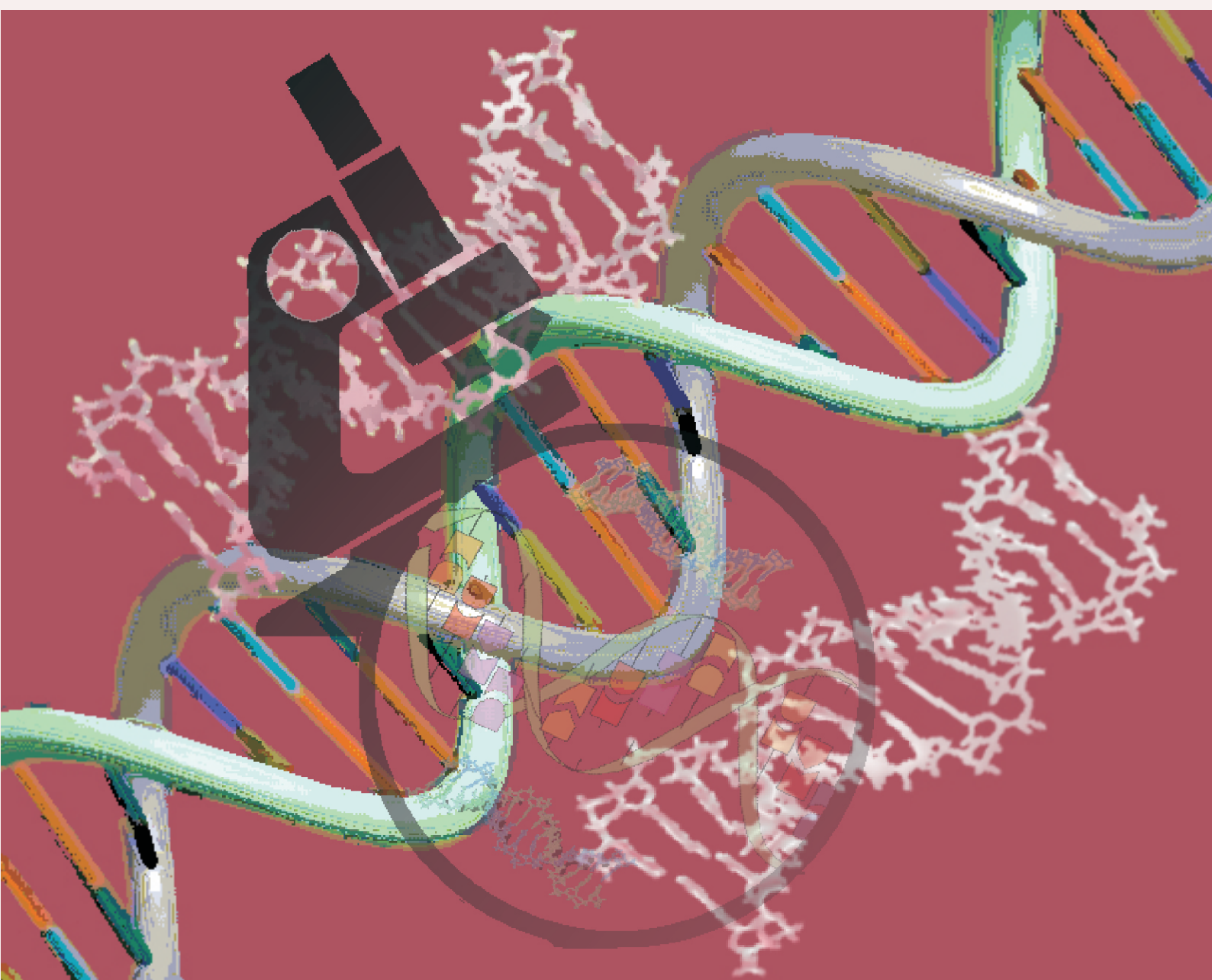


FUNDAMENTOS TEÓRICO-PRÁTICOS E PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE



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

Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2007

Embrapa Pecuária Sudeste

Rodovia Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3361-5611

Fax: (16) 3361-5754

Home page: <http://www.cppse.embrapa.br>

Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Carlos Eduardo Silva Santos, Maria Cristina Campanelli Brito,
Odo Primavesi, Sônia Borges de Alencar

Revisor de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Capa: Maria Cristina Campanelli Brito

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

Todos os direitos reservados.

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

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

Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação
de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase [recurso
eletrônico]. / Márcia Cristina de Sena Oliveira [et al.] — São Carlos:
Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

Modo de Acesso:

[http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/
e-books/LVFundDNA.pdf](http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/e-books/LVFundDNA.pdf)

Publicações gratuitas (acesso em _/10/2007)

Disponível também em CD-ROM (500 exemplares)

ISBN: 978-85-86764-12-7

1. DNA - Extração - Polimerase. 2. DNA - Amplificação -
Polimerase. I. Oliveira, Márcia C. de Sena. II. Título.

CDD: 591.8

© Embrapa 2007

Autores

Márcia Cristina de Sena Oliveira

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

Endereço eletrônico: marcia@cnpse.embrapa.br

Luciana Correia de Almeida Regitano

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

Endereço eletrônico: luciana@cnpse.embrapa.br

Alexandre Dinnys Roese

Engenheiro Agrônomo, Mestre, Embrapa Trigo, Rod. BR 285, km 294, Caixa Postal 451 CEP 99001-970 – Passo Fundo, RS

Endereço Eletrônico: alex@cnpt.embrapa.br

Denilson Gouvêa Anthonisen

Bacharel em Química, Mestre, Embrapa Clima Temperado, Rod. BR 392, km 78, 9º Distrito, Monte Bonito, Caixa Postal 403 CEP 96001-970 – Pelotas, RS

Endereço Eletrônico: denilson@cpact.embrapa.br

Epaminondas do Patrocínio

Bacharel em Química, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 007 CEP 44380-000 – Cruz das Almas, BA

Endereço Eletrônico: epami@cnpmf.embrapa.br

Márcia Maria Parma

Bacharel em Química, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127m5, Tanaquinho Velho, Caixa Postal 69 CEP 13820-000 – Jaguariúna, SP

Endereço Eletrônico: mmparma@cnpmma.embrapa.br

Sandra Maria Mansur Scagliusi

Bióloga, Mestre, Dra., Embrapa Trigo, Rod. BR 285, km 294, Caixa Postal 451 CEP 99001-970 – Passo Fundo, RS

Endereço Eletrônico: mansur@cnpt.embrapa.br

Wilston Henrique Belem Timóteo

Licenciado em Matemática, Mestre, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 – Sete Lagoas, MG

Endereço Eletrônico: wilston@cnpms.embrapa.br

Silvia Neto Jardim

Bióloga, Dra., Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 – Sete Lagoas, MG

Endereço Eletrônico: silvia@cnpms.embrapa.br

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS	2
3. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	3
4. CUIDADOS DURANTE E APÓS A EXTRAÇÃO DE DNA.....	4
5. MATERIAL NECESSÁRIO PARA EXTRAÇÃO DE DNA	4
6. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE TECIDOS DE MAMÍFEROS.....	5
6.1. Material (ver Apêndice)	5
6.2. Digestão da amostra	5
6.3. Extração do DNA com fenol.....	5
6.4. Purificação do DNA por meio de precipitação com etanol.....	6
7. PROTOCOLOS EMPREGADOS NA ROTINA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	7
7.1. Extração de DNA de amostras de sangue com a utilização de colunas de extração.....	7
7.2. Protocolo de extração de DNA de sangue mediante precipitação com sal	8
7.3. Extração de DNA de amostras congeladas de sangue.....	10
8. PROTOCOLOS EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ARTRÓPODES COM UTILIZAÇÃO DE COLUNAS DE PURIFICAÇÃO	11
8.1. Protocolo para extração de DNA de amostras de carrapatos com colunas de purificação	11
8.2. Protocolo de extração de DNA de ovos de carrapatos com a utilização de colunas de purificação.....	12
9. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SÊMEN	13
10. EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS.....	14
11. LEITURA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS	16
12. INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE PCR	16
13. ESCOLHA DOS <i>PRIMERS</i> OU INICIADORES.....	19
14. PCR “MULTIPLEX”	20
15. <i>NESTED</i> -PCR	20
16. PCR QUANTITATIVA	21
17. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	21
17.1. Eletroforese em gel de agarose.....	22
17.2. Variáveis que afetam a migração do DNA através do gel de agarose	23
18. PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO E FRAGMENTOS DE DIGESTÃO EM GEL DE AGAROSE.....	25
19. ELETROFORESE EM SISTEMA CAPILAR	26
20. PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO EM SISTEMA CAPILAR	28
21. PROTOCOLOS DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARASITÁRIO.....	28
21.1. PCR para <i>Babesia bigemina</i>	28
21.2. <i>Nested</i> -PCR para <i>Babesia bigemina</i>	29
22. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	31
23. APÊNDICE	33
24. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
25. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	37

FUNDAMENTOS TEÓRICO-PRÁTICOS E PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR MEIO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE¹

1. INTRODUÇÃO

A extração e a purificação de ácidos nucléicos a partir de diversas amostras experimentais (bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica tem sido amplamente empregada em estudos moleculares, em razão da facilidade relativa com que é possível amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo. A PCR possibilita a amplificação de seqüências de DNA que estejam presentes em misturas complexas e permite estudos de natureza variada, tais como desenvolvimento de métodos de diagnóstico altamente sensíveis e específicos, obtenção de grandes quantidades de DNA para seqüenciamento e análises sobre a diversidade genética de populações. Apesar da facilidade de amplificação de DNA possibilitada pela técnica de PCR, existe a necessidade da adequada padronização dos protocolos a serem utilizados em todas as fases dos procedimentos, desde a obtenção do ácido nucléico até a reação de amplificação propriamente dita. O DNA, em sua forma original de dupla fita, apresenta alta estabilidade e é muito resistente e se mantém inalterado em várias condições de meio. No entanto, alguns cuidados são aconselháveis, para que seja evitada a degradação das amostras obtidas em laboratório. A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise das células presentes na amostra e a purificação do DNA. Após a lise das células, o DNA deve ser separado dos restos celulares e das proteínas, precipitado e suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas. As amostras de DNA podem também ser submetidas a processos de concentração e de purificação, com a finalidade de se obter melhores resultados nas amplificações. Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de boa qualidade. Neste manual apresentam-se, de maneira simples, alguns fundamentos da análise de DNA.

