

Extração de DNA para Aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PROCI-2001.00164

REG

2001

SP-2001.00164

Luciana Correia de Almeida Regitano

Introdução

Diversos métodos estão disponíveis para a obtenção de DNA genômico de mamíferos, que diferem principalmente no que diz respeito à qualidade do DNA (grau de contaminação com outros componentes celulares). De modo geral, os métodos envolvem as seguintes etapas:

- Rompimento da membrana celular e liberação do conteúdo celular (lise).
- Remoção das proteínas e dos restos celulares.
- Precipitação dos ácidos nucleicos.
- Remoção enzimática do RNA.

A escolha do método depende do tipo de tecido a ser utilizado como fonte de ácido nucleico (composição, grau de agregação celular), da finalidade do experimento (*Southern Blot*, construção de bibliotecas genômicas, PCR, etc.) e da disponibilidade de reagentes e de equipamentos no laboratório. Neste capítulo serão apresentados alguns métodos para o preparo de amostras de DNA de mamíferos, rotineiramente utilizados no Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste para aplicação em PCR.

Antes de iniciar a apresentação dos métodos, serão ressaltados alguns cuidados que devem ser observados durante o trabalho com ácidos nucleicos:

- As secreções e os microrganismos da pele podem conter nucle-

ases, enzimas que degradam os ácidos nucleicos. Para prevenir a contaminação das amostras com essas enzimas, é importante que sejam utilizadas luvas descartáveis durante a manipulação das amostras, dos reagentes e dos acessórios de laboratório (ponteiras, tubos, pipetas, etc.). As luvas de látex, utilizadas para procedimentos cirúrgicos, são as mais adequadas, pois não interferem no tato. Além disso, salvo exceções, tais como soluções contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) ou enzimas, as soluções e os recipientes devem ser esterilizados da maneira mais apropriada para cada caso (calor úmido, calor seco, filtração). Nos casos em que não é possível proceder à esterilização, como os citados acima, prepara-se a solução com todos os componentes passíveis de esterilização, adicionando-se os demais no momento do uso. É importante utilizar reagentes com grau de pureza próprio para biologia molecular.

- O DNA é adsorvido pelo vidro, particularmente em presença de alguns sais como o iodeto de sódio. Assim, é recomendável que sejam utilizados tubos e acessórios de polipropileno para as fases em que o DNA se encontra livre em solução.
- As moléculas de ácidos nucleicos são sensíveis à fragmentação mecânica, de tal forma que

se deve evitar agitação intensa dos tubos após a liberação do conteúdo celular (lise).

- Devido à sensibilidade da técnica de PCR, recomenda-se a utilização de material descartável (ponteiras, microtubos), evitando-se a contaminação de uma amostra com DNA de outras.

Preparo de amostras de DNA de mamíferos

Uma das vantagens da PCR, além da sensibilidade, é a flexibilidade, quando comparada à de outras técnicas de biologia molecular. Ao contrário do que ocorre, por exemplo, com a utilização de endonucleases de restrição, a reação catalisada pela *Taq* DNA polimerase pode ocorrer mesmo em presença de contaminantes, tais como proteínas, e de algum grau de degradação do DNA. Essa última característica é especialmente importante, pois permite a análise de amostras obtidas a partir de fósseis e de evidências forenses. Entretanto, alguns contaminantes específicos podem ser prejudiciais. No caso da extração de DNA de sangue, o principal cuidado deve ser com a completa eliminação da hemoglobina, uma vez que as porfirinas possuem ação inibitória sobre a *Taq* DNA polimerase (Higuchi, 1989).

A seguir, dois métodos de extração de DNA a partir de amostras de sangue são descritos.

