

CPPSE  
AIN  
SEPARATAS

**Análise de  
Polimorfismo de  
Fragmentos de  
Restrição Utilizando  
a Reação em Cadeia  
da Polimerase  
(PCR-RFLP)**

PROCI-2001.00165  
REG  
2001  
SP-2001.00165

## Introdução

A presença de variações nas seqüências de DNA que criam ou eliminam sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição resulta nos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Nos eucariotos superiores, esses polimorfismos foram originalmente descritos utilizando a técnica de *Southern Blot* seguida de hibridização com uma sonda para revelar apenas os fragmentos complementares. A técnica é discutida em maior detalhe no capítulo 2.

Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) novos procedimentos para a análise de RFLPs passaram a ser utilizados. A principal vantagem da análise de polimorfismos de restrição utilizando a PCR (PCR – RFLP), quando comparada à técnica original, é o fato de que apenas o segmento de DNA que abriga o sítio polimórfico de restrição é amplificado para posterior análise. Como resultado, após a clivagem com a enzima de restrição apropriada, um número limitado de fragmentos são obtidos, que podem ser facilmente discriminados de acordo com o tamanho.

## Protocolo de PCR – RFLP

O primeiro passo para a análise de PCR – RFLP é a amplificação do segmento do gene ou seqüência de

DNA, em que se encontra o sítio polimórfico de restrição. Para tanto, realiza-se a PCR utilizando *primers* complementares às seqüências que flanqueiam essa região. A seguir, é descrito um protocolo básico de PCR – RFLP.

### PCR

Os princípios teóricos da técnica de PCR foram descritos no capítulo 2. Nesta seção serão apresentadas apenas considerações práticas sobre a técnica.

Como a PCR é uma técnica capaz de detectar quantidades muito pequenas de DNA, todas as precauções devem ser tomadas para evitar a contaminação de uma amostra com DNA de outras. Além disso, como as seqüências alvo são copiadas de maneira exponencial, existe também o risco de contaminação das reações com produtos de reações de PCR anteriores. Para iniciar o preparo da reação, recomenda-se que a superfície de trabalho seja cuidadosamente limpa. Costuma-se dividir os estoques de reagentes específicos para PCR (solução de dNTPs, tampão, *primers*) em alíquotas, de modo a assegurar que, ocorrendo uma contaminação, apenas a fração em uso precise ser descartada. Antes de manipular as alíquotas de reagentes e de *primers* para preparar a reação, as amostras de DNA devem ser retiradas do freezer e colocadas em um local distante da bancada de trabalho. Em cada reação, coloca-se um controle negativo (branco) para monitorar possíveis

contaminações. Esse controle contém todos os reagentes necessários à reação menos o DNA molde, que é substituído por igual volume de água.

O uso de ponteiras com barreiras contra aerossóis é uma prática eficiente mas muito cara para trabalhos em larga escala. Em nosso laboratório sua utilização restringe-se à preparação de alíquotas de reagentes e estoques de *primers*.

### Protocolo básico de PCR:

- Descrever as amostras de DNA a serem amplificadas, reservando uma reação a mais para o controle negativo.
- Tirar o DNA do freezer.
- Limpar a bancada.
- Lavar as mãos e colocar luvas novas.
- Retirar do freezer o resfriador de bancada (*benchtop cooler*) e os reagentes (menos a *Taq DNA polimerase*).

• Identificar os tubos ou a placa que receberão a reação. No caso de placa, identificar em um mapa separado a amostra correspondente a cada cavidade da placa.

• Preparar uma mistura de reação (E-mix) contendo os componentes descritos na Tabela 1. Considerar sempre 2% a mais no volume final calculado para o número de amostras a serem analisadas. Se utilizar pipetador multicanal, aumentar a margem para 5%.

• Distribuir 20 µL do E-mix em cada tubo.

• Adicionar 100 a 200 ng de DNA, em um volume de 5 µL, ao respectivo tubo. No tubo de controle negativo (branco) colocar 5 µL de água.

• Colocar os tubos no equipamento termociclador, selecionando o programa desejado (Fig. 1).

