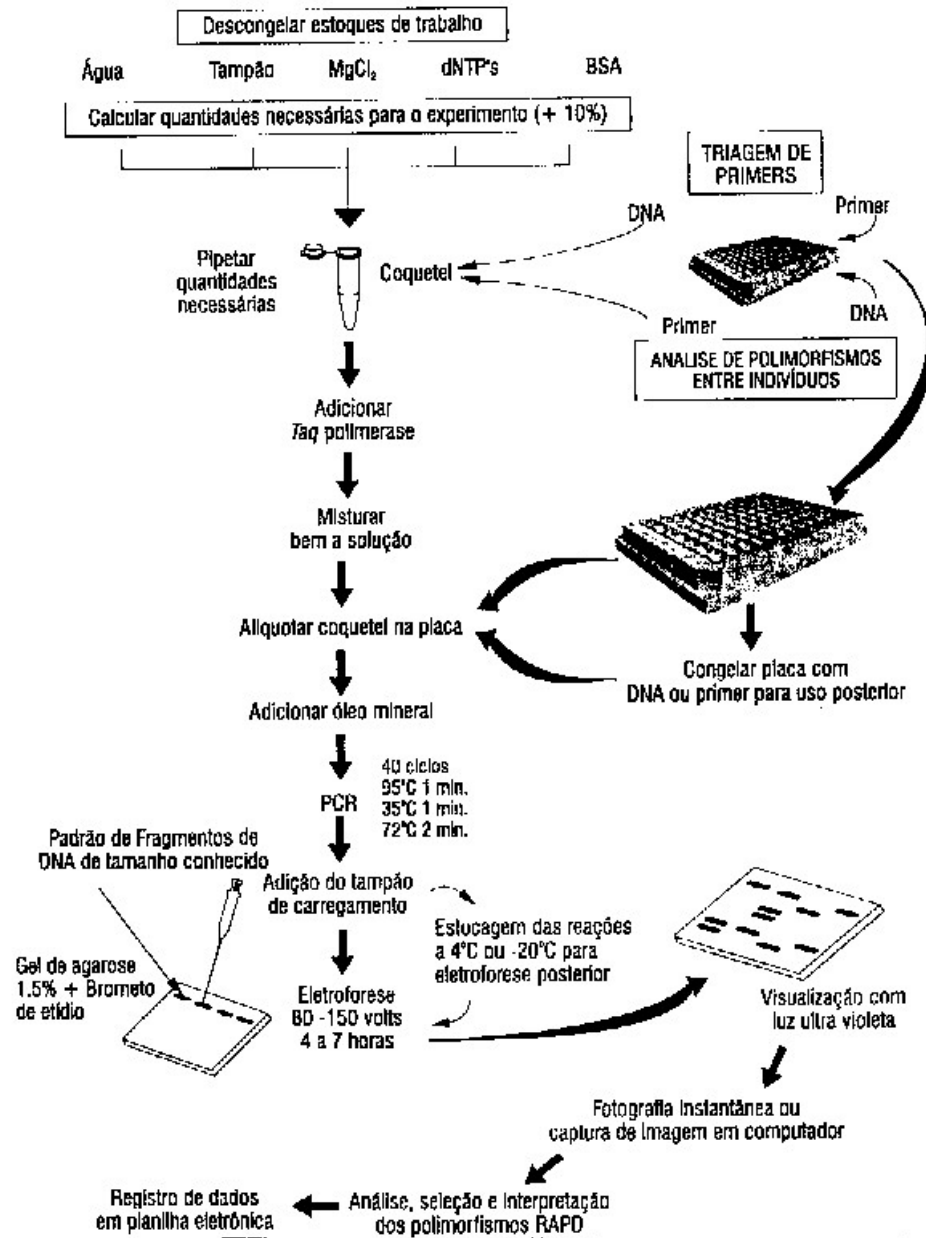


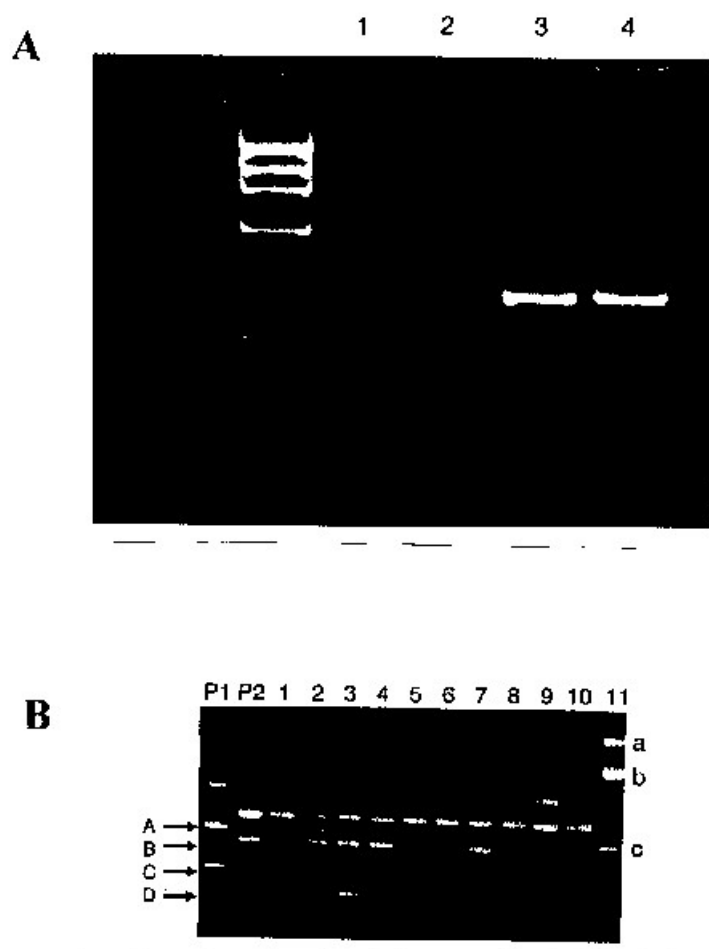
Figura 8. Diagrama esquemático do protocolo de análise de RAPD.