O primeiro método foi adaptado de Olerup & Zetterquist (1992) e tem

sido utilizado no Laboratório de Biotecnologia Animal do CPPSE quando se pretende obter DNA em grande quantidade, que possa ser armazenado por longos períodos, para análise de muitos marcadores. A principal alteração introduzida foi a substituição da extração das proteínas com solventes orgânicos pela precipitação das proteínas com cloreto de sódio (Miller et al., 1988). As vantagens dessa substituição são a redução da quantidade de poluentes gerados pela rotina do laboratório e dos riscos resultantes da exposição contínua do laboratorista a solventes orgânicos. A questão de segurança do operador é especialmente pertinente nos laboratórios que desenvolvem atividades de ensino. Além disso, a qualidade do fenol é essencial para a obtenção de bons resultados. Recomenda-se o uso de fenol bi-destilado mas, mesmo nesse caso, a vida útil é pequena ocorrendo formação de radicais livres que podem resultar em complexos com o DNA, impossibilitando sua utilização.

O segundo método apresentado é um método rápido, descrito por Higuchi (1989), ideal para aplicação em rotina de diagnóstico, quando não há necessidade de estocar o material por longos períodos. Neste capítulo será também apresentado um método próprio para extração a partir de amostras de sêmen, adaptado de Zadworny & Kuhnlein (1990), também modificado no que diz respeito à extração de proteínas.

Para facilitar o uso, os métodos são apresentados sob a forma de protocolos de laboratório.

Extração de DNA de sangue fresco utilizando desproteinização com sal

Obtenção de leucócitos:

- Colher 5 mL de sangue em tubos para coleta a vácuo com EDTA potássico (50 µL EDTA (K_3) a 15%).
- Centrifugar por 5 minutos a 400 g e descartar o plasma, utilizando um micropipetador, com cuidado, para não descartar as células brancas que se encontram na interface.
- Lisar os glóbulos vermelhos com 10 mL do tampão de hemólise (solução A), e homogeneizar por inversão, várias vezes, até obter uma coloração escura e homogênea.
- Centrifugar por 10 minutos a 700 g a 4°C.
- Remover o sobrenadante.

Obs.: Nessa fase, a grande quantidade de hemoglobina livre dificulta a visualização do precipitado de células brancas, sendo aconselhável remover o sobrenadante com auxílio de micropipetador.

- Dissolver o precipitado em 5 mL do tampão de hemólise (solução A). Misturar bem por inversão e, se preciso, usar o agitador (*vortex*).

- Centrifugar a 700 g por 10 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante.
- Repetir os dois passos anteriores, até obter somente leucócitos, sem resíduos de hemoglobina (duas lavagens adicionais são geralmente suficientes).
- Dissolver o precipitado em 500 µL do tampão de hemólise e transferir para microtubos de polipropileno.
- Centrifugar por 1 minuto a 16.000 g e descartar o excesso de sobrenadante, deixando apenas as células brancas cobertas com uma fina camada de tampão.

Obs.: Nessas condições as células podem ser conservadas a -20°C por vários meses.

Extração do DNA:

- Colocar em suspensão os leucócitos em 500 µL de solução de proteinase K (solução B).
- Incubar a 55°C, até dissolver o precipitado (de 4 a 6 horas ou durante a noite). Homogeneizar as amostras após 1 hora de incubação, para que fiquem bem dissolvidas.

Obs.: A partir dessa fase, a amostra fica bastante viscosa. Como as moléculas de DNA são longas, são sensíveis à fragmentação mecânica. Movimentos bruscos durante a aspiração da solução, bem como durante os procedimentos para dissolução de sedimentos devem ser evitados.

- Adicionar mais 500 µL de solução B sem proteinase K e 316 µL de NaCl 5 M.
- Centrifugar por 15 minutos a 16.000 g.
- Transferir o sobrenadante para dois tubos de 1,5 mL, tomando o cuidado de não transferir mais do que 500 µL para cada tubo.
- Adicionar 1 mL de etanol absoluto, gelado, e inverter os tubos várias vezes. Centrifugar por 15 minutos a 16.000 g.
- Lavar com 500 µL de etanol a 70%, gelado. Centrifugar por 5 minutos a 16.000 g e descartar o etanol. Deixar secar ao ar.
- Dissolver em 250 µL de solução TE + 0,25 µL de solução de RNase (10 µg de Ribonuclease A por mililitro de amostra) e incubar por 1 hora.
- Medir a concentração da preparação por leitura em espectrofotômetro.