Tabela 1. Composição do E-mix.

| Componentes                   | 1 amostra | 24 amostras + 2% | Concentração final        |
|-------------------------------|-----------|------------------|---------------------------|
| H <sub>2</sub> O Milli Q      | 15,40 µL  | 376,99 µL        | -                         |
| 10x PCR Buffer <sup>(1)</sup> | 2,50 µL   | 61,20 µL         | 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)     | 0,75 µL   | 18,36 µL         | 1,5 mM                    |
| dNTP (20 mM) <sup>(2)</sup>   | 0,25 µL   | 6,12 µL          | 200 µM                    |
| Primer up (20 µM)             | 0,50 µL   | 12,24 µL         | 0,40 µM                   |
| Primer down (20 µM)           | 0,50 µL   | 12,24 µL         | 0,40 µM                   |
| Taq (5 U/µL)                  | 0,10 µL   | 2,45 µL          | 0,02 U/µL                 |

<sup>(1)</sup> 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl.

<sup>(2)</sup> Mistura dos quatro desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), a 20 mM cada.

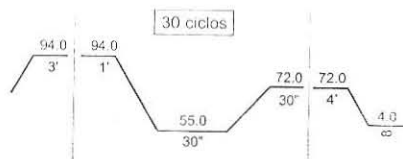


Fig. 1. Exemplo de programa.

Ao final do programa, o resultado da reação pode ser verificado aplicando 5  $\mu$ L de cada amostra em gel de agarose a 1%. A preparação do gel é detalhada no subtítulo eletroforese em gel de agarose.

#### Digestão do DNA com endonuclease de restrição

Endonucleases de restrição são enzimas que cortam a molécula de DNA de uma maneira dependente de sequência. As enzimas do tipo II, um subgrupo de endonucleases, reconhecem pequenas sequências de DNA, geralmente compostas de 4 a 6 nucleotídeos, e efetuam a clivagem na molécula dentro ou próximo dessa sequência de reconhecimento. Por exemplo, a enzima *Kpn*I corta a molécula de DNA na sequência:



A digestão ou clivagem do DNA com endonuclease de restrição é um procedimento básico em biologia molecular, com diversas aplicações. No caso específico do RFLP, permite a identificação de diferenças entre os indivíduos quanto ao número e posição dos sítios de restrição em uma determinada molécula de DNA.

A reação de clivagem depende de alguns parâmetros, entre os quais, a pureza do DNA a ser digerido. A presença de contaminantes como proteínas, fenol, clorofórmio, etanol, SDS (dodecil sulfato de sódio), EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético), além da alta concentração de sais, pode causar a inibição da atividade enzimática. A contaminação com DNases também pode ser crítica. Normalmente, o tampão de armazenamento do DNA contém EDTA, que complexa-se ao  $\text{Mg}^{2+}$ , inibindo a atividade das DNases. Essa atividade pode ser restabelecida quando o DNA é colocado na presença de tampão da endonuclease de restrição, resultando em degradação do mesmo.

Outros parâmetros a serem considerados são a temperatura ótima de reação, que pode variar de 37°C a 65°C, dependendo da enzima, e a composição do tampão de reação. Os tampões de reação contêm normalmente Tris HCl, cloreto de sódio ou de potássio, um antioxidante como o ditiotreitol (DTT) ou o 2-mercaptoetanol e um cátion divalente, normalmente o  $\text{Mg}^{2+}$ . Algumas enzimas são extremamente sensíveis à concentração de íons sódio ou potássio, enquanto outras retêm a atividade em uma ampla faixa de concentração desses íons. Os tampões adequados para cada enzima normalmente são fornecidos pelos fabricantes, junto com a enzima, mas é possível prepará-los no laboratório de acordo com a descrição encontrada no catálogo do fabricante. A observação das condições ideais para

reação de cada enzima é importante não apenas para a obtenção da máxima atividade mas também para garantir a especificidade da reação. Algumas enzimas podem apresentar atividade anômala (*star activity*), isto é, cortar a molécula de DNA em seqüências "semelhantes" ao sítio de restrição.