Na Tabela 2, há um quadro com os componentes da reação. Faça um exercício calculando as concentrações finais com base nas concentrações estoque que serão utilizadas nesse protocolo.

A Figura 9 traz fotos de géis de agarose gerados por PCR e RAPD.

Tabela 1. Reação de amplificação de DNA (RAPD)

Componentes	Estoque comercial	Estoque do laboratório	Volume para 1 reação ( $\mu$ l)	Concentração final
Água	-			
Tampão	10X			
DNTP	100mM cada			
<i>Primer</i> OPA-11	100 $\mu$ M			
Magnésio	50 mM			
Taq polimerase	5 U/ $\mu$ L			
DNA molde	-			
			20 $\mu$ L	



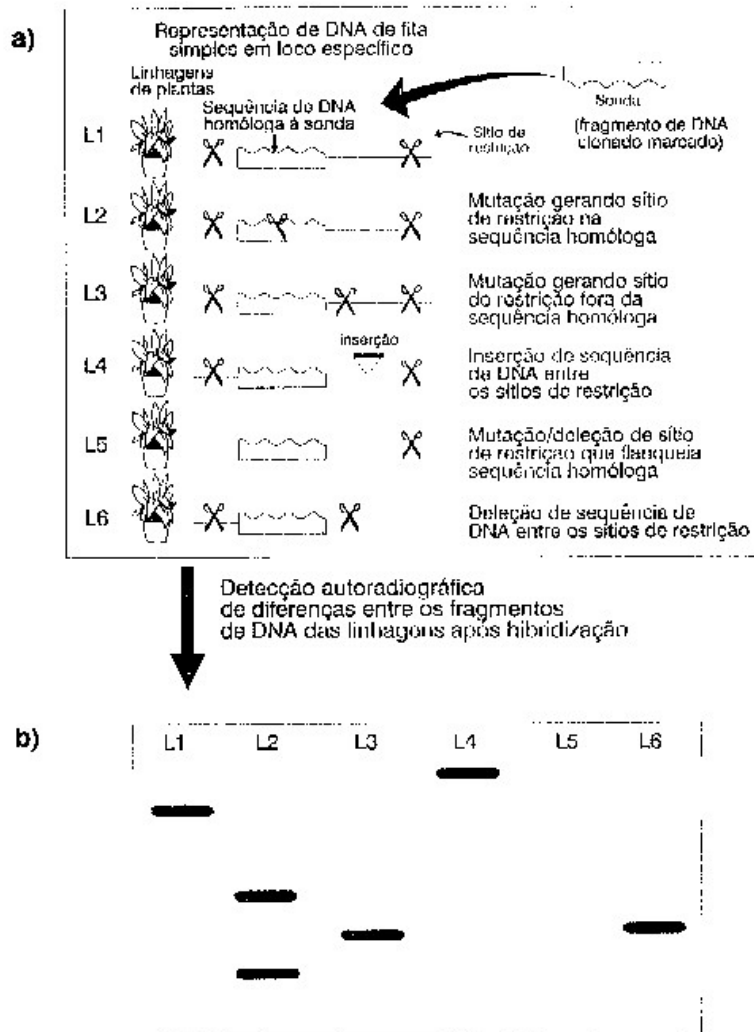
**Figura 9.** Géis de agarose gerados por PCR e RAPD. A. Fragmentos do gene do citocromo b amplificado pela PCR. O padrão a esquerda é um DNA  $\Phi$ x174 cortado com HaeIII. As colunas 1 e 2 são reações de controle positivos usando DNA humano, demonstrando amplificação de um produto de 366 pares de bases, e tubo experimental contendo fragmento de citocromo b amplificado de DNA de *Ambystoma*, respectivamente. B. Marcadores RAPD de vários indivíduos (p1, P2, 1 a 11) mostrando bandas polimórficas (A,B,C e D), ou seja, bandas presentes em alguns indivíduos e ausentes em outros. A coluna 11 contém fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos.