Quantificação em espectrofotômetro:

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, normalmente se utiliza diluição no mesmo diluente em que se encontra a amostra. Para estimar a concentração de DNA, a seguinte relação é utilizada:

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g/mL de DNA dupla-hélice.}$$

A concentração de DNA na amostra é obtida pelo cálculo:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{Valor da leitura em } A_{260} \times 50 \times \text{Fator de diluição.}$$

As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Assim, a relação A_{260}/A_{280} fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína. É importante ressaltar que a relação entre o valor da leitura e a concentração de DNA foi estabelecida para amostras puras. Em presença de contaminantes, essa relação pode não ser verdadeira.

A média de rendimento desse protocolo em bovinos é de aproximadamente 300 µg de DNA, com média de 1,4 para a relação A_{260}/A_{280} . Para utilização em PCR, essa relação é satisfatória. Entretanto, havendo necessidade de amostras mais purificadas, nova desproteínização pode ser conduzida após a ressuspensão em TE. Para tanto, acertar o volume para 380 µL com TE, adicionar 120 µL de NaCl 5 M e repetir os passos 14 a 18 descritos acima, não havendo necessidade de acrescentar RNase.

Método rápido de extração de DNA de sangue

Para que a extração de DNA de sangue seja feita de forma mais rápida, deve-se seguir os seguintes passos:

- Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, colocar 0,5 mL de san-

que total e 0,5 mL de Solução de lise I.

- Centrifugar a 13.000 g por 20 segundos.
- Remover o sobrenadante e dissolver o precipitado em 1,0 mL de solução de lise I.
- Repetir os dois passos anteriores duas vezes.
- Centrifugar a 13.000 g por 20 segundos, remover o sobrenadante e dissolver o sedimento em 0,5 mL de solução de PCR acrescido de detergente não-iônico (triton X-100) e proteinase K.
- Incubar a 50°C – 60°C por 1 hora.
- Inativar a proteinase K a 95°C por 10 minutos.
- Armazenar a -20°C.

Esse protocolo rende em torno de 10 a 20 µg de DNA, sendo suficiente a utilização de 5 µL da suspensão de DNA por reação de PCR. A determinação da concentração é um caso particular, uma vez que as proteínas do extrato são apenas hidrolisadas pela proteinase K, e a amostra retém contaminação com aminoácidos e pequenos peptídeos. Nesse caso, a espectrofotometria não fornece boas estimativas da concentração de DNA na amostra. Uma alternativa é utilizar o fluorocromo Hoechst 33258 e medir a emissão de fluorescência em fluorímetro, nos comprimentos de onda de 365 nm para excitação e 460 nm para leitura da emissão de fluorescência.

Extração de DNA de sêmen

Para a extração de DNA de sêmen, deve-se seguir os seguintes passos:

- Descongelar 1 paleta em cada microtubo de 1,5 mL.
- Centrifugar por 8 minutos a 16.000 g.
- Lavar o precipitado 4 vezes em 1 mL de PBS 1 X. A cada lavagem passar no *vortex* até a completa dissolução e centrifugar novamente. É fundamental assegurar que todo o precipitado fique bem dissolvido antes da centrifugação em cada lavagem.
- Colocar em suspensão em 100 µL de PBS. Nesse ponto as amostras podem ser armazenadas a -20°C, para posterior processamento.
- Adicionar 400 µL de solução de lise II. Incubar 30 minutos a 50°C e dissolver o sedimento.
- Adicionar 100 µg de proteinase K (5 µL da solução-estoque a 20 mg/mL). Passar no *vortex* até dissolver. Incubar por 16 horas a 50°C.
- Dividir as amostras em dois tubos, 250 µL em cada tubo.
- Adicionar 80 µL de NaCl 5M por tubo. Agitar vigorosamente por inversão. Centrifugar a 16.000 g por 15 minutos.
- 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 5 minutos.

