

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Ano Lectivo 2007/2008**

**Disciplina de BIOQUÍMICA I
Curso de MEDICINA
1º Ano**

ENSINO PRÁTICO E TEORICO-PRÁTICO

9ª AULA PRÁTICA

EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Considerações gerais

No núcleo das células humanas, a cromatina está organizada em 23 pares de cromossomas.

- heterocromatina - condensada, genes inactivos;
- eucromatina - descondensada, genes activos.

A informação contida nos genes está armazenada nos ácidos nucleicos, que são polímeros de nucleótidos.

NUCLEÓTIDOS

Os nucleótidos são ésteres fosfóricos dos nucleósidos. Da sua hidrólise completa, liberta-se uma pentose (ribose ou desoxirribose), uma base azotada (púrica ou pirimídica) e uma molécula de ácido fosfórico (carácter ácido).

Os nucleótidos têm uma grande importância biológica, essencialmente por duas razões:

1. São constituintes fundamentais dos ácidos nucleicos;
2. Fazem parte da estrutura de coenzimas muito importantes; alguns participam no metabolismo intermediário e nas reacções do metabolismo energético celular.

No entanto, é como constituintes dos ácidos nucleicos que eles desempenham a sua função biológica essencial, participando nos mecanismos moleculares de conservação, replicação e transcrição da informação genética.

Devido a terem na sua constituição bases azotadas, os nucleótidos podem ser detectados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 260 nm.

Podem ser separados por electroforese em papel ou em gel de agarose e por cromatografia de troca iónica, em papel ou em coluna, porque, pelo facto de na sua constituição existir ácido fosfórico, são moléculas com carga negativa a $\text{pH} \geq 7$.

ÁCIDOS NUCLEICOS

São macromoléculas resultantes da polimerização de um número elevado de nucleótidos. Há dois tipos fundamentais de ácidos nucleicos:

- DNA ou ácido desoxirribonucleico (Watson & Crick, 1953)
- RNA ou ácido ribonucleico
 - RNAm (RNA mensageiro)
 - RNAt (RNA de transferência)
 - RNAr (RNA ribossómico)

O DNA e o RNA são ácidos nucleicos, que armazenam e transmitem a informação nas células – código genético.

DNA

O DNA existe na forma de uma hélice, composta por duas cadeias complementares unidas por ligações de hidrogénio, com as seguintes características:

- Bases nitrogenadas – no interior da hélice (perpendicular ao eixo da hélice)
- Fosfato e pentose – no exterior da hélice, papel estrutural (ângulo recto em relação às bases)
- A pH neutro, o grupo fosfato confere carga negativa ao DNA; uma vez que existe um grupo fosfato por cada base, a razão carga/massa permanece constante
- Diâmetro ~20 Å
- Cadeias unidas por ligações de hidrogénio: A=T; G≡C
- Bases adjacentes interagem por forças de van der Waals
- O aparecimento das cadeias é unidireccional: 5' ⇨ 3'

Formas do DNA: hélice linear simples (vírus)
 circular (mitocondrial)
 dupla hélice (três formas: A, B (+) e Z)

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DNA:

*Peso molecular elevado

*Viscosidade (índice de enrolamento)

*A dupla hélice pode ser desnaturada por efeito de: temperatura, pH's extremos, ureia e formamida, enzimas (helicases).

*A desnaturação depende do conteúdo em bases (T_m). A renaturação é espontânea, sob condições normais.

*Susceptível de hidrólise ácida suave; não é hidrolisado por bases diluídas

*Não forma intermediários cíclicos

*Liga Mg^{2+} e Ca^{2+}

*Pode sofrer hidrólise enzimática (desoxiribonucleases ou endonucleases).

RNA

O RNA existe normalmente na forma de cadeia simples, com as seguintes características:

*Material genético de vírus, bactérias, animais e Homem

*Existe sob três formas fundamentais: RNAm (RNA, surge por acção da RNA polimerase II), RNAt (surge por acção da RNA polimerase III), RNAr (surge por acção da RNA polimerase I): o primeiro codifica a informação genética do DNA; o segundo, descodifica - traduz - a sequência de bases do RNAm em aminoácidos; o último, combinado com proteínas, forma os ribossomas, onde se ligam todas os componentes necessários para a síntese proteica.

*A RNA polimerase II é a enzima responsável pela transcrição (síntese de RNA a partir de DNA).

*O conjunto de genes que são transcritos para a mesma molécula de RNAm, em conjunto com os locais de controle, chama-se operão. A RNA polimerase liga-se a um local específico do operão, o promotor.

*Existem sequências de DNA que interagem com proteínas específicas e influenciam a taxa de transcrição - *enhancers*.

*A transcrição é iniciada no local cap, +1, com o 1º nt, m7Gppp, terminando quando a RNA polimerase transcreve a sequência AAUAAA; a seguir (15 a 30 nt depois), é adicionada uma cauda poly A.