### **Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)**

Por RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) entende-se, em uma tradução livre do termo, o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Para que polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. Como a diferença em sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA de indivíduos distintos é potencialmente enorme, a detecção destas diferenças abre perspectivas relevantes ao estudo do genoma, naturalmente com implicações em diversas áreas de genética (Figura 10).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos podem também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido a clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A base genética do polimorfismo observado resulta assim de mutações nos sítios de restrições ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios.

Resumidamente, a idéia da técnica de RFLP pode ser apreendida de um exemplo simples. Tome-se dois indivíduos distintos que têm o DNA extraído e submetido a clivagem por enzima de restrição. O uso da técnica de RFLP visa detectar diferenças na seqüência de DNA dos dois indivíduos. Uma maneira de se fazer isto é sequenciar o DNA dos dois indivíduos e comparar as



**Figura 10.** Base genética do polimorfismo molecular detectado através da técnica de RFLP. (a) A homologia entre a sequência de nucleotídeos da sonda e a sequência complementar de nucleotídeos de um fragmento de DNA revela o polimorfismo observado em (b), causado por diferentes fenômenos genéticos.

seqüências obtidas. Uma estratégia simples e relativamente rápida de se amostrar diferenças nas seqüências de DNA destes indivíduos é fazer o uso da técnica de RFLP. Após a extração, o DNA dos indivíduos é tratado com enzimas de restrição, que o corta em um grande numero de pontos (sítios de restrição), gerando uma enorme quantidade de fragmentos (da ordem de  $10^4$  a  $10^7$ , dependendo do tamanho do genoma). As diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos resulta na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, que são separados através de eletroforese em gel de agarose. As diferenças nos tamanhos dos fragmentos não podem ser visualizadas diretamente no gel, uma vez que os inúmeros fragmentos que resultam do tratamento com enzimas de restrição ao serem separados pela eletrolise produzem o efeito de um arraste contínuo no gel. Para efetuar a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos separados no gel de agarose pela eletroforese são transferidos para uma membrana de nylon (ou nitrocelulose) por capilaridade ou vácuo através de um processo denominado "Southern Blot". Como a membrana de nylon é colocada sobre o gel, a ordem dos fragmentos separados por eletroforese é mantida na transferência.

A seguir, os fragmentos são fixados covalentemente na membrana através de alta temperatura em forno a vácuo ou com luz ultra-violeta, o que permite a reutilização da membrana algumas vezes. Esta reutilização é importante pois facilita o trabalho de geração de dados e quando maximizada, diminui significativamente o custo da técnica. Por fim, a visualização de fragmentos polimórficos entre os inúmeros fragmentos transferidos para a membrana é feita através da hibridização de pequenos fragmentos clonados de DNA denominados "sondas", com seqüências homologas do DNA imobilizado na membrana. Assim, somente os fragmentos fixados na membrana que são homólogos ao DNA da sonda serão visualizados entre os milhares de fragmentos resultantes do corte com enzima de restrição. Esta etapa da técnica pode se comparada à capacidade de se encontrar uma agulha no palheiro, visto que entre os milhões de fragmentos resultantes da clivagem do DNA, somente uns poucos fragmentos homólogos à sonda são identificados. O detalhe é que isso é feito com sucesso através da hibridização da sonda (que



pode ou não ter uma seqüência conhecida) com fragmentos homólogos na membrana. Para a preparação das sondas incorporam-se nucleotídeos contendo moléculas de fósforo radioativo ou nucleotídeos modificados nos fragmentos clonados do DNA.

Após a hibridização com as sondas, a membrana é exposta a filme de raio X em um processo chamado autoradiografia, revelando bandas que constituem os marcadores RFLP. Estas bandas são produzidas como resultado da sensibilização do filme pela emissão de partículas beta do fósforo radioativo, ou fótons de luz. Se os dois indivíduos diferem entre si em relação à posição do sitio de restrição enzimática na fita de DNA, gerando fragmentos de tamanho distinto, a banda será observada em posições diferentes na autoradiografia. Se caracterizada a segregação Mendeliana de tais bandas, conclui-se que elas representam um loco RFLP e, portanto, podem ser utilizadas como marcador genético. Segregação Mendeliana é, em geral, evidenciada através da utilização de populações segregantes (F<sub>2</sub>, retrocruzamento, etc).

### **Obtenção de sondas para detecção dos marcadores RFLP**

Os clones a serem utilizados como sondas podem ser obtidos de diferentes formas, as mais comuns são:

- (1) através da transcrição reversa de mRNA do organismo em estudo, produzindo-se uma biblioteca de moléculas de DNA complementar ("cDNA library");
- (2) através de fragmentos de DNA genômico clonados ao acaso ("genomic library");
- (3) através da amplificação via PCR de seqüências conhecidas utilizando *primers* específicos;
- (4) através de bandas RAPD selecionadas e obtidas de gel de eletroforese, e ampliadas via PCR.