¹ *Polymerase chain reaction*, PCR.

2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

As células vivas são capazes de preservar e de transferir a informação genética para as novas gerações por meio da complementaridade estrutural das moléculas de ácidos nucleicos: o DNA e o RNA. A unidade básica tanto do DNA como do RNA são polímeros de subunidades monoméricas, denominadas nucleotídeos, que estão arranjados em seqüência precisa. Em organismos eucarióticos (cujas células apresentam-se organizadas com membrana, citoplasma e núcleo), o DNA é encontrado no núcleo das células e também nas mitocôndrias e nos cloroplastos. As moléculas de DNA e de RNA consistem de apenas quatro tipos de nucleotídeos. Os nucleotídeos são compostos precursores da síntese dos ácidos nucleicos que contém um grupo fosfato, uma pentose (molécula de açúcar com cinco carbonos) e uma base nitrogenada. Durante o processo de polimerização do ácido nucleico, a ligação de um nucleotídeo à cadeia em extensão ocorre pela ação nucleofílica de uma hidroxila da pentose (3'-OH), do resíduo de nucleotídeo mais externo da cadeia, sobre o fosfato α ligado ao carbono 5' da pentose (5'-PO₄) do nucleotídeo que será incorporado, resultando na liberação de um íon difosfato. A pentose que compõe o RNA é sempre a ribose e o DNA, a desoxirribose. As bases adenina, guanina e citosina são encontradas tanto nas moléculas de DNA como de RNA, enquanto timina aparece exclusivamente nas moléculas de DNA e uracila, nas de RNA. Tanto o DNA quanto o RNA são utilizados na pesquisa, dependendo, principalmente, do objetivo de cada trabalho.

O DNA apresenta diferentes seqüências de nucleotídeos, que formam diferentes unidades, conhecidas por genes. O gene é definido como o segmento de DNA que codifica a informação requerida para a produção de determinado polipeptídeo ou de um segmento de RNA. Formas alternativas dos genes são denominados alelos e a totalidade do DNA presente na célula é chamada de genoma. Os genes estão organizados em cromossomos e a sua posição no cromossomo é denominada locus. Na maioria dos organismos, chamados diplóides, cada célula contém duas cópias de cada tipo de cromossomo. Nestes organismos, cada indivíduo possui dois alelos para cada locus, um originário da mãe e outro do pai. Se os dois alelos de um locus não podem ser diferenciados pela sua seqüência de nucleotídeos, ele é chamado de homocigoto para o locus considerado; e, caso contrário, ele é denominado heterocigoto. O princípio da segregação estabelece que cada célula reprodutiva originária de indivíduos heterocigotos contém apenas um dos dois alelos, enquanto as demais células contém os dois alelos em igual freqüência. Em seu estado nativo, o

DNA apresenta-se arranjado em dupla hélice, com as fitas das seqüências complementares ligadas entre si por pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. O DNA de todas as bactérias (organismos procarióticos) e de muitos vírus são arranjados de forma circular. O cromossomo da *Escherichia coli* contém cerca de 0,0044 picogramas de DNA, cerca de 4×10^6 pares de bases que codificam cerca de 3.300 proteínas diferentes. Os seres humanos apresentam ao redor de três bilhões de pares de bases que codificam de 50 a 100 milhares de genes em 24 cromossomos. Os vírus apresentam quantidade reduzida de informação genética, quando comparados aos organismos celulares, porque usam recursos da célula hospedeira para se reproduzir. Apesar do tamanho relativamente pequeno da informação genética contida em bactérias e vírus, o DNA desses organismos precisa ser compactado para que possa ser contido nessas células.

Com base nas características estruturais dos ácidos nucléicos, algumas técnicas moleculares são utilizadas na manipulação do DNA dos organismos. A hibridização é a técnica que se baseia na complementaridade entre as fitas de DNA. Um fragmento de DNA marcado por uma substância radioativa é usado como sonda para determinar a presença da fita complementar em uma amostra específica. Essa técnica foi muito utilizada em testes de diagnóstico, porém, atualmente em consequência de sua baixa sensibilidade e de problemas advindos do uso de radioatividade, ela caiu em desuso. A clivagem é outra técnica que pode facilitar a manipulação do DNA. Para esse fim, existem as chamadas enzimas de restrição, que são capazes de cortar o DNA em sítios específicos, definidos geralmente pela seqüência de bases distribuídas ao longo da molécula, produzindo fragmentos de comprimento menor. As enzimas de restrição são sintetizadas naturalmente por muitas bactérias e centenas (com especificidade para diferentes sítios de restrição) estão disponíveis comercialmente. Outros tipos de manipulação de DNA incluem a amplificação (utilizando a técnica de PCR) e a eletroforese, que serão apresentados em detalhe.

3. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras perecíveis devem ser acondicionadas de forma adequada até o momento de serem submetidas à extração do DNA. Amostras de sangue e de outros tecidos animais devem ser refrigeradas até chegarem ao laboratório. Amostras de tecidos vegetais também devem ser cuidadosamente colhidas, armazenadas e refrigeradas. As partes da planta devem ser lavadas e enxaguadas com água destilada

ou submetidas a processo de esterilização superficial, de acordo com o objetivo dos estudos a serem realizados. Para melhor conservação, as amostras devem ser mantidas em temperatura de -20°C a -80°C , dependendo do tempo de armazenamento. Para utilização de amostras conservadas em estoque, é interessante o fracionamento em pequenas alíquotas, para que o material não sofra descongelamentos sucessivos, que poderiam contribuir para a oxidação do tecido e para a degradação do DNA. O manuseio dessas amostras deve ser feito preferencialmente com o uso de luvas, para que uma parte dos ácidos nucleicos não sejam degradados por nucleases, enzimas que normalmente estão presentes nos fluidos corporais liberados principalmente nas mãos das pessoas.

4. CUIDADOS DURANTE E APÓS A EXTRAÇÃO DE DNA

Com a finalidade de se obter amostras de DNA adequadas aos protocolos de amplificação, é importante que exista uma sala exclusiva para esse fim. O DNA apresenta grande afinidade pelo vidro e pode ser adsorvido na presença de alguns sais; por isso, esse material não deve ser empregado durante o processo de extração. Todo o material plástico (polipropileno) utilizado deve ser esterilizado e novo (não deve ser usado material reciclado), para que as amostras apresentem boa qualidade e para que se diminuam os riscos de contaminação entre amostras no momento da análise.

5. MATERIAL NECESSÁRIO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Para executar os protocolos de extração de DNA, é necessário que o laboratório tenha os equipamentos básicos, o material plástico e todas as soluções utilizadas nos procedimentos. O material mínimo necessário é o seguinte:

- a) Centrífuga com rotor para vários tipos de tubos (ou para o tipo de tubo empregado no laboratório). É aconselhável que a centrífuga tenha controle de refrigeração.
- b) Capelas de exaustão.
- c) Banho-maria com termostato ou com termômetro para aferição da temperatura.
- d) Vidraria para preparo das amostras (provetas, pipetas, bastões de vidro).
- e) Microtubos de polipropileno.
- f) Micropipetas automáticas para volumes diversos (com ponteiras).
- g) Gelo e nitrogênio líquido, quando necessário.

6. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE TECIDOS DE MAMÍFEROS

6.1. Material (ver Apêndice)

- a) Tampão de digestão 1.
- b) Solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1); para essa solução, usar fenol tamponado.
- c) Acetato de amônio 7,5 M.
- d) Etanol absoluto.
- e) Etanol a 70%.
- f) Tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano).
- g) Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,1%.
- h) Nitrogênio líquido.
- i) Frascos e bastões esterilizados.
- j) Microtubos de polipropileno.

6.2. Digestão da amostra

As amostras de tecidos de origem animal ou vegetal que serão submetidas à extração de DNA devem sofrer fragmentação e digestão enzimática das proteínas. Para produzir a fragmentação, as amostras podem ser cortadas, submetidas a congelamento em nitrogênio líquido e rapidamente pulverizadas por processo manual (utilizando um bastão) ou mecânico (utilizando equipamentos para esse fim). Quantidades da amostra (entre 200 mg e 1 g) são adicionadas a uma solução-tampão de digestão (na proporção de 1,2 mL de tampão para cada 100 mg de tecido) e colocadas em banho-maria em temperatura próxima a 50°C, para que ocorra a digestão. O tempo de incubação pode variar entre oito e dezesseis horas, ou até que a amostra se apresente totalmente digerida, ou seja, apresente aspecto viscoso.

6.3. Extração do DNA com fenol

O método mais utilizado para purificação do DNA é a extração com fenol tamponado, que provoca a desnaturação das proteínas de maneira eficiente. O clorofórmio também é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na amostra. A mistura de fenol e de clorofórmio é muito eficiente para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a

mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. A proteína que foi desnaturada pelo tratamento com fenol e clorofórmio forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa. Para extrair o DNA de uma amostra, usar igual volume de solução de fenol, de clorofórmio e de álcool isoamílico (25:24:1). A extração com o fenol é dependente do pH. O fenol empregado nas extrações de DNA deve ter o pH próximo de 8,0 (fenol tamponado), já que faixas mais baixas de pH deslocam o DNA para a interface na hora da centrifugação. Em pH 7,0 ou acima, o DNA permanece na fase aquosa e em pH abaixo de 7,0, ele é desnaturado e migra para a fase orgânica. Nesse último caso, o RNA permanece na fase aquosa. Metodologia para tamponamento do fenol está descrita no Apêndice. Após a adição da solução de extração, centrifugar a amostra por dez minutos a 1.700 g e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

Cuidado: A manipulação de soluções que contêm fenol exige cuidado, pelo fato de serem extremamente cáusticas, voláteis e irritantes para as mucosas.