*O RNA, copiado directamente do DNA, o transcrito primário, sofre modificações, antes de ser traduzido (splicing).

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO RNA:

*Solúveis em soluções salinas diluídas

*Desnaturação química, (alcalina), física (aquecimento) e enzimática (ribonucleases)

*Separáveis por ultracentrifugação e cromatografia.

Diferenças fundamentais entre DNA e RNA:

	HÉLICE	BASES AZOTADAS	PENTOSE
DNA	DUPLA	Adenina = Timina Guanina ≡ Citosina	Desoxirribose
RNA	SIMPLES	Adenina = Uracilo Guanina ≡ Citosina	Ribose

PROPRIEDADES DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- Os ácidos nucleicos são pouco solúveis em ácidos diluídos;
- Podem ser extraídos das células, usando o fenol ou soluções salinas neutras concentradas, e precipitados por etanol;
- Os ácidos nucleicos podem ser degradados por hidrólise química (alcalina), ou enzimática (endonucleases);
- São insolúveis em solventes orgânicos, muito solúveis em soluções salinas diluídas e moderadamente solúveis na água. Podem ser separados por cromatografia em coluna, por ultracentrifugação em gradiente de densidade de sacarose, ou por electroforese em gel;
- Absorvem radiação UV a 260 nm, o que permite a sua identificação e caracterização.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A DETECÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DEFINE-SE NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA - (λ de absorção máxima a 260 nm, dependendo das bases que entram na sua constituição).
- EFEITO HIPERCROMÁTICO – consiste no aumento de absorção, a um dado λ , com a desnaturação das cadeias.
- Reagem com a DIFENILAMINA formando um complexo corado azul por ligação à desoxiribose e aquecimento (Reacção de DISHE - típica das **desoxirriboses**). É assim, possível a sua detecção por espectrofotometria a $\lambda = 600$ nm.
- Reagem com a solução de ORCINOL (10 %) na presença de FeCl_3 e aquecimento formando um complexo amarelo por ligação à ribose (Reacção de BIAL típica das **riboses**), o que permite a sua detecção por espectrofotometria a $\lambda = 670$ nm.

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTAIS

A manipulação de ácidos nucleicos, tanto para extracção como para manipulação e análise genética, assenta em determinados princípios básicos a ter em conta, nomeadamente, as pipetagens de precisão, realizadas com micropipeta (tipo *EPPENDORF* ou *GILSON*); a esterilidade de todos os materiais e soluções usadas; a pureza dos reagentes, que deve ser, sempre que possível, de grau de pureza molecular ou adequados a estudos de biologia molecular; a água usada para a preparação das soluções deve ser H₂O *milli-Q* autoclavada; devem ser usadas bata e luvas de látex, para prevenir contaminações; devem observar-se as precauções adequadas ao manuseamento de produtos químicos tóxicos, como o brometo de etídeo, à radiação ultra-violeta (UV) e ao uso de electricidade de alta voltagem.

EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGUE TOTAL:

Existem inúmeros métodos para extrair DNA. O protocolo apresentado (descrito por Laura-Lee Boodram, 2004 - *Department of Life Sciences, The University of the West Indies*) apresenta uma alternativa rápida e eficaz na obtenção de DNA sem o uso de solventes orgânicos. É usada uma extracção com solução salina (NaCl 5,3 M) para remover as proteínas da amostra. Este passo é fundamental na obtenção de DNA com qualidade para ser analisado, nomeadamente por PCR. É possível obter 100-200 µg de DNA a partir de 4-8 ml de sangue.

QUANTIFICAÇÃO DE DNA

No sentido de estimar a concentração de DNA (Moore et al., 1997), cada amostra extraída (5 µl) é diluída (1:100) em H₂O *milli-Q* estéril, num tubo cónico de 1,5 ml (tipo *EPPENDORF*), submetida a agitação (*RETSCH MIXER*) para homogeneização da solução, sendo depois colocada em cuvette de quartzo e submetida a leitura da densidade óptica a 260 nm (DO_{260}), para avaliar a quantidade de DNA, e a 280 nm (DO_{280}) para estimar a contaminação com proteínas, num quantificador automático GeneQuant II (RNA/DNA CALCULATOR, AMERSHAM BIOSCIENCES). O quociente entre DO_{260} e DO_{280} deve situar-se entre 1,5 e 2, para se considerar que estamos perante uma amostra de DNA com pureza adequada para análise posterior. Um valor inferior indica contaminação com proteínas e um

valor superior indica contaminação com RNA. A concentração de DNA total foi estimada, de acordo com a **Equação 1**, tendo em conta que uma unidade de DO corresponde à concentração de 0,050 ug/ul de DNA de dupla cadeia (dsDNA) (Moore et al., 1997).

$$[\text{DNA}] \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{DO}_{260} \times 0,05 \times \text{factor diluição} \quad (\text{Equação 1})$$