Uma vez obtida uma coleção (“biblioteca”) de clones um passo importante no processo de análise de RFLP é a seleção daqueles clones que serão utilizados como sondas. Neste processo objetiva-se selecionar os clones que possuam cópia única, ou seja, que não contenham seqüências de DNA repetitivo. Clones contendo DNA repetitivo hibridizam com vários fragmentos na membrana o que resulta em borrões não interpretáveis na autoradiografia ou em padrões de bandas múltiplas difíceis de acompanhar do ponto de vista de distinção dos locos, alelos e segregação Mendeliana. Por outro lado, sondas contendo seqüências moderadamente repetidas no genoma tornam-se muito úteis quando o objetivo for a obtenção de uma impressão digital genética (“genetic fingerprint”), específica para cada indivíduo. Populações de cDNAs são intrinsicamente constituídas por uma grande maioria de clones de cópia única. Por outro lado, bibliotecas genômicas não são, mas podem ser constituídas utilizando-se procedimentos especiais que favorecem o enriquecimento com clones de cópia única. Em geral, cada sonda detecta um loco, ocasionalmente mais do que um.

### Procedimento

#### Digestão do DNA

1. Descongelar as amostras de DNA e colocar no gelo a Enzima *EcoRI* e o tampão da enzima.
2. Ligar banho-maria a 37° C.
3. Para cada reação adicionar:

_ DNA (1µg) .....	4 µL
_ Enzima <i>EcoRI</i> (20U/µL).....	1 µL
_ 10X tampão <i>EcoRI</i> .....	2 µL
_ água milli Q estéril.....	13 µL
_ Volume final = 20 µL	

OBS. Preparar o mix utilizando somente a água, a enzima e o tampão. Aliquotar o DNA separadamente em tubos de 0,5 mL devidamente identificados. Distribuir o mix em cada um.

4. Deixar os tubos 'over night' a 37°C

#### Preparo do gel e eletroforese

1. Preparar um gel de agarose 0,8% em TBE 0,5% para uma cuba grande.
2. Pulsar as amostras digeridas, retirar 10  $\mu$ L e adicionar 2  $\mu$ L do tampão de carregamento.
3. Carregar o gel com as amostras (12  $\mu$ L).
4. Utilizar marcador 'ladder' 1 kb (0,5  $\mu$ L marcador + 9,5  $\mu$ L água mili-Q + 2  $\mu$ L tampão de carregamento).
5. Deixar 18 horas em eletroforese (30 V e 30 A).

#### Transferência do DNA para membrana

1. Transferir para solução de brometo de etídio (5  $\mu$ g/mL) por 10 min.
  1. Lavar em água mili-Q, e retirar a água (5 X com água).
2. Desnaturar DNA com solução de desnaturação por 30 min a 24 rpm.
3. Drenar.
4. Neutralizar com solução de neutralização por 15 min a 24 rpm.
5. Repetir operação 3.
6. Fazer a transferência do DNA para a membrana (por capilaridade) e deixar 'over night'.

Solução 10 X SSC: 500ml

Solução 2 X SSC: 200ml

a – vidro da ponte

- b – papel 3 M úmido em 10X SSC (tirar ar)
- c – gel (tirar bolha)
- d – membrana úmida 2 X SSC (tirar bolha)
- f – papel 3M 2 X SSC (raio X, nos 4 lados)
- f – colocar 1º papel toalha, depois os papeis

7. Tirar a membrana e cortá-la no canto para verificação do lado.
8. Deixar o DNA para cima sobre o papel 3M e colocar os grampos.
9. Secar a 10 mm a 68°C com o DNA por cima, invertendo o lado que estava no gel
10. Fazer o 'Cross link' (30 seg em luz UV)

#### Pré- Hibridização

1. Colocar 2 tubos falcon com solução de pré-hibridização, a 68°C.
2. Adicionar 20 ml 6 X SSC ( 6ml de 20X SSC adicionado de 14 ml de água MilliQ)
3. Colocar a membrana no tubo maior, com o DNA para dentro
4. Mexer manualmente por 2 minutos.
5. Drenar.
6. Colocar solução de pré-hibridização (10 mL).
7. Incubar a 68°C por 1 hora em circulação média.

#### Preparo da sonda

1. Colocar 200 µL água mili-Q + 18 µL 'probe' (pot 2, marcado na tampa).
2. Desnaturar sonda por 5 minutos em água fervendo.
3. Colocar no gelo por 5 a 8 minutos e pulsar.

#### Hibridização ('Ne-Blot ® Phototope kit' – Biolabs)

1. Drenar a solução do tubo com a membrana.
2. Colocar 'probe' na solução de hibridização e deixar 'overnight'.
3. Drenar a solução do tubo com a membrana.