6.4. Purificação do DNA por meio de precipitação com etanol

A precipitação do DNA é feita por meio da utilização de etanol absoluto associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico. O etanol induz a transição estrutural nas moléculas de ácido, fazendo-as se agregarem, com conseqüente precipitação. A precipitação com etanol absoluto, além de concentrar o DNA, ajuda a remover resíduos de fenol e de clorofórmio presentes na amostra. O etanol a 70% é utilizado para remover resíduos de sais. Embora tanto o cloreto de sódio como o acetato de sódio e o acetato de amônio sejam eficazes na precipitação do DNA, é mais difícil remover o cloreto de sódio, em razão da sua menor solubilidade em etanol.

Procedimento:

Adicionar meio volume de solução de acetato de amônio 7,5 M e dois volumes de etanol absoluto. Centrifugar a 1.700 g por cerca de dois minutos (o tempo deve ser ajustado de acordo com a amostra). Eliminar a solução alcoólica e preservar o *pellet* de DNA. Ressuspender o *pellet* em etanol a 70% (para eliminar impurezas presentes na amostra), centrifugar novamente a 1.700 g por dois minutos. Descartar o sobrenadante e deixar secar o *pellet* de DNA. Ressuspender o DNA em tampão TE (ver item 6.1.f). Para facilitar a completa dissolução do DNA nesse tampão, as amostras podem ser incubadas em agitador a 65 °C por algumas horas.

7. PROTOCOLOS EMPREGADOS NA ROTINA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE

Existem muitos tipos de protocolos e muitos *kits* comerciais para a extração de DNA que se adaptam a diversos tipos de amostras. Para cada tipo de tecido podem ser testadas adaptações, de acordo com as características de cada espécime a ser analisado. A extração de DNA a ser empregada na PCR com fins de diagnóstico deve seguir um protocolo em que a obtenção de amostras de alta pureza é fundamental. O volume a ser submetido à extração é muito importante, mesmo porque em alguns procedimentos ele é extremamente restrito (amostras podem ser colhidas com *swabs* ou de esfregaços de sangue e de cortes histológicos). A grande dificuldade verificada em alguns casos é que, quando se extrai DNA de uma amostra, existe a mistura de ácidos nucleicos do hospedeiro e de ácidos nucleicos de outros microrganismos que podem estar presentes no tecido. Para exemplificar, a extração do DNA de sangue de um bovino, para pesquisa de hemoparasitas, produz a mistura de DNA que contém o ácido nucleico do hospedeiro e o ácido nucleico de todos os microrganismos presentes na amostra de sangue. O genoma de qualquer microrganismo é muito menor do que o de um mamífero e, para que se consiga a amplificação adequada, é preciso obter amostras muito puras. Existem vários métodos para extração de ácidos nucleicos que podem ser usados no estudo de parasitas, no entanto, em razão da pequena quantidade de DNA algumas vezes presente nesses agentes, é necessária a otimização do processo. Nos protocolos de extração de DNA com a finalidade de amplificação por meio da técnica de PCR, são usados como anticoagulantes o citrato de sódio e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A heparina não é indicada como anticoagulante, por causa da sua propriedade inibitória sobre a PCR. O sangue colhido com citrato de sódio (ver Apêndice) ou com EDTA pode ser armazenado por cerca de sete dias a -4°C ou durante vários anos a -80°C .

7.1. Extração de DNA de amostras de sangue com a utilização de colunas de extração

Este protocolo foi adaptado para extração de DNA de amostras de sangue de bovinos, para o diagnóstico da tristeza parasitária dos bovinos, no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Vários *kits* disponíveis no mercado, por exemplo o GFX[®] (GE Healthcare), podem ser empregados. A purificação do DNA é feita por meio do uso de uma coluna que contém fragmentos de sílica (coluna de purificação). Inicialmente, o DNA se liga à membrana da coluna de extração e depois

ele é lavado até que apresente alta pureza. No final do protocolo, o DNA é eluído com água quente ou com tampão TE. A utilização de *kits* permite a purificação do DNA nas amostras de maneira homogênea e rápida.

Procedimento:

- a) Colocar 300 µL de sangue e 900 µL de solução de lise, em microtubo de 1,5 mL.
- b) Homogeneizar e centrifugar a 20.800 *g* por cinco minutos e descartar o sobrenadante, deixando cerca de 50 µL.
- c) Homogeneizar a amostra e adicionar 500 µL de solução de extração.
- d) Incubar por cinco minutos, em temperatura ambiente, e transferir o conteúdo do microtubo para a coluna de extração. Acoplar a coluna de extração ao tubo coletor.
- e) Centrifugar a 5.000 *g* por um minuto; descartar o conteúdo do tubo coletor.
- f) Adicionar à coluna 500 µL de solução de extração e centrifugar a 5.000 *g* por um minuto; descartar o conteúdo do tubo coletor.
- g) Adicionar à coluna 500 µL de solução de lavagem e centrifugar a 20.800 *g* por três minutos; descartar o conteúdo do tubo coletor.
- h) Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL, limpo e livre de enzimas que decomponham o DNA.
- i) Adicionar 100 µL de água ultrapura, autoclavada e aquecida a 70°C; incubar por um minuto, em temperatura ambiente, e centrifugar a 5.000 *g* por um minuto, obtendo-se assim a solução de DNA. O DNA pode ser eluído em tampão TE também aquecido a 70°C.

7.2. Protocolo de extração de DNA de sangue mediante precipitação com sal

Este protocolo, adaptado de Olerup & Zetterquist (1992), é usado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Pecuária Sudeste e pode ser empregado com volumes pequenos de sangue.

Soluções:

- Solução A (tampão de hemólise) para cada amostra de 25 mL:
 - a) Tris-HCl 1 M, com pH 7,6 (concentração final de 10 mM) 250 µL.
 - b) MgCl₂ 0,5 M (concentração final de 5 mM) 250 µL.
 - c) NaCl 5 M (concentração final de 10 mM) 50 µL.
 - d) Completar com água ultrapura (q.s.p. 25 mL).

- Solução B (para cada amostra de 500 μL):
 - a) Tris-HCl 1 M, com pH 8,0 (concentração final de 10 mM) 5 μL .
 - b) NaCl 5 M (concentração final de 100 mM) 10 μL .
 - c) EDTA 0,5 M, com pH 8,0 (concentração final de 10 mM) 10 μL .
 - d) Dodecilsulfato de sódio a 20% (concentração final de 0,5%) 12,5 μL .
 - e) Proteinase K (concentração final de 20 mg/mL) 2,0 μL .
 - f) H₂O ultrapura 460,5 μL .

- Para a precipitação do DNA:
 - a) Etanol absoluto gelado (manter a 5 °C).
 - b) Etanol a 70% gelado (manter a 5 °C).

Obtenção de leucócitos:

- a) Colher 5 mL de sangue em tubos com anticoagulante EDTA. Acertar os volumes dos tubos, completando com solução salina (solução de cloreto de sódio 0,9 M).
- b) Centrifugar durante cinco minutos a 390 *g* e descartar o plasma, usando pipeta, com cuidado, para não descartar as células brancas (esta etapa é opcional).
- c) Lisar os glóbulos vermelhos com 10 mL (5 mL no tubo de colheita e 5 mL em tubo de polipropileno com capacidade para 15 mL) da solução A, e homogeneizar, misturando bem por inversão ou agitando os tubos no *vortex*.
- d) Centrifugar durante dez minutos a 700 *g* na temperatura de 4 °C.
- e) Dispensar o sobrenadante. Se o *pellet* for muito pequeno, centrifugar novamente.
- f) Ressuspender o *pellet* em 5 mL do tampão de hemólise. Para isso, tampar os tubos com Parafilm[®] e misturar bem por inversão e, se preciso, usar o *vortex*. Centrifugar a 2.000 rpm por dez minutos a 4 °C.
- g) Repetir a lavagem, até obter somente células brancas.
- h) Ressuspender o *pellet* em 500 μL de tampão de hemólise (solução A) e passar para microtubos de 1,5 mL. Centrifugar por um minuto a 16.000 *g* e descartar o sobrenadante.
- i) O *pellet* pode ser conservado a -20 °C ou em temperatura menor, por vários meses.

Obtenção do DNA:

- a) Ressuspender o *pellet* em 500 μ L de solução B e misturar no *vortex*. Obs.: destruir bem o *pellet* antes de incubar.
- b) Incubar a 55°C, até dissolver o *pellet* (durante quatro a seis horas ou de um dia para o outro). De vez em quando, misturar as amostras no *vortex*, para que o *pellet* fique bem dissolvido.
- c) Ajustar o volume para 760 μ L com tampão TE (210 μ L). Acrescentar 240 μ L de NaCl 5 M.
- d) Incubar por quinze minutos em gelo.
- e) Agitar os tubos por inversão, até formar pequenos coágulos de proteína. Centrifugar por quinze minutos a 16.000 *g*.
- f) Dividir todo o sobrenadante em dois tubos novos (devidamente marcados), 500 μ L em cada um.
- g) Ligar o banho-maria a 37°C. Adicionar 1 mL de etanol absoluto gelado e inverter o tubo várias vezes. Centrifugar por quinze minutos a 16.000 *g*. Descartar o sobrenadante. Secar com papel (com cuidado).
- h) Lavar com 500 μ L de etanol a 70%, gelado. Revolver o tubo. Centrifugar por cinco minutos a 16.000 *g*. Descartar e colocar a secar (temperatura máxima de 40°C). Adicionar 250 μ L de tampão TE + solução de enzima que degrada RNA (RNase – 10 μ g por mL de amostra) e incubar por uma hora a 37°C.