O tempo de reação depende da quantidade de enzima e de substrato. Em condições ideais, uma unidade de enzima digere um micrograma de DNA em 1 hora. Normalmente, o tempo de incubação varia de 30 minutos a 3 horas, sendo que algumas enzimas podem reter a atividade em tampão de reação após 4 a 5 horas.

A seguir, apresentamos o protocolo de rotina do Laboratório de Biotecnologia Animal do CPPSE para a digestão de produtos de PCR em análise de RFLP.

#### Digestão do produto de amplificação de $\kappa$ -caseína com a enzima de restrição *Hinf*I

- Descrever as amostras que serão tratadas.
- Identificar um tubo de 0,5 mL por amostra.
- Preparar uma mistura de reação, *Enzyme mixture* (E-mix) contendo os componentes a seguir. Considerar sempre 2% a mais no volume final calculado para o número de amostras a serem analisadas, como mostra o exemplo a seguir:

|                               | E-mix 1X                   | E-mix 24X + 2%                 |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Água Milli Q                  | 1,45 $\mu$ L               | 35,50 $\mu$ L                  |
| 10X React 2 <sup>™</sup>      | 1,30 $\mu$ L               | 31,82 $\mu$ L                  |
| <i>Hinf</i> I (5 U / $\mu$ L) | 0,25 $\mu$ L               | 6,12 $\mu$ L                   |
| <b>Total</b>                  | <b>3 <math>\mu</math>L</b> | <b>73,44 <math>\mu</math>L</b> |

<sup>™</sup>500 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl.

- Distribuir 3,0  $\mu$ L do E-mix em cada tubo de 0,5 mL.
- Adicionar 10  $\mu$ L de DNA amplificado, homogeneizando com a mistura de enzima do fundo do tubo. Caso haja formação de espuma ou gotículas na parede do tubo, centrifugue rapidamente (usar a opção *pulse* da microcentrifuga).
- Incubar a temperatura indicada para a enzima por 3 horas.
- Resolver os produtos de digestão por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (Fig.2).

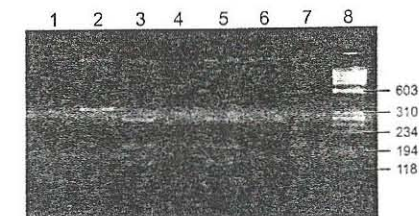


Fig. 2. Padrão de restrição do produto de amplificação de um segmento de 350 pb do gene da  $\kappa$ -caseína digerido com a enzima *Hinf*I. 1. Controle negativo da reação de PCR; 2. Produto de amplificação não digerido; 3 e 5. Produto da digestão de heterozigotos AB; 4 e 7. Produto da digestão de homozigotos AA; 6. Produto da digestão de homozigotos BB; e 8. Padrão de tamanho  $\phi$ X174RF-HaeIII. Os tamanhos dos fragmentos do padrão em pares de bases são indicados à direita.

## Eletroforese em gel de agarose

A separação de uma população de moléculas ou fragmentos de DNA é uma etapa geralmente presente nos procedimentos de biologia molecular. Entre os métodos disponíveis, a eletroforese tem sido o método mais utilizado, devido à sua simplicidade e flexibilidade, tanto para fracionamento analítico quanto para procedimentos preparativos.

Eletroforese é o termo utilizado para descrever o movimento de íons em solução como consequência da aplicação de um campo elétrico. Os primeiros processos de eletroforese eram realizados com os íons livres em solução, sendo posteriormente modificados pela introdução de um suporte inerte (papel, ágar, agarose, poliacrilamida, etc.). Nessas condições, a velocidade de migração é afetada pela força de filtração imposta pelos poros da matriz (suporte).

No caso específico dos ácidos nucleicos, essa migração ocorre em direção ao pólo positivo (cátodo), uma vez que o esqueleto de fosfato confere à essas moléculas carga elétrica negativa. A relação entre a carga e a massa molecular é constante, de forma que a velocidade de migração acaba sendo determinada pelo tamanho da molécula de ácido nucleico.