4. Colocar a solução 0,1 X SSC, 0,1% SDS a 68<sup>0</sup>C para ser utilizada no dia seguinte.
5. Retirar a membrana do tubo e lavar com 2X SSC, 0,1% SDS por 12 minutos em bandeja, com agitação.
6. Drenar e repetir a lavagem, enrolar a membrana com o DNA para dentro com a membrana ainda na solução.
7. Colocar a membrana no tubo, que estava no balanço 0,1 X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a 68<sup>0</sup>C.
8. Drenar e repetir.
8. Colocar 'wash I' para preservar 2-3 dias no escuro
9. Retirar 'wash'.
10. Senão, colocar a membrana em novo saquinho.
11. Colar o plástico deixando uma ponta para escoamento (fazer soluções)
12. Colocar 9 ml 'blocking' dentro do novo saquinho.
13. Mexer manualmente por 4 minutos.
14. Drenar (bastão).

#### Detecção ('Phototope® - Star Detection kit' – Biolabs)

1. Preparar streptavidina (9ml 'blocking' e 9µL de streptavidina)
2. Colocar no saquinho.
3. Mexer manualmente por 4 minutos, nos 4 lados.
4. Drenar (bastão).
5. Colocar 'wash I' (10% 'blocking'), 200 mL.
6. Mexer mecanicamente por 5 minutos.
7. Drenar e repetir mais duas vezes a operação anterior, mudando os lados.
8. Drenar (bastão).
9. Preparar 'alkaline phosphate' (9 mL 'blocking' e 9µL 'alkaline phosphate').
10. Colocar o 'phosphate' e mexer por 4 minutos manualmente.
11. Drenar.
12. Colocar 'wash II' 200 mL por 4 minutos, mexer mecanicamente.
13. Repetir mais duas vezes a operação anterior.
14. Drenar (bastão).

15. Preparar CDP (9  $\mu$ L CDP e 9 ml CDP 'buffer' 1X)
16. Mexer 4 minutos manualmente, mudando o lado.
17. Drenar completamente.
18. Fechar o saco plástico.
19. Levar para fotografia e revelação.

## 9. ANALISE DOS RESULTADOS

### Abordagem metodológicas utilizadas no tratamento de dados gerados por RAPD

A princípio, marcadores de RAPD podem ser tratados como alelos mendelianos. O fato desse marcador ser do tipo dominante faz com que a análise das relações de parentesco, entre organismos diplóides, não possa ser conduzida a partir do cálculo das frequências alélicas. Os dados de RAPD são de natureza binária (presença ou ausência da banda) e requerem tratamento estatístico apropriado. Matrizes binárias são geradas, e a partir delas calculam-se coeficientes de similaridade.

Existem várias medidas de similaridade. Os coeficientes de coincidência simples e de Jaccard têm sido amplamente usados em análises de dados gerados via RAPD. Esses coeficientes de similaridade medem o grau de concordância entre duas unidades. O coeficiente de similaridade de coincidência simples é dado pela fórmula  $S_{(SM)} = a + d/a + b + c + d$ , enquanto o coeficiente de Jaccard pela formulação,  $S_{(J)} = a/a + b + c$ .

O valor de **a** corresponde ao número de bandas presentes na unidade J e na unidade K; **b** é o número de bandas presentes na unidade K mas ausentes na unidade J; **c** é o número de bandas presentes na unidade J mas ausentes em K; **d** é o número de bandas ausentes em K e J. Portanto, **a** e **d** representam o número de concordâncias positivas e negativas, respectivamente, enquanto **b** e **c** representam as discordâncias. É necessário observar que o coeficiente de coincidência mede o grau de concordância entre

as unidades, levando-se em conta as concordâncias negativas e positivas e positivas, enquanto o coeficiente de Jaccard desconsidera as concordâncias negativas.