7.3. Extração de DNA de amostras congeladas de sangue

Soluções utilizadas (Ver Apêndice):

- Tampão PBS.
- Tampão de lise 1.
- Solução de proteinase K (20 mg/mL).
- Solução de acetato de amônio 10 M.
- Etanol absoluto.
- Tampão TE, com pH 8,0.

Procedimento:

- a) Descongelar a amostra de sangue em temperatura ambiente e adicionar igual volume de tampão PBS.

- b) Centrifugar a 3.500 *g* por quinze minutos, a 4 °C.
- c) Remover o sobrenadante e suspender o *pellet* em 15 mL de tampão de lise (incubar por cerca de uma hora a 37 °C).
- d) Transferir o lisado para tubos de centrifugação em quantidade que ocupe apenas 1/3 do tubo.
- e) Adicionar solução de proteinase K, de modo a obter a concentração final de 100 µg/mL e misturar.
- f) Incubar a 50 °C por três horas, misturando algumas vezes.
- g) Adicionar igual volume de fenol tamponado. Misture duas fases, invertendo o tubo várias vezes.
- h) Centrifugar a 5.000 *g* por quinze minutos.
- i) Transferir o sobrenadante para um tubo limpo, com cuidado.
- j) Repetir a extração com fenol, por mais duas vezes.
- k) Adicionar à fase aquosa dois décimos de volume de solução de acetato de amônio 10 M e dois volumes de etanol absoluto.
- l) Retirar com uma alça o DNA desidratado, que se apresenta em suspensão na solução aquosa, e transferir para outro microtubo ou, então, centrifugar a 5.000 *g* por cinco minutos e descartar o sobrenadante.
- m) Deixar evaporar todo o etanol residual.
- n) Adicionar 1 mL de tampão TE com pH 8,0 para cada 0,1 mL de células extraídas.

8. PROTOCOLOS EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE ARTRÓPODES COM UTILIZAÇÃO DE COLUNAS DE PURIFICAÇÃO

A preparação de amostras de artrópodes para extração de DNA exige boa digestão de todo o material, por período de tempo variável, que dependerá basicamente do peso da amostra. Uma limitação dos *kits* que possuem a membrana de sílica é que as amostras devem apresentar peso limitado à capacidade máxima indicada no manual. Como regra, cerca de 20 mg de tecido de carrapato macerado são usados para extração. Outros artrópodes menores podem ser processados inteiros.

8.1. Protocolo para extração de DNA de amostras de carrapatos com colunas de purificação

Nesse protocolo foi empregado o *kit* GFX[®] (GE Healthcare). Soluções que não estão no *kit* (ver o Apêndice):

- a) Solução de proteinase K (20 mg/mL).
- b) Tampão de digestão 2.

Procedimento:

- a) Pesar 20 mg da amostra e colocar em um microtubo de 1,5 mL.
- b) Macerar com a ponta cônica de um bastão. As amostras podem ser mergulhadas em pequenas quantidades de nitrogênio líquido, para serem congeladas rapidamente. O congelamento facilita a maceração das amostras, que se tornam mais quebradiças.
- c) Adicionar 10 μ L de tampão lisozima e incubar por quinze minutos em temperatura ambiente.
- d) Adicionar 15 μ L de solução de proteinase K e incubar de um dia para o outro, na temperatura de 56 °C.
- e) Adicionar 500 μ L de solução de extração e incubar por quinze minutos em temperatura ambiente.
- f) Centrifugar a 5.000 *g* por dois minutos.
- g) Recolher o sobrenadante, colocar na coluna de extração e centrifugar a 5000 *g* por um minuto. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
- h) Novamente adicionar 500 μ L de solução de extração e incubar por quinze minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 5.000 *g* por um minuto. Descartar o conteúdo do tubo coletor.
- i) Adicionar 500 μ L de solução de lavagem e centrifugar novamente a 20.000 *g* por cinco minutos. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um microtubo de 1,5 mL, novo e livre de enzimas que possam atuar sobre DNA e RNA.
- j) Para eluição do DNA, adicionar 100 μ L de água ultrapura aquecida a 70 °C, incubar por um minuto e centrifugar a 5.000 *g* por um minuto.

8.2. Protocolo de extração de DNA de ovos de carrapatos com a utilização de colunas de purificação

O mesmo protocolo utilizado para extração de DNA de carrapato foi adaptado para extração de DNA de alíquotas de ovos de carrapatos (*kit* GFX[®], GE Healthcare).

Procedimento:

- a) Pesar 20 mg da amostra e colocar em um microtubo de 1,5 mL.
- b) Macerar com a ponta cônica de um bastão. A maceração pode ser feita após congelamento com nitrogênio líquido.
- c) Adicionar 10 μ L de tampão de digestão 2 e incubar por quinze minutos em temperatura ambiente.
- d) Adicionar 15 μ L de proteinase K (20 mg/mL) e incubar por quatro horas na temperatura de 56 °C.
- e) Adicionar 500 μ L de solução de extração, incubar por quinze minutos em temperatura ambiente.
- f) Centrifugar a 5.000 *g* por dois minutos.
- g) Recolher o sobrenadante, colocar em coluna de extração e centrifugar a 5.000 *g* por um minuto. Descartar o material do tubo coletor.
- h) Novamente adicionar 500 μ L de solução de extração e incubar por quinze minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 5.000 *g* por um minuto.
- i) Adicionar a solução de lavagem e centrifugar a 20.000 *g* por três minutos (16.000 rpm).
- j) Transferir a coluna para um tubo limpo de 1,5 mL e colocar 100 μ L de água a 70 °C (ou tampão TE). Após um minuto, centrifugar o tubo com a coluna a 5.000 *g* por um minuto.

9. EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE SÊMEN

Soluções utilizadas (ver Apêndice):

- Tampão PBS.
- Tampão de lise 2.

Procedimento:

- a) Descongelar uma palheta de sêmen (cerca de 0,54 mL) e colocar em um microtubo de 1,5 mL.
- b) Centrifugar durante oito minutos a 16.000 *g*.
- c) Lavar o *pellet* quatro vezes em 1 mL de tampão PBS (a cada lavagem passar no *vortex* e centrifugar novamente).
- d) Ressuspender em 100 μ L de tampão PBS (nesta fase, a amostra pode ser armazenada no *freezer*).

- e) Adicionar 400 μL de tampão de lise 2 e incubar por trinta minutos a 50°C para dissolver o *pellet*.
- f) Adicionar solução de proteinase K a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μg = 5 μL da solução de estoque de 20 mg/mL). Agitar no *vortex* até dissolver. Incubar por dezesseis horas a 50°C.
- g) Dividir as amostras em dois tubos, colocando 250 μL em cada tubo.
- h) Adicionar 80 μL de NaCl 5 M por tubo. Agitar vigorosamente por inversão. Centrifugar a 16.000 *g* por cinco minutos.
- i) Transferir o sobrenadante para tubos limpos. Acrescentar 1 mL de etanol absoluto a cada tubo e agitar por inversão. Centrifugar a 16.000 *g* por cinco minutos.
- j) Desprezar o sobrenadante. Acrescentar 100 μL de etanol a 70% a cada tubo (não agitar no *vortex*).
- k) Centrifugar a 16.000 *g* por cinco minutos. Desprezar o sobrenadante. Secar o *pellet* e suspender em 100 μL de tampão TE + enzima que atue sobre RNA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra).
- l) Incubar por uma hora em temperatura ambiente.

10. EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS

A extração de DNA de plantas envolve a lise das células vegetais por meio do tratamento com detergente e posterior separação e precipitação do DNA. A preparação do DNA das plantas pela técnica de centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο produz DNA de alta pureza. Outro protocolo que tem sido largamente utilizado por sua facilidade e rapidez é aquele que usa o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), que libera o DNA celular e se complexa a ele. Posteriormente, o DNA é separado por meio do tratamento com isopropanol e etanol. Este protocolo pode ser adaptado de várias maneiras, para diversos tipos e para várias quantidades de amostra.

Protocolo que emprega o detergente CTAB:

Soluções (ver Apêndice):

- a) solução-tampão de extração vegetal.
- b) Solução de clorofórmio e álcool isoamílico a 24:1.
- c) Isopropanol.
- d) Etanol a 95%.
- e) Tampão TE.

Procedimento:

- a) Pesar 300 mg do tecido vegetal (a quantidade de tecido vegetal pode chegar a até 3 g).
- b) Macerar com auxílio de nitrogênio líquido, até que a amostra esteja pulverizada.
- c) Colocar a amostra em microtubo de 2 mL e adicionar 700 μ L de solução-tampão de extração vegetal e homogeneizar durante dez minutos por inversão.
- d) Incubar as amostras em banho-maria a 65°C por uma hora, homogeneizando algumas vezes.
- e) Retirar do banho-maria e deixar a temperatura da amostra se igualar à temperatura ambiente.
- f) Adicionar 700 μ L de solução de clorofórmio e de álcool isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
- g) Centrifugar a 5.000 *g* por dez minutos em temperatura ambiente, para separar a fase orgânica e a fase aquosa.
- h) Remover a fase aquosa (superior) para um novo microtubo, evitando tocar a interface com a ponta da ponteira.
- i) Repetir a extração com solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) mais uma ou duas vezes, considerando que maior número de extrações pode purificar mais o DNA, porém com alguma perda.
- j) Após a remoção final do sobrenadante, adicionar 450 μ L de isopropanol (gelado), equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. Homogeneizar suavemente.
- k) Manter a -20°C por dois minutos (para evitar a precipitação de polissacarídeos).
- l) Centrifugar a 8.600 *g* por dez minutos.
- m) Descartar o sobrenadante.
- n) Lavar o *pellet* uma vez com etanol a 70%.
- o) Lavar novamente o *pellet* com etanol a 95%.
- p) Deixar secar por uma hora.
- q) Ressuspender em 50 a 100 μ L de tampão TE (pode-se adicionar RNase na concentração final de 10 μ g/mL de amostra).
- r) Incubar a 37°C por uma hora.
- s) Manter a -20°C.