A eletroforese em agarose tem sido um dos métodos de eleição para a separação de fragmentos de DNA com tamanho entre 0,5 e 25 kb. As condições de separação devem

atender a alguns critérios, de modo a permitir a resolução adequada, entre eles, a concentração de agarose (Tabela 2). Outros fatores importantes são a corrente e a capacidade de tamponamento das soluções utilizadas. Neste capítulo apresentamos um protocolo básico para análise de produtos de PCR e fragmentos de restrição em gel de agarose.

**Tabela 2.** Limites de eficiência da separação de DNA em diferentes concentrações de agarose.

| Concentração de agarose no gel (%) | Separção 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                                | 3 – 0,2                                                  |
| 3 – 4 <sup>(1)</sup>               | 0,5 – 0,01                                               |

<sup>(1)</sup> Agarose de baixo ponto de fusão. Fonte: Adaptado de Ausubel et al. (1988).

### Preparo do gel de agarose:

- Pesar a quantidade de agarose necessária para a separação dos fragmentos de acordo com a Tabela 2.
- Adicionar a um frasco *erlenmeyer* contendo o volume necessário de tampão TBE 1 X. O volume deve ser calculado para obter um gel com 3 a 6 mm de espessura.
- Aquecer em forno de microondas até iniciar a ebulição (aproximadamente 20 seg. em potência alta para um gel de 30 mL). Retirar do forno de microondas e verificar se toda a agarose está

liquefeita. Caso sejam verificados grumos (percebe-se pela refração distinta do restante da solução), aquecer por alguns segundos adicionais. Deixar esfriar até atingir aproximadamente 50°C a 60°C.

- Adicionar a quantidade necessária de solução de brometo de etídio a 10 mg/mL para obter uma concentração final de 0,4 µg/mL de gel.

 O Brometo de etídio é um potente agente mutagênico. Utilizar luvas e máscara para preparar a solução e evitar o contato com os olhos.

- Verter a agarose sobre o molde, colocar o pente (um ou dois, dependendo da necessidade), deixar solidificar e montar o sistema na cuba de eletroforese, submergindo em tampão TBE 1X.

- Aplicar 5 µL de cada amostra amplificada previamente misturados a 1 µL de tampão da amostra (*loading buffer*). Se a amostra for produto de digestão, aplicar 10 µL de amostra e 2 µL de *loading buffer*. Incluir um padrão de peso molecular de modo a permitir a estimativa do tamanho das moléculas observadas nas amostras. Esses padrões são disponíveis comercialmente, mas também podem ser produzidos pela digestão, com uma ou mais enzimas de restrição, de plasmídeos bem caracterizados.

- Submeter o sistema a uma voltagem constante na faixa de 2 a

5 V/cm (considerando a distância entre os eletrodos).

- Visualizar os resultados sob luz ultravioleta a uma potência maior do que 2.500 µW/cm². Normalmente utiliza-se um transiluminador, mas uma lâmpada portátil (luz incidente) pode ser também utilizada. A documentação pode ser feita com filme polaróide 667 (ASA 30000) utilizando filtro laranja (Kodak Wratten #23A). O custo de cada fotografia polaróide é relativamente alto. A utilização de equipamentos digitais de fotodocumentação tem sido uma alternativa mais econômica, que permite o acoplamento a softwares de análise de imagens. Um exemplo de análise de RFLP em gel de agarose é apresentada na Fig. 2.

 A luz ultravioleta produz queimaduras severas. Utilize máscara e óculos de proteção adequados.

### Soluções

Tampão da amostra (Loading Buffer)  
6 X concentrado

|                  |            |
|------------------|------------|
| Bromophenol Blue | 0,25%      |
| Xileno Cianol    | 0,25%      |
| Glicerol         | 30,00% v/v |
| Armazenar a 4°C  |            |

TBE 10 X concentrado

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris         | 0,89 M |
| Ácido Bórico | 0,89 M |
| EDTA         | 0,02 M |

## **Referência bibliográfica**

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, John Wiley & Sons, Inc. 1988. 3v.