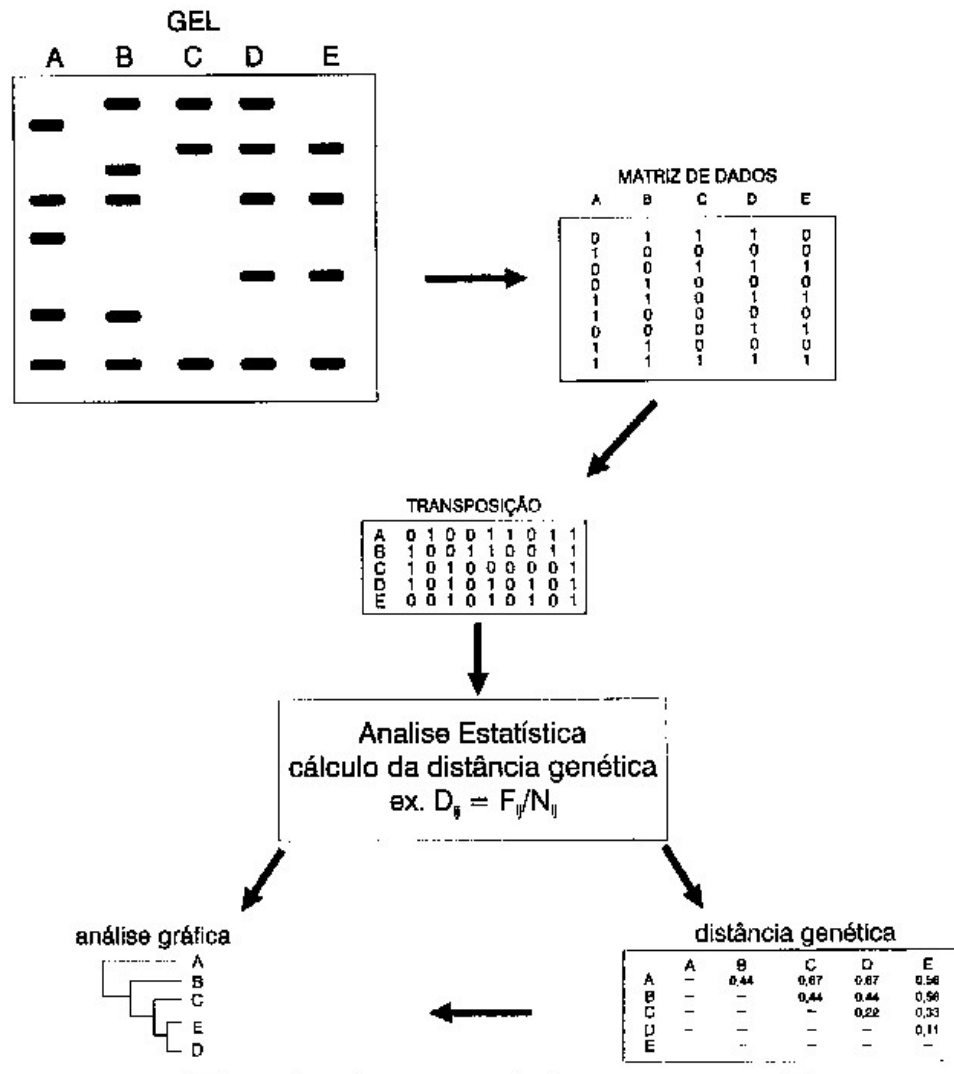
O processo de agrupamento envolve basicamente duas etapas: a primeira relaciona-se com a estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre as unidades taxonômicas, e a segunda, com a adoção de uma técnica de agrupamento, a formação do grupo (Figura 11).

Para facilitar o cálculo dos coeficientes de similaridade deve-se construir uma matriz de dados, atribuindo-se valor 1 para a presença de banda a valor zero para a ausência de banda.

Quando o número de estimativas de medidas de similaridade é grande, torna-se difícil o reconhecimento de grupos homogêneos pela simples observação visual dessas estimativas. Os métodos de agrupamentos hierárquicos permitem que as unidades sejam agrupadas por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma. Existem vários métodos de agrupamentos disponíveis, e cabe ao pesquisador decidir qual o mais apropriado ao seu trabalho, uma vez que os diferentes métodos podem levar aos diferentes padrões de agrupamentos.

No caso de análise de dados de RAPD aplicados a problemas taxonômicos, o método denominado UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetical averages) tem sido bastante utilizado.

Dependendo do número de unidades e variáveis (bandas), torna-se difícil a análise de agrupamento sem o uso da informática. Existem vários programas de computador que realizam esse tipo de análise. Um desses programas é o 'Numerical taxonomy system of multivariate programs'(NTSYS), desenvolvido para auxiliar pesquisas em taxonomia numérica.



**Figura 11.** Análise do nível de diversidade genética e relacionamento genético de diversos microorganismos. O DNA dos acessos (A,B,C,D e E) é primeiramente extraído e analisado em géis de eletroforese para a avaliação de polimorfismo molecular. Os dados obtidos são utilizados na geração de uma matriz de valores binários, constituída de acordo com a presença ou ausência de bandas de diferentes acessos. Procede-se então a análise estatística desses dados. O cálculo de distância genética entre os acessos pode ser realizado através de diversos métodos. Tais métodos variam entre si principalmente no que tange aos modelos estatísticos que assumem. A interpretação filogenética destas análises pode ser auxiliada por diversas técnicas, incluindo análise gráfica. A construção de dendrogramas pode ser feita com o auxílio do programa NTSYS.



## 10.BIBLIOGRAFIA

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p.

FUNGARO, M.H.P., VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p.205-227.

KREUZER, H., MASSEY, A . **Engenharia genética e biotecnologia**. Porto Alegre: ARTMED, 2002. 434p.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor, 2001 (volumes 1, 2 e 3)

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A ., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.

## 11. PREPARO DE SOLUÇÕES

### Soluções para extração de DNA

#### Solução estoque de Tris-HCl 1M

A solução foi preparada dissolvendo-se 121,10g de Trizma base (Tris [hidroximetil] amino metano) (Sigma: T-1503) em aproximadamente 800mL de água bidestilada (Milli-Q). O pH foi ajustado para 8,0 ( ou 7,5, quando necessário), com HCl concentrado (aproximadamente 40mL) e o volume final completado para 1000mL com água bidestilada. A solução foi distribuída em frascos (100mL por frasco), os quais foram esterilizados e estocados à temperatura ambiente.

#### Solução estoque de NaCl 5M

A solução foi preparada dissolvendo-se 292,24g de NaCl em 1000mL de água bidestilada (q.s.p.). A solução foi distribuída em frascos (100 mL por frasco), os quais foram esterilizados e estocados à temperatura ambiente.