11. LEITURA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS

Todas as amostras de DNA obtidas no laboratório podem ser avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas, de 280 nm. Diluições das amostras de DNA são preparadas com água ultrapura. Pequenas alíquotas de 10 μL (diluição 1:50) ou 5 μL (diluição 1:100) são misturadas com 490 ou 495 μL de água ultrapura, e lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda citados. Para estimar a concentração de DNA, utiliza-se a seguinte relação: 1 $\text{DO}_{260} = 50 \mu\text{g}$ de DNA de dupla hélice. A concentração de DNA na amostra pode ser obtida pelo seguinte cálculo:

$$\text{Concentração de DNA} = \text{leitura da } \text{DO}_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição usado na leitura.}$$

A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA extraído e, desse modo, a relação $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ pode ser usada para esse fim. Amostras cujos valores dessa relação são inferiores a 1,8 apresentam contaminação com proteínas.

O DNA pode ser quantificado e analisado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose. Para esse fim, um gel de agarose entre 0,8% e 1% é preparado e, com as amostras de DNA, é aplicada também uma amostra cuja concentração é conhecida. O DNA do bacteriófago *Lambda* em concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ é geralmente utilizado. Após a eletroforese, o gel é corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta, e as amostras são comparadas aos padrões, determinando-se dessa maneira as concentrações aproximadas de DNA em cada amostra.

12. INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE PCR

A PCR apresenta ampla gama de aplicações em vários ramos da pesquisa científica. Essa reação possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas do que as tradicionalmente utilizadas. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e a análise de grande número de amostras simultaneamente fazem dessa técnica uma opção atrativa para estudos epidemiológicos e para

caracterização de microrganismos causadores de doenças. Para que se possa amplificar dado segmento de DNA, é necessário que as partes finais da seqüência sejam conhecidas. Os elementos envolvidos nessa reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas. A solução em que ocorre a reação (*master mix*), é preparada em banho de gelo e colocada em microtubos de plástico esterilizados.

São componentes da PCR:

- a) Amostra de DNA que contém o segmento a ser amplificado (DNA extraído de amostras de sangue, de culturas de microrganismos, de espécimes clínicos, de plantas, etc.)
- b) Mistura que contenha os nucleotídeos (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs) necessários para a síntese das novas fitas de DNA.
- c) Enzima DNA-polimerase, que é responsável pela síntese das novas fitas de DNA (Taq-DNA-polimerase) em solução-tampão.
- d) Cloreto de magnésio, co-fator da reação.
- e) Dois iniciadores ou *primers*, que são pequenas seqüências conhecidas de DNA (oligonucleotídeos), que delimitam e são complementares à região-alvo de amplificação. Os *primers* são sintetizados em laboratórios especializados, sob encomenda, e após a sua diluição são mantidos a -20°C .

A PCR pode ser feita em tubos de 0,5 μL ou de 0,2 μL ou em placas, empregando-se volume total de 25 μL , sendo 20 μL de *master mix* e 5 μL da amostra de DNA a ser analisada. Outras variações de volume têm sido utilizadas em diferentes trabalhos científicos, como 10 μL de *master mix* e 2,5 μL de DNA. O volume das reações pode ser reduzido, desde que as concentrações adequadas de todos os componentes da reação sejam mantidas:

- a) 14,7 μL de água ultrapura esterilizada.
- b) 2,5 μL de tampão 10 X concentrado (tris-HCl 10 mM, KCl 500 mM, MgCl_2 15 mM).
- c) 0,25 μL de solução 20 mM de nucleotídeos (dNTPs).
- d) 1,0 μL de *primer* (10 μM) *sense*.
- e) 1,0 μL de *primer* (10 μM) *antisense*.
- f) 0,3 μL de Taq-DNA-polimerase (5 U/ μL).

A água a ser empregada no *master mix* deve ser a ultrapura, que apresenta baixa condutividade elétrica. O tampão 10 X, utilizado para o preparo do *master mix*, é comprado com a Taq-DNA-polimerase. Algumas marcas comerciais de polimerases

trazem o tampão 10 X já adicionado de cloreto de magnésio, outras trazem essa solução separada. Nesses casos, a solução deve ser adicionada ao *master mix* logo após o tampão 10 X e o volume total deve ser ajustado com água. O íon magnésio não pode faltar no *master mix*, porque ele é essencial para a ação da enzima DNA-polimerase.

Para que ocorra a amplificação, com a síntese de novas fitas de DNA, as amostras devem ser submetidas à combinação adequada de temperatura e de tempo. Cada ciclo da PCR apresenta três fases fundamentais, que são: desnaturação, anelamento e extensão. Essas fases ocorrem em temperatura diferente e são programadas no aparelho chamado termociclador, onde as amostras são incubadas. Na hora de preparar o programa para a amplificação, devem estar estabelecidos a temperatura e o tempo exato de cada uma dessas fases e também o número de repetições dos ciclos:

- a) Desnaturação: é a fase na qual o DNA perde sua estrutura de dupla hélice, por meio da elevação da temperatura, para cerca de 94°C a 95°C. A desnaturação permite que os *primers* se liguem à região complementar à sua seqüência na amostra de DNA. Desnaturação mais longa (*hot start*) no primeiro ciclo pode ser utilizada com a finalidade de otimizar essa fase, permitindo o melhor anelamento dos *primers*. O DNA genômico permanece desnaturado por todos os ciclos subseqüentes, porque as fitas complementares estão em concentrações muito baixas, o que impede a sua reunião. Os oligonucleotídeos ou *primers*, por sua vez, estão em concentrações muito altas no *master mix*, fato que facilita o encontro das regiões complementares (anelamento).
- b) Anelamento. Uma vez desnaturado o DNA, a temperatura da reação é reduzida (a temperatura de anelamento é sempre específica para cada par de *primers*). Dessa forma, cada *primer* se encaixa nas respectivas seqüências complementares à região-alvo da amplificação. A determinação da temperatura de anelamento para um par ou conjunto de *primers* pode ser feita com o auxílio de programas de computador específicos para essa finalidade. A temperatura de anelamento depende, entre outros fatores, do tamanho do *primer* e de sua seqüência de nucleotídeos.
- c) Extensão. A temperatura é elevada até cerca de 72°C, para que a enzima DNA-polimerase (Taq-DNA-polimerase) se posicione junto aos *primers* que se anelaram anteriormente e, com o auxílio do magnésio, seja iniciada a síntese da nova fita. A síntese da nova fita de DNA se inicia a partir dos *primers* ou iniciadores. A síntese

se dá por meio da utilização dos nucleotídeos (dNTPs) que foram adicionados ao tampão e que são sempre complementares à fita-molde. Dessa maneira, são formadas novas fitas de DNA de dupla hélice, correspondente a região-alvo de amplificação (delimitada pelos *primers*).

Após o término de um ciclo (desnaturação, anelamento e extensão), todo o processo é repetido várias vezes (40 vezes, em média), até que se obtenha grande quantidade do DNA a ser amplificado. A cada ciclo de amplificação, o número de cópias da seqüência-alvo é duplicado e, com a evolução dos ciclos da reação, ocorre aumento exponencial do número dessas seqüências. O aumento do número de ciclos não é aconselhado, em decorrência da redução da especificidade da reação.

13. ESCOLHA DOS *PRIMERS* OU INICIADORES

Algumas técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de *primers* ou seqüências iniciadoras de PCR. Para fins de diagnóstico, a seqüência do gene rDNA é rotineiramente utilizada, em razão da sua disponibilidade para grande número de protozoários e outros parasitas. Os iniciadores podem ser designados a partir dessas seqüências, porém, em virtude da grande conservação observada nesses genes, reações cruzadas com outros organismos que não são alvo de interesse podem ocorrer. Um método alternativo é a construção de bibliotecas de DNA genômico, em que certas regiões do genoma do microrganismo obtidas por meio da digestão enzimática são amplificadas por PCR e seqüenciadas. Esse método é caro, e demanda tempo e grande quantidade de DNA, que pode ser difícil de se obter, dependendo do microrganismo em questão. O uso da técnica de amplificação de DNA ao acaso (RAPD) tem sido uma opção simples a ser utilizada. Essa técnica detecta polimorfismos em seqüências de nucleotídeos de diferentes organismos isolados, sem a necessidade de informação prévia sobre a seqüência analisada. Como é uma técnica baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para a análise. Muitos dos produtos gerados pela RAPD-PCR são derivados de seqüências repetitivas do DNA, portanto espécie-específicas e dessa maneira adequados para o delineamento de técnicas de diagnóstico. As bandas de DNA geradas por RAPD-PCR podem ser eluídas do gel e seqüenciadas, para que seqüências que tenham potencial de uso como *primers* sejam selecionadas, analisadas e sintetizadas, com base nos parâmetros de especificidade e de anelamento com a seqüência-alvo.

14. PCR “MULTIPLEX”

A técnica de “multiplex” foi desenvolvida com a finalidade de, com um único teste, altamente específico, promover a diferenciação entre várias espécies ou entre vários gêneros simultaneamente. Essa forma de PCR envolve a amplificação simultânea de mais de uma seqüência-alvo por reação, pela mistura de vários pares de *primers*. Essa técnica é especialmente útil para análise de amostras que contenham parasitas cuja distinção morfológica é difícil ou que se apresentem em número muito baixo. Desse modo, *primers* altamente específicos são usados para amplificar seqüências conhecidas do DNA, produzindo padrões únicos para cada espécie. Essa técnica também pode ser utilizada em análises genômicas.

