

Sara Marinho



Laboratório de BQ II
2010/2011



Nota introdutória

Esta sebenta é apenas uma compilação de todas as informações consideradas relevantes para a avaliação laboratorial de Bioquímica II. Assim, reúne informações da sebenta laboratorial fornecida pelas docentes, dos slides das aulas práticas, de outras sebentas pré-existentes, de fontes diversas na internet, de apontamentos retirados nas aulas práticas e laboratoriais e, pontualmente, do Lodish ou do Alberts.

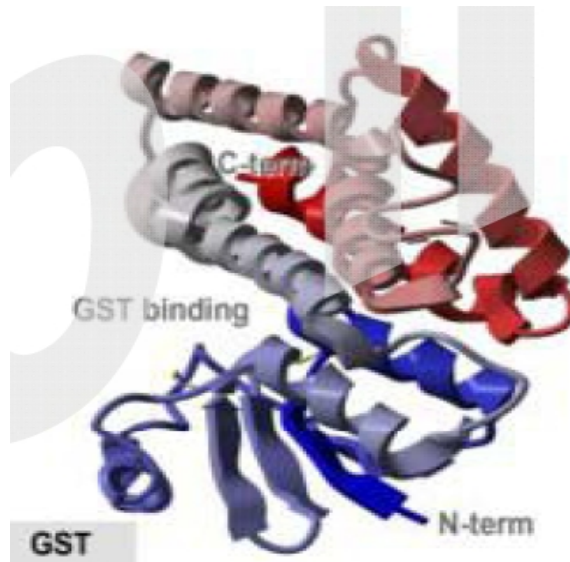
Índice

1. Tema unificador dos trabalhos
2. Isolamento de componentes celulares de um tecido animal
3. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford
4. Identificação de uma proteína animal
5. Ácidos nucleicos e DNA
6. Estudo da expressão de um gene animal

1. Tema unificador dos trabalhos

As GSTs

As glutathione-S-transferases (GSTs) são uma família multigénica de isoenzimas solúveis que participam nos mecanismos de defesa (do stress oxidativo) e de destoxificação celular. Estão largamente distribuídas no reino animal, encontrando-se num grande número de tecidos. Têm grande actualidade e interesse em Ciências Farmacêuticas, nomeadamente devido às suas funções na biotransformação, tanto de compostos endógenos, como de exógenos, incluindo muitos fármacos e respectivos metabolitos.