#### Solução estoque de EDTA 0,5 M (pH 7,5 ou 8,0)

A solução foi preparada dissolvendo-se 186,10g de EDTA (Sigma: E-5134) em 800mL de água bidestilada, sendo a mesma titulada com NaOH sólido (aproximadamente 20,00g) até atingir o pH desejado (7,5 ou 8,0). Após a dissolução completa do EDTA, o volume foi completado para 1000mL com água bidestilada. A solução foi distribuída em frascos (100mL por frasco), os quais foram esterilizados e estocados à temperatura ambiente.

#### SDS 10% (detergente)

A solução foi preparada dissolvendo-se 10g de SDS em aproximadamente 80mL de água bidestilada aquecida. Após a dissolução completa do SDS, a solução foi resfriada e o volume completado para 100mL com água bidestilada.

A solução foi estocada à temperatura ambiente, não sendo necessária a esterilização. ( O SDS precipita ao ser colocado em refrigerador).

### Fenol Saturado

Foram dissolvidos 50,00g de fenol cristalizado (Synth) em banho- maria a 65°C durante 5 a 6 horas e adicionando um volume de tampão Tris HCl 0,5 M pH 8,0. A solução foi submetida a agitação durante 30 minutos, a fim de equilibrar o pH. A fase aquosa foi retirada e o procedimento repetido com Tris HCl 0,1 M pH 8,0. A fase aquosa foi retirada e o procedimento repetido com Tris HCl 0,1 M pH 8,0. Em seguida, foi adicionado 1/10 do volume final de tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 e estocado em frasco escuro a 4 °C.

- 1- Remover o fenol do freezer. Esperar atingir a temperatura ambiente. Derretê-lo (50g) em banho-maria (65°C) dentro de um béquer. Manter o frasco com a tampa levemente fechada.
- 2- Ao fenol liquefeito, adicionar o volume igual de Tris HCl 0,5 M pH 8,0. Colocar em erlenmeyer.
- 3- Agitar a solução em agitador magnetico por 30 minutos para equilibrar o pH. Cobrir o frasco todo com papel aluminio para evitar a oxidação do fenol. Após 30 minutos, desligar o agitador e transferir o fenol para uma proveta. Quando as duas fases se separarem, aspirar a fase aquosa superior (Tris-HCl 0,5 M) e descartá-la.
- 4- Repetir o procedimento com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Após a separação a fase aquosa ficou em cima e a fenolica embaixo.
- 5- Repetir o procedimento até a fase fenólica apresentar pH > que 7,8. Utilizar o papel medidor de pH.
- 6- Remover a fase aquosa final. Adicionar 1/10 volume de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e hidroxiquinolina a 0,1% do volume de fenol. Estocar a 4 °C em frasco escuro.

TRIS HCl 0,5 M Ph 8,0 - Diluiu-se a solução de TRIS-HCl 1M pH 8,0 em água bidestilada na proporção de 1:1.

TRIS HCl 0,1 M pH 8,0 - Diluiu-se a solução de TRIS-HCl 1M pH 8,0 em água bidestilada na proporção de 1:10.

### CLOROFANE

Este foi obtido a partir da mistura de um volume de fenol a aproximadamente um volume de clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1).

### ETANOL 70%

Álcool Etílico.....342mL  
 Água destilada.....58mL

### TAMPÃO TRIS-EDTA (TE)

TRIS-HCl 1M pH 7,5.....10mL  
 EDTA 0,5M pH 8,0..... 2mL

O volume foi completado para 1000 mL com água bidestilada e a solução esterilizada.

### RNase

A RNase pancreatica (RNase A) foi preparada na concentração de 10mg/mL, em 10mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 15 mM de NaCl. A solução foi aquecida em banho-maria a 98 °C por 15 minutos e estocada a -20 °C.

### Tris-HCl 10mM=Tris-HCl 0,01M

Tris-HCl 1M⇒Tris-HCl 0,01 M

[ (diluir 100x) = { 1mL de Tris-HCl 1 M + 99mL de água bidestilada

### NaCl 15 mM = NaCl 0,015 M

Na Cl 1M ⇒ 58,45g

NaCl 0,015 ⇒ 0,877g em 1000,00 mL

0,00877g de NaCl em 10,00mL de Tris-HCl 0,01M

⇒ 0,01g de RNase em 1,0mL de solução Tris-HCl/NaCl

### **Soluções para eletroforese**

#### Solução Estoque de brometo de Etídio - 10mg/mL

Foi dissolvido 1% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitado durante 1 hora e estocado à temperatura ambiente ou refrigerador em um frasco âmbar. No momento do uso, 3µL desta solução foram adicionados à 100mL de tampão TEB 1X.