15. NESTED-PCR

A PCR possibilita a amplificação de seqüências específicas contidas em uma mistura complexa de DNA. Pode-se utilizar *primers* para amplificar um único locus de um genoma inteiro. A partir de uma única cópia do DNA contida na amostra, é possível produzir rapidamente cerca de um bilhão de cópias de produtos de PCR. No entanto, a capacidade de amplificar todas essas cópias aumenta a possibilidade de amplificação de DNA que não seja o desejado. A especificidade da reação é determinada pela especificidade dos *primers*. Por exemplo, se os *primers* usados se ligam a mais de um locus, mais segmentos de DNA podem ser amplificados. Para contornar esses problemas, *primers* internos (*nested*) são desenhados e empregados para testar a especificidade (o segmento de PCR que foi amplificado era realmente o que se desejava amplificar?). Nessa reação ou sucessão de reações, dois pares de *primers* amplificam uma região conhecida do genoma de um organismo qualquer. O primeiro par de *primers* amplifica determinada região com número conhecido de pares de bases. O segundo par *nested primers* se liga a região dentro do primeiro produto produzindo um segundo produto de PCR que será menor do que o primeiro. Dessa maneira, se o primeiro locus a ser amplificado não for a seqüência esperada, a probabilidade de o segundo par de *primers* funcionar é muito baixa. Essas reações também servem para aumentar a sensibilidade das reações em cadeia, já que a segunda reação (*nested-PCR*) pode aumentar em cerca de 100 vezes a sensibilidade das reações. Elas têm sido muito usadas para o diagnóstico de microrganismos em amostras de DNA extraídas de espécimes clínicos diversos.

No teste de PCR para diagnóstico de *Babesia bigemina*, a sensibilidade estimada para as reações foi de 6×10^3 eritrócitos parasitados em 18×10^6 eritrócitos, que corresponde à parasitemia de 0,00003%. Na *nested*-PCR, a sensibilidade estimada foi de 0,0000003%.

16. PCR QUANTITATIVA

A análise quantitativa por meio do estudo cinético da PCR pode ser feita adicionando-se um corante fluorescente à reação. Com isso, conforme a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA de dupla fita, que se liga ao corante, resultando em aumento da fluorescência. Se for colocado em um gráfico o aumento da fluorescência em relação ao número de ciclos, pode-se obter o panorama completo da PCR, inclusive a quantidade inicial do DNA-alvo. Vários equipamentos que realizam esse tipo de análise estão disponíveis comercialmente. As reações quantitativas são muito utilizadas na determinação da expressão de genes específicos e também em técnicas de diagnóstico, em que se pretende saber a quantidade inicial de DNA presente na amostra.

17. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Eletroforese é um método simples e muito eficiente para separar, para identificar e para purificar fragmentos de DNA e de proteínas. Ela consiste na separação de moléculas ionizadas (aminoácidos, peptídeos, proteínas – incluindo lipoproteínas e glicoproteínas –, nucleotídeos, ácidos carboxílicos e outras substâncias de relevância biológica), de acordo com sua carga elétrica e seu peso molecular. Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo).

Para haver migração, é preciso desequilibrar eletricamente duas regiões extremas de um meio que contenha eletrólitos, no qual esteja dissolvida ou dispersa uma substância com potencial para migrar. Para tanto, é estabelecida a diferença de potencial entre dois eletrodos ligados aos terminais de uma fonte de corrente contínua e dispostos em dois compartimentos, catódico e anódico; ambos os compartimentos contém, em geral, uma solução-tampão. O meio físico de separação, igualmente tamponado, se comunica através de suas extremidades com as soluções-tampão dos eletrodos, fechando assim o circuito elétrico. A corrente elétrica, ao passar pelo meio, conduzida pelos pequenos íons presentes na solução, dá ensejo ao deslocamento, por

exemplo, de partículas protéicas carregadas para determinado pólo. Pelo fato de as proteínas serem substâncias anfóteras, ou seja, capazes de adquirirem carga positiva ou negativa de acordo com o pH, é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, por meio do uso de soluções-tampão.

Os ácidos nucleicos, por possuírem carga total negativa (em decorrência do grupamento fosfato), migram sempre em direção ao polo positivo (ânodo).

O sistema tampão usado consiste em duas partes: o tampão usado na preparação do gel e o tampão da cuba eletrolítica, na qual se encontram os eletrodos (ânodo e cátodo). Nos tampões das cubas e do gel, a corrente elétrica é conduzida por íons, e nos eletrodos, por elétrons. Na presença de um sistema tampão adequado, a hidrólise da água, que se dá na superfície dos eletrodos, permite a troca entre elétrons e íons. O sistema tampão pode ser contínuo (o mesmo tampão é utilizado no gel e nos eletrodos) ou descontínuo (quando diferentes composições ou concentrações de tampão são utilizadas no gel e nos eletrodos).

O principal fator a ser considerado na escolha do tampão é a sua capacidade de tamponamento. Os dois tampões mais usados na separação eletroforética de moléculas de DNA são TAE (tampão tris-acetato-EDTA) e TBE (tampão tris-borato-EDTA). Esses dois tampões possuem efeito ligeiramente diferente na mobilidade do DNA. Apesar de o TAE ser mais utilizado, ele é mais facilmente exaurido durante reações longas ou com alta voltagem. O TBE tem melhor capacidade tamponante, mas deve ser evitado para purificação de DNA de géis.

A eletroforese pode ser conduzida em solução com gradiente de densidade ou em diferentes meios de suporte, tais como papel-filtro, sílica-gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliacrilamida. O suporte deve ser química e fisicamente inerte, de modo a não interferir na mobilidade das moléculas.

Em relação aos géis de agarose ou à poliacrilamida, a porosidade do gel determina o poder de resolução das bandas e este geralmente é decorrente do grau de polimerização entre os monômeros.

17.1. Eletroforese em gel de agarose

Quanto ao gel de agarose, o protocolo pode ser dividido em três estágios:

- a) O gel é preparado com agarose na concentração adequada ao tamanho dos fragmentos de DNA a serem separados.
- b) As amostras de DNA são aplicadas nos pocinhos do gel. A voltagem e o tempo são estabelecidos de modo a propiciar a separação ideal das amostras.

- c) O gel é corado e, se o brometo de etídio tiver sido incorporado, as seqüências de DNA serão visualizadas na presença de luz ultravioleta.

17.2. Variáveis que afetam a migração do DNA através do gel de agarose

17.2.1. Concentração de agarose

Moléculas de DNA de fita dupla linear migram através da matriz de gel à taxa inversamente proporcional ao logaritmo (base 10) do seu peso molecular. O peso molecular do fragmento de interesse pode ser determinado por meio da comparação entre a sua mobilidade e a mobilidade de padrões de DNA de peso molecular conhecido. Essa é a característica mais importante da eletroforese em gel de agarose. Ela propicia a caracterização dos fragmentos de DNA por tamanho reprodutível e de forma acurada.

A concentração de agarose participa de modo importante na separação eletroforética, porque é ela que determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. As relações entre concentração de agarose e resolução de moléculas lineares de DNA são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Limites de eficiência da separação de DNA em diferentes concentrações de agarose.

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

Fonte: Maniatis et al. (1982).

17.2.2. Conformação do DNA

Moléculas de DNA de mesmo peso, mas com conformação diferente, possuem taxas de migração diferente. Na ausência de brometo de etídio, moléculas de DNA circulares superenoveladas, como o dos plasmídios, migram mais rapidamente do que

moléculas lineares de mesmo peso molecular. O superenovelamento faz com que as moléculas tenham mais facilidade para migrar através da matriz de gel.

O corante brometo de etídio é comumente adicionado ao gel ou ao tampão de reação, mas pode também ser adicionado em uma solução para corar o gel após a eletroforese. O corante reduz a mobilidade dos dúplíces lineares e tem efeito pronunciado na mobilidade de moléculas de DNA circulares fechadas. Com o aumento da concentração de brometo de etídio, os superenovelamentos negativos são gradualmente removidos, causando a diminuição na mobilidade do DNA. Isso ocorre até a concentração crítica de corante livre, na qual não há mais superenovelamento, geralmente entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A partir desse ponto, a adição de brometo de etídio acarreta a formação de superenovelamento positivo, causando aumento na mobilidade das moléculas. Quando na reação existe gel com diferentes concentrações de brometo, as moléculas de DNA circulares fechadas podem ser facilmente distinguidas dos seus topoisômeros.

O brometo de etídio é usado comumente para visualização direta do DNA nos géis. O corante é intercalado entre as bases empilhadas dos ácidos nucléicos e emite fluorescência vermelho-alaranjada (560 nm) quando iluminado com luz ultravioleta (260 a 360 nm). Isso possibilita que sejam detectadas quantidades muito pequenas de DNA (menos de 5 ng).

17.2.3. Intensidade de corrente

Em geral, fragmentos de DNA migram através do gel à taxa de migração proporcional à voltagem aplicada. O aumento de voltagem faz com que a taxa de migração de grandes fragmentos de DNA seja maior do que a de pequenos fragmentos. Conseqüentemente, voltagens maiores são menos efetivas na separação de grandes fragmentos de DNA. Para separar fragmentos de DNA grandes, o ideal é realizar eletroforese com baixa concentração de agarose e sob baixa voltagem (~ 1 V/cm, em 0,5% de agarose).

A intensidade da corrente elétrica (i), a resistência do meio à migração (R) e a diferença de potencial (ddp) ou a voltagem (V) são variáveis importantes no processo eletroforético. A fonte de corrente contínua produz força eletromotriz, que é medida em volts. A diferença de potencial (em volts) entre os eletrodos, ou melhor, o gradiente de voltagem do meio (volts/m) é o resultado da multiplicação da resistência (em ohms) do meio pela intensidade de corrente (em ampères) que flui por esse meio. A potência P (em watts) desse sistema é o produto da voltagem (volts) e da intensidade de corrente

(em ampères). Para ocorrer migração eletroforética, deve haver compromisso entre a intensidade de corrente i e a voltagem do meio V . Em resumo:

$$V = Ri \quad \text{e} \quad P = Vi \quad \text{ou} \quad Ri^2.$$

Outras equações da eletricidade são de ajuda no entendimento da eletroforese. Assim, a resistência de um sistema condutor é igual à sua resistividade (θ) multiplicada pela razão l/S , em que l é o comprimento do condutor e S é a área da sua seção reta. Por sua vez, a resistividade é função inversa da condutividade (χ). Daí surge:

$$V = Ri = li / \chi S.$$

Esta equação mostra como a condutividade de um meio, função da concentração eletrolítica, influencia a ddp (V) de um meio, ou melhor, como influencia o gradiente de voltagem desse meio ou a intensidade de campo elétrico ($E = V/l$).

18. PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO E FRAGMENTOS DE DIGESTÃO EM GEL DE AGAROSE

Para a análise dos produtos de PCR em géis de agarose, a concentração do gel deve ser escolhida de acordo com o tamanho do produto amplificado (ver Tabela 2).

- **Gel a 1%** → 0,3 g de agarose para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão tris–borato–EDTA 1 X. Para isso, aplicar 5 μ L de produto de amplificação + 1 μ L de *loading buffer* (tampão de corrida).
- **Gel a 3%** → 0,9 g de agarose de baixo ponto de fusão para 30 mL de gel, que deve ser preparado com tampão tris–borato–EDTA 1 X. É utilizado para analisar o resultado das digestões com enzimas de restrição. Aplicar todo o produto da digestão (13 μ L) + 2,6 μ L de *loading buffer*.

Procedimento:

- a) Pesar a agarose.
- b) Colocá-la em um erlenmeyer que contenha o volume necessário de tampão TBE 1 X.
- c) Aquecer no forno de microondas, até iniciar a ebulição (aproximadamente trinta segundos em potência média para gel de 30 mL). Agitar o frasco e retornar ao forno de microondas por mais alguns segundos.

- d) Aguardar a redução da temperatura para aproximadamente 60°C e adicionar brometo de etídio, na quantidade indicada para cada gel. Pode ser necessário acrescentar água destilada, para repor aquela perdida por evaporação.
- e) Verter no molde previamente nivelado e colocar os pentes.
- f) Após a solidificação, colocar o gel na cuba de eletroforese e cobrir com tampão TBE 1 X.
- g) Aplicar as amostras acrescidas de tampão de corrida e estabelecer a corrente de acordo com o tamanho do gel.
- h) A eletroforese deve ser realizada em TBE 1 X, em voltagem constante, na faixa de 2 a 5 V/cm (considerando a distância entre os eletrodos). Caso o fundo do gel esteja muito corado, pode-se lavar o excesso de brometo por submersão em TBE 1 X por cinco a dez minutos.

CUIDADOS

- **O brometo de etídio é um potente agente mutagênico. Usar luvas e máscara para preparar a solução de estoque e para manipular os géis.**
- **A luz ultravioleta produz queimaduras severas. Usar máscara e óculos de proteção adequados.**

19. ELETROFORESE EM SISTEMA CAPILAR

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

A separação das macromoléculas é conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 µm de diâmetro interno e 36 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito. O uso do capilar fornece vantagens sobre as placas de gel, por razões geométricas: há elevada relação entre a área superficial e o volume interno, o que permite a dissipação eficiente do calor gerado pela corrente elétrica e possibilita a

aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm). Isso resulta em separações de alta eficiência, em alto poder de resolução e em reduzido tempo de análise.

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

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

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

Géis físicos são matrizes poliméricas hidrofílicas, dissolvidas em tampão apropriado, que não são ligados à parede do capilar. Assim, eles podem ser substituídos a cada separação, o que permite o aproveitamento do mesmo capilar por centenas de vezes, sem perda de eficiência. A uma dada concentração de polímero, as fitas poliméricas individuais começam a interagir umas com as outras e formam uma estrutura em rede dentro do capilar, o que possibilita a separação dos fragmentos de DNA. A concentração polimérica ótima depende do tamanho do DNA a ser separado.

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

Antes da injeção no capilar, as amostras são desnaturadas em presença de formamida, para evitar que a formação de estruturas secundárias afete a velocidade de migração. Um padrão com fragmentos de tamanho conhecido é aplicado com as amostras para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos analisados. Esse protocolo é utilizado no equipamento IBI 3100 Avant[®] (Applied Biosystems).

Procedimento:

- a) Preparar a mistura de formamida e o padrão interno com fragmentos de tamanho conhecido: para cada amostra, colocar 8,85 μL de formamida Hi-Dy e 0,15 μL de padrão (GS 500 ROX).
- b) Aplicar esses 9 μL de mistura em um poço da placa de corrida.
- c) Aplicar 1 μL de produto de PCR da sua amostra por poço.
- d) Desnaturar as amostras (já na placa de corrida), durante cinco minutos, a 95°C.
- e) Colocar as amostras imediatamente no gelo após a desnaturação e manter aí por cinco minutos.
- f) Preparar a injeção das amostras no analisador e a obtenção dos dados no computador, com o *software Data Collection*[®] (Applied Biosystems).

21. PROTOCOLOS DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA PARASITÁRIO

21.1. PCR para *Babesia bigemina*

- a) Separar as amostras de DNA, preparar o banho de gelo para os microtubos e retirar os reagentes do *master mix* do congelador. As amostras de DNA não devem ter contato com os reagentes do *master mix*.
- b) Limpar a bancada com álcool.
- c) Lavar as mãos e colocar luvas novas.
- d) Marcar os microtubos para PCR (microtubo de 0,2 μL).
- e) Preparo do *master mix* para PCR:

	1 X	_____ X
H ₂ O ultrapura	7,1 µL	_____ µL
Tampão 10 X	1,25 µL	_____ µL
MgCl ₂	0,375 µL	_____ µL
DNTP (20 mM)	0,125 µL	_____ µL
BiIA (10 µM)	0,5 µL	_____ µL
BiIB (10 µM)	0,5 µL	_____ µL
Taq (5 U/µL)	0,15 µL	_____ µL

- f) Distribuir 10 µL do *master mix* por microtubo de 0,2 µL (PCR).
- g) Adicionar 2,5 µL de DNA por tubo com o *master mix* (em local isolado, para evitar contaminações).
- h) Preparar o programa no termociclador, indicando as temperaturas de desnaturação, de anelamento e de extensão, e incubar as amostras, de acordo com o esquema da Fig. 1.

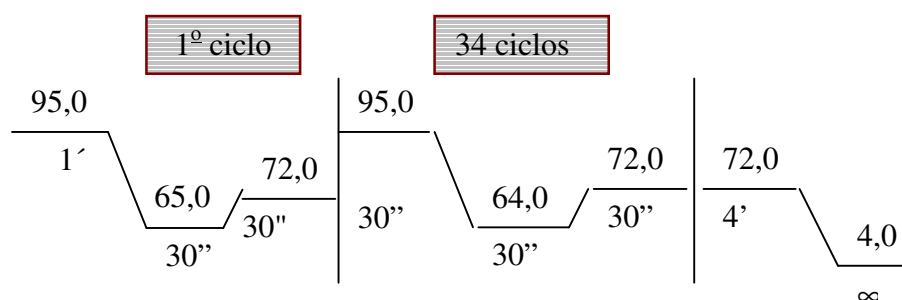


Fig. 1. Demonstração esquemática da programação dos ciclos da PCR com temperatura (°C) e tempo de desnaturação, de anelamento e de extensão.

21.2. Nested-PCR para *Babesia bigemina*

- Preparar o banho de gelo e retirar os reagentes do *master mix* do congelador.
- Limpar a bancada com etanol.
- Lavar as mãos e colocar luvas novas.

- d) Marcar os microtubos para PCR.
- e) Preparar o *master mix* para *nested-PCR* (em tubo de 1,5 mL).

	1 X	_____ X
H ₂ O ultrapura	8,6 µL	_____ µL
Tampão 10 X	1,25 µL	_____ µL
MgCl ₂	0,375 µL	_____ µL
DNTP (20 mM)	0,125 µL	_____ µL
BiIAN (10 µM)	0,5 µL	_____ µL
BiIBN (10 µM)	0,5 µL	_____ µL
Taq (5 U/µL)	0,15 µL	_____ µL

- f) Distribuir 11,5 µL do *master mix* em cada tubo de PCR.
- g) Adicionar 1,0 µL da PCR aos tubos com o *master mix* (em local isolado para evitar contaminações).
- h) Preparar o programa no termociclador e incubar as amostras, de acordo com o esquema da Fig. 2.

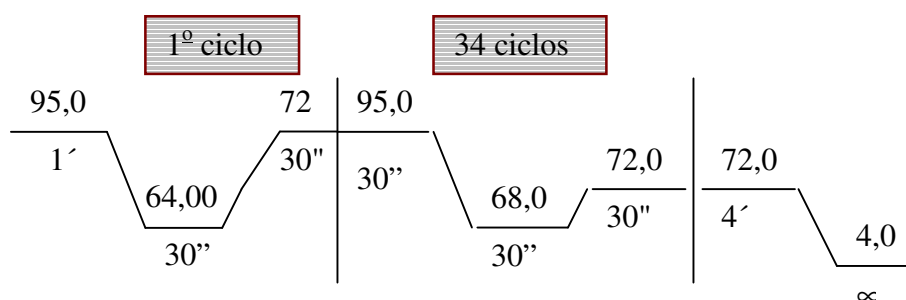


Fig. 2. Demonstração esquemática da programação dos ciclos da PCR com temperatura (°C) e tempo de desnaturação, de anelamento e de extensão.

A Tabela 2 mostra a seqüência dos *primers* de PCR e de *nested-PCR* de *Babesia bigemina* e o tamanho dos produtos amplificados.

Tabela 2. Seqüência dos *primers* de PCR e de *nested-PCR* de *Babesia bigemina* e tamanho dos produtos amplificados.

Seqüência*	Primer	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (pb)
PCR	BiIA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC	278
	BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG	
<i>Nested-PCR</i>)	BiIAN	CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC	170
	BiIBN	CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG	

* Seqüência amplifica a região do fragmento de restrição denominado Spel-Aval de *Babesia bigemina*.
Fonte: Figueroa et al. (1993).

22. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Gel de agarose a 1,5%.

O gel de agarose é preparado na concentração de 1,5% para a visualização dos produtos da PCR com aproximadamente 278 e 170 pares de bases.

Procedimento:

- Pesar 0,45 g de agarose em um erlenmayer.
- Dissolver em 30 mL de tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1 X.
- Aquecer no forno de microondas até iniciar a ebulição (aproximadamente trinta segundos).
- Agitar o frasco com cuidado (a agarose em ebulição tem tendência a transbordar).
- Retornar ao forno de microondas por mais dois a três segundos.
- Aguardar a redução da temperatura para aproximadamente 60 °C e adicionar brometo de etídio (acrescentar 1 µL de brometo para cada 10 mL de gel).
- Verter no molde previamente nivelado e colocar os pentes.
- Após a solidificação (o gel se torna opaco), colocar na cuba de eletroforese e cobrir com tampão TBE 1 X (também pode ser utilizado tampão 0,5 X).
- Aplicar 8 µL de amostra acrescidos de 2 µL de *loading buffer* (tampão da amostra).
- Ligar a fonte e manter a 80 V por cerca de uma hora.
- Visualizá-lo em transiluminador sob luz ultravioleta (Fig. 3).

CUIDADOS

- O brometo de etídio é um potente agente mutagênico. Utilizar luvas e máscara para preparar a solução de estoque e para manipular os géis.
- Não olhar diretamente para a luz ultravioleta.

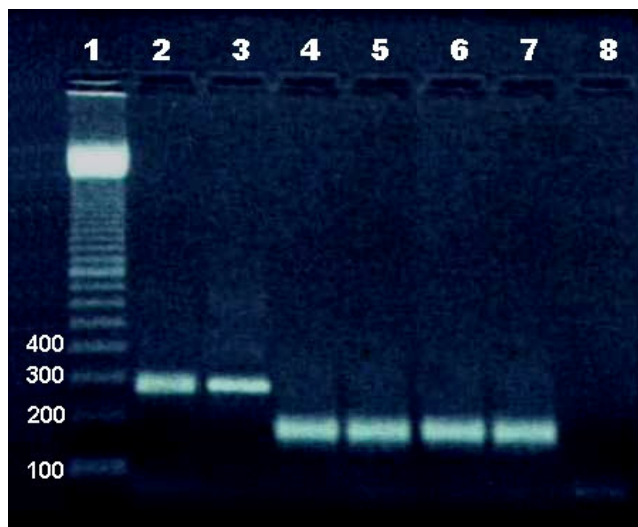


Fig. 3. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bigemina* pelas técnicas de PCR (poços 2 e 3) e de *nested*-PCR (poços 4 a 8). 1) Padrão de pares de bases; 2) DNA de sangue de bovino; 3) Controle positivo de *B. bigemina*; 4) DNA de sangue bovino; 5) DNA de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; 6) DNA de ovos de *R. (B.) microplus*; 7) Controle positivo de *B. bigemina*; 8) Controle negativo da reação (água ultrapura esterilizada)

23. APÊNDICE

Preparo do fenol tamponado:

- a) Colocar 250 mL de fenol líquido (ou 250 g de cristais de fenol fundido em banho-maria a 65°C) em um frasco de vidro.
- b) Adicionar 0,25 g de 8-hidroxiquinolina (antioxidante).
- c) Adicionar 250 mL de tris-base (hidroximetilaminometano) 50 mM.
- d) Agitar em temperatura ambiente por cerca de quinze minutos (usar agitador magnético). Deixar repousar a 4°C até a separação das fases. Aspirar a fase aquosa com cuidado.
- e) Adicionar 250 mL de solução tris-HCl 50 mM com pH 8,0 e novamente repetir os procedimentos dos itens "c" e "d". Verificar o pH da fase fenólica (para isso pode ser usado o papel indicador) e repetir itens "c" e "d" até que o fenol atinja o pH 8,0.
- f) Finalmente, recuperar a fase fenólica, adicionar 125 mL de solução tris-HCl 50 mM com pH 8,0 ou tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM com pH 8,0) e estocar em frascos escuros a 4°C para uso por até dois meses.
- g) Nos protocolos de extração, utilizar a fase fenólica (amarelada) da solução de estoque.

Solução anticoagulante com ácido cítrico:

- a) Ácido cítrico 0,48 g.
- b) Citrato de sódio 1,32 g.
- c) Glicose 1,47 g.
- d) Água ultrapura 100 mL.
- e) Usar 3,5 mL para cerca de 20 mL de sangue.

Solução de estoque TBE (tris-borato-EDTA) concentrada 10 X:

Tris-base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M, com pH 8,0	40 mL

Solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M (pH 8,0):

- a) Dissolver 186,1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 700 mL de água.
- b) Ajustar o pH para 8,0 com solução de NaOH 10 M.
- c) Adicionar água ultrapura, q.s.p. 1000 mL.
- d) Esterilizar em autoclave a 121 °C por quinze minutos.

Observações:

- 1) O EDTA é um agente quelante que impede a ação de enzimas sobre o DNA.
- 2) O EDTA é insolúvel em pH inferior a 8,0; por essa razão, é importante ajustar o pH antes de completar o volume.

Solução-tampão tris-HCl (hidroximetilaminometano-ácido clorídrico) 1 M:

- a) Dissolver 121 g de tris-base em 800 mL de água ultrapura.
- b) Ajustar o pH com HCl concentrado. Cerca de 70 mL de HCl são necessários para pH 7,4; e 42 mL, para pH 8,0.
- c) Adicione água ultrapura até completar 1000 mL.
- d) Autoclavar a 121 °C por quinze minutos.

Obs.: O tris tem a função de manter constante o pH das soluções.

Solução-tampão TE (tris-EDTA):

- a) Tris-HCl 10 mM, com pH 7,4, 7,5 ou 8,0.
- b) EDTA 1mM.

Tampão de corrida da amostra 6 X concentrado (estocar a 4°C):

Azul de bromofenol a 0,25%	25 mg
Xileno cianol a 0,25%	25 mg
Solução aquosa de glicerol a 30%	10 mL

Tampão de lise 1:

Tris-HCl, com pH 8,0	10 mM
EDTA, com pH 8,0	10 mM
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	0,5%
Solução de RNase (adicionar no momento do uso)	20 µg/mL

Tampão de lise 2:

2-mercaptoetanol	2%
Tris-HCl, com pH 8,0	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA, com pH 8,0	10 mM
SDS	0,5%

Obs.: Preparar no momento do uso.

Solução-tampão de fosfato (PBS):

KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
pH	7,0

Solução de proteinase K (20 mg/mL):

Proteinase K	100 mg
Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)	5 mL
Cloreto de cálcio	20 mM
Glicerol	50%

Obs.: Estocar a -20 °C.

Tampão de digestão 1:

NaCl	100 mM
Tris-HCl, com pH 8,0	10 mM
EDTA, com pH 8,0	25 mM
SDS	0,5%
Proteinase K	0,1 mg/mL

Tampão de digestão 2:

Tris-HCl	10 mM
EDTA, com pH 8,5	1mM
Triton X-100	5%

Obs.: Estocar a -4 °C.

Solução de RNase 1 (10 mg/mL):

RNase	10 mg
Tris-HCl, com pH 7,5	10 mM
NaCl	15 mM

Obs.: Estocar a -20 °C.

Solução de RNase 2 (10 mg/mL):

RNase	10 mg
Acetato de sódio (CH ₃ COONa) 0,01 M, com pH 5,2	1 mL
Tris-HCl 1 M, com pH 7,4	0,1 mL

Obs.: Estocar a -20 °C.

Solução de acetato de sódio 0,01 M:

Acetato de sódio (CH ₃ COONa)	0,082 g
Água ultrapura	100 mL

Solução de CTAB a 10%:

CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio)	10 g
Água ultrapura	100 mL

Solução de NaCl 5 M:

NaCl	292,25 g
Água ultrapura	1.000 mL

Solução-tampão para extração vegetal:

Soluções e reagentes	Concentração final	Volume (final = 10 mL)
CTAB a 10%	2%	2,0 mL
NaCl 5 M	1,4 M	2,8 mL
Tris-HCl 1 M, com pH 8,0	0,1 M	1,0 mL
EDTA 0,5 M	20 mM	400 µL
2-mercaptoetanol	0,4%	40 µL
Polivinilpirrolidona	1,0%	0,1 g
Água ultrapura		3,76 mL

24. REFERÊNCIAS

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, p. 69-81, 1993.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROCK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1992.

25. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley & Sons, 1996. 4800 p.

BRAMMER, S. P. **Atualizações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 404 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 191, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, M. C.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP na análise genética**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1995. 220 p.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237-8, 1989.

LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. New York: Scientific American Books, 1995. 1344 p.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROCK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Molecular detection of parasitic protozoa. **Parasitology**, v. 117, p. 73-85, 1998.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods of Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica**. 3^a ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., 2004. 975 p.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; ARAUJO JR., J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia spp.* infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 61-67, 2005.

SILVA JÚNIOR, J. G. da. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125 p.

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

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

ZARLENGA, D. S.; CHUTE, M. B.; MARTIN, A.; KAPEL, C. M. O. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of six encapsulated and three non encapsulated genotypes of *Trichinella*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 141-149, 1999.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 215-230, 2001.

ZARLENGA, D. S.; STRINGFELLOW, F.; NOBARY, M.; LICHTENFELS, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda, Trichostrongyloidea) and identification of PCR primers for rapid differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 78, p. 28-36, 1994.