- Descartar o sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol a 70% (simplesmente acrescenta-se 100 μ L de etanol a 70% a cada tubo. Não passar no *vortex*).
- Centrifugar a 16.000 g por 5 minutos. Desprezar o sobrenadante. Secar o sedimento de DNA e colocar em suspensão em 100 μ L de TE + RNase.
- Incubar por 1 hora.
- Medir a concentração em espectrofotômetro.

Soluções

Todas as soluções aquosas são preparadas com água ultra pura.

Solução A

10 mM Tris HCl pH 7,6
5 mM $MgCl_2$
10 mM NaCl

Autoclavar e armazenar a 4°C, por até uma semana.

Solução B

Essa solução é preparada pela diluição de soluções concentradas que, com exceção das soluções de SDS e de proteinase K, foram previamente autoclavadas.

Para uma amostra (500 μ L)

Volume de solução estoque	Concentração final
5 μ L de Tris HCl pH 8,0 1 M	10 mM
10 μ L de NaCl 5 M	100 mM
10 μ L de EDTA pH 8,0 0.5 M	10 mM
12,5 μ L de SDS a 20%	0,5%

- Completar o volume com 460,5 μ L de água.
- Adicionar 2 mL de solução de proteinase K na concentração 20 mg/mL no momento do uso.

Preparar, para cada amostra, mais 500 mL dessa mesma solução sem adição de proteinase K, a ser utilizada no item 13 do protocolo, substituindo o volume correspondente à proteinase K por água.

TE

10 mM Tris HCl pH 7,6
1 mM EDTA

Solução de RNase (10 mg/mL)

Dissolver a enzima Ribonuclease A livre de DNase (Sigma R-6513) em solução 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl.

Armazenar a -20°C.

Obs.: Algumas preparações de Ribonuclease A não são livres de DNase, como a descrita acima. Nesse caso, há necessidade de ferver a solução por 15 a 30 minutos, antes de armazenar. Esse procedimento não é recomendável para a enzima Sigma R-6513.

Solução de proteinase K (20 mg/mL)

Dissolver 100 mg da enzima em 5 mL de solução 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 20 mM CaCl₂, glicerol 50% (v/v).

Fazer alíquotas e armazenar a -20°C.

Solução de Lise I (3,5 mL por amostra)

0,32 M Sacarose
10 mM Tris HCl pH 7,5
5 mM MgCl₂
1% (v/v) Triton X-100

Obs.: O Triton pode ser adicionado na forma de solução aquosa a 10%, esterilizada por filtração. Essa solução pode ser mantida à temperatura ambiente, protegida da luz.

Solução de PCR (500 µL por amostra)

50 mM KCl
10 mM Tris HCl pH 8,3
1,5 mM MgCl₂
1% (v/v) Triton X-100 (ver comentário na solução de lise)

Adicionar, no momento do uso, 0,3 µL de solução de proteinase K a 20 mg/mL para 100 µL de solução

PBS (Solução estoque 10 X concentrada):

27 mM	KCl
15 mM	KH ₂ PO ₄
1,37 M	NaCl
80 mM	Na ₂ HPO ₄

Autoclavar em alíquotas. Diluir na proporção 1:10 com água estéril no momento do uso. pH ~7,3

Solução de Lise II:

2% (v/v)	2-mercaptoetanol
10 mM	Tris HCl (pH 8.0)
100 mM	NaCl
10 mM	EDTA (pH 8.0)
0.5%	SDS

Referências bibliográficas

HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich, H.A., ed. **PCR technology: principles and applications for DNA amplification**. UK: Macmillan Publishers, 1989. p.17-22.

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.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.

ZADWORNÝ, D.; KUHNLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.