Brometo de etídio: 1% = 1g em 100,00mL de água destilada = 0,01g/mL = 10mg/mL

Em 1,0mL de água destilada, teremos 0,01g ou 10mg de brometo de etídio

#### TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA (TBE) - 10X - Tampão de Corrida

Trisma base.....108g  
 Ácido Bórico..... 55g  
 EDTA 0,5 M (pH 8,0)..... 40mL

O volume foi acertado para 1000mL com água destilada, deionizada e filtrada em filtro Milli-Q (água Milli-Q). o tampão foi autoclavado e mantido a 4°C. No momento do uso, o mesmo foi diluído com água Milli-Q para a obtenção da concentração desejada.(0,5X ou 1,0X).

TEB 1X ⇒ Diluir o tampão TEB 10X na proporção de 1:10 em água Milli-Q.

1volume de tampão TEB 10X : 9 volumes de água Milli-Q.

100mL de tampão TEB 10X : 900mL de água Milli-Q.

200mL de tampão TEB 10X : 1800mL de água Milli-Q.

### TAMPÃO DE AMOSTRA

Este tampão foi preparado a partir de uma solução de glicerol 30% em água destilada, à qual adicionou-se azul de bromofenol (0,25%), sendo a solução final estocada sob refrigeração.

No momento de uso, um volume deste tampão (equivalente a 10% do volume da amostra a ser aplicada no gel de agarose) é colocado sobre papel parafilm, e a esse adicionado o volume correspondente a amostra. Ambos são homogeneizados e aplicados na canaleta do gel de agarose com uma micropipeta.

Exemplo: amostra a ser aplicada no gel de agarose - 20,0 $\mu$ L

tampão de amostra - 2,0 $\mu$ L

### GEL DE AGAROSE 0,8% (para verificar a integridade do DNA)

Agarose (Sigma A-0169/Pharmacia/GIBCO).....0,8g

TEB 1X.....100mL

Pesar a agarose em um Erlenmeyer e diluí-la em tampão TEB 1X. Ferver no microondas durante aproximadamente 3 minutos (ou mais) na potência média, pausando a cada 30 segundos, agitando levemente o frasco, a fim de homogeneizar a agarose.

OBS: Medir o peso antes e após a fervura. Corrigir o peso, completando com água Milli-Q.

OBS: A agarose dissolvida (após a fervura) deve ser resfriada até 50-60 °C, e a seguir, vertida sobre a placa de eletroforese. Deixar a agarose se polimerizar à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

### Soluções para hibridização

1- **Tampão de Desnaturação** (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl), para 1 Litro:

- 20,0 g NaOH
- 87,66 g NaCl
- Dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ e completar o volume p/ 1 Litro.

2- **Tampão de Neutralização** (1 M Tris-Cl; 1,5 M NaCl), para 1 Litro:

- 121,14 g Tris-Cl, pH 7,5 (Tris-base)
- 87,66 g NaCl
- Dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ, ajustar pH 7,5 com HCl e completar o volume para 1 Litro.

3- **20X SSC** (3 M NaCl; 0,3 M Citrato de sódio), para 1 Litro:

- 175,3 g NaCl
- 88,2 g Citrato de Sódio
- Dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ, ajustar pH 7,0 com HCl, completar o volume para 1 Litro e autoclavar.

4- **Washing Buffer I** (10% de Blocking Solution), p/ 1 Litro:

- 100 mL Blocking Solution
- 900 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ

5- **10X Washing Buffer II** (100 mM Tris-Cl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>), p/ 1 Litro:

- 12,1 g Tris-Cl (Tris base)

- 5,8 g NaCl
- 2,0 g MgCl<sub>2</sub>
- Dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ, ajustar pH 9,5 com HCl, completar o volume para 1 Litro.
- Estocar 4° C.

6- **Blocking Solution** (5% SDS; Phosphate, pH 7,2{17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>};125 mM NaCl), para 1 Litro:

- 7,3 g NaCl
- 2,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dibásico)
- 1,0 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monobásico)
- 50 g SDS
- Dissolver em 800 mL de H<sub>2</sub>O e ajustar o volume para 1 Litro.

7 - **0,1 X SSC, 0,1 % SDS**, p/ 1 Litro:

- 10 ml SDS 10 %
- 5 ml 20 X SSC
- Completar para 1 Litro com H<sub>2</sub>O MilliQ.

8- **2 X SSC, 0,1% SDS**, p/ 1 Litro:

- 100 ml 20 X SSC
- 10 ml SDS 10 %
- Completar para 1 Litro com H<sub>2</sub>O MilliQ.

9- **0,4 N NaOH, 0,1% SDS**, p/ 1 Litro:

- 16 g NaOH
- 1 g SDS (ou 10 mL da solução SDS 10%)
- Completar o volume para 1 Litro com H<sub>2</sub>O MilliQ.



10- **0,2 M Tris-HCl, 0,1X SSC**, p/ 1 litro:

- 200 mL Tris-HCl, pH 7,5 (tris base)
- 5 mL 20X SSC
- Completar o volume para 1 Litro com H<sub>2</sub>O MilliQ.

11- **4 M LiCl** (Cloreto de lítio), p/ 100 mL:

- 17 g Cloreto de lítio
- Dissolver em 80 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ, completar o volume p/ 100 mL.
- Autoclavar e guardar na geladeira (4° C).