NOTA: Também é possível usar espectrofotometria de visível para estimar os ácidos nucleicos DNA e RNA, “corando-os”, embora seja uma forma menos rigorosa de os determinar. O reagente de Difenilamina (**Reacção de Dishe ou da Difenilamina**) forma um complexo corado com o DNA, que é detectado por espectrofotometria de absorção a 600 nm. Essa reacção é característica das **desoxirriboses**. Se fizermos reagir um extracto de ácidos nucleicos com uma solução de orcinol a 10 %, na presença da FeCl_3 (**Reacção de Bial ou do orcinol**), com aquecimento, forma-se um complexo corado, detectando o RNA por espectrofotometria de absorção visível, a 670 nm. A reacção é característica das **riboses**. Através deste método, utilizam-se soluções padrão de DNA e RNA 0,01 % estabelecendo uma relação entre a D.O. e a concentração (aplicando a Lei de Beer-Lambert), em que a D.O. = $\epsilon \times l \times c$.

Referências:

Helms, C. Salting out Procedure for Human DNA extraction. In The Donis-Keller Lab - Lab Manual Homepage [online]. 24 April 1990. [cited 19 November 2002; 11:09 EST]. Available from: http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/dna/dna2.html.

Epplen, J.E., and T. Lubjuhn. 1999. DNA profiling and DNA fingerprinting. Birhkauser Verlag, Berlin. p.55.

Ano Lectivo 2007/2008

BIOQUÍMICA I
1º Ano

PROTOCOLO DE BANCADA - 9ª AULA PRÁTICA

EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Reagentes

Tampão A (Tampão de lise dos glóbulos vermelhos):

0,32 M sacarose; 10 mM Tris HCl ; 5 mM MgCl₂; 0,75% Triton-X-100 ; (pH a 7,6).

Tampão B (desproteínização):

20 mM Tris-HCl; 4 mM Na₂EDTA; 100 mM NaCl; (pH a 7,4).

H₂O *milliQ*

SDS 10%

Solução de Proteinase K (20 mg/ ml)

NaCl 5,3 M

Isopropanol frio

Etanol 70% frio

TrisHCl 10 mM

Nota: Todas as soluções devem ser estéreis. A esterilização pode ser efectuada por autoclavagem (antes da adição de Triton-X-100) ou por filtração, **0,22 µm** (melhor opção).

Procedimento para extracção (amostra: 5 ml de sangue, 1 volume):

- Adicionar 1 volume de tampão A e 2 volumes de H₂O MilliQ estéril a 4°C.
- Submeter a vortex moderado ou inverter o tubo 6-8 vezes.
- Incubar em gelo durante 2-3 minutos.
- Centrifugar a 3500 rpm, durante 15 minutos a 4°C.
- Remover o sobrenadante para uma solução de lixívia a 2,5%.
- Ressuspender o sedimento em 2 ml de Tampão A e 6 ml de H₂O (vortex 30 segundos em velocidade média).
- Centrifugar a 3500 rpm, durante 15 minutos a 4°C.
- Retirar o sobrenadante. O sedimento deve ser de cor clara. Se estiver vermelho, repetir o passo anterior (lavagem).
- Adicionar 5 ml de Tampão B e 500 µl de SDS a 10% ao sedimento e ressuspender (vortex forte 30-60 segundos. Adicionar 50 µl de Solução de Proteinase K (20 mg/ml). Esta solução deve ser preparada antes de usar e mantida a 4°C ou pode ser conservada a -20 °C por tempo mais prolongado.
- Incubar a 55°C durante 1-2 horas.
- Colocar em gelo durante 2-3 minutos.
- Adicionar 4 ml de NaCl a 5,3 M. Vortex suave durante 15 segundos.
- Centrifugar a 4500 rpm durante 15-20 minutos a 4°C.
- Transferir o sobrenadante cuidadosamente para um tubo limpo.
- Adicionar 1 volume de isopropanol frio (guardado a -20°C).
- Inverter o tubo 5-6 vezes para precipitar o DNA.
- Remover a “medusa” com uma pipeta de Pasteur para um tubo eppendorf 1,5 ml e lavar (17949 g ~13000rpm-EPP, 10 minutos) com 1 ml de etanol frio a 70%.
- Deixar secar 15-20 minutos a 37°C ou 5-10 minutos a 55°C.
- Ressuspender em 300-400 µl de TrisHCl a 10 mM pH 8,5.
- Deixar solubilizar durante a noite.
- Guardar a 4°C.

Procedimento para a quantificação:

1. Diluir 10 µl da solução de DNA em 1000 µl de H₂O, num eppendorf 1,5 ml.
2. Vortex suave da amostra.
3. Leitura da DO (densidade óptica) a 260 nm (DNA) e a 280 nm (PROTEÍNAS).
O quociente entre DO₂₆₀ e DO₂₈₀ deve situar-se entre 1,5 e 2.
4. Cálculo: $[DNA] = DO_{260} \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{factor de diluição (100)} = (DO_{260} \times 5) \mu\text{g}/\mu\text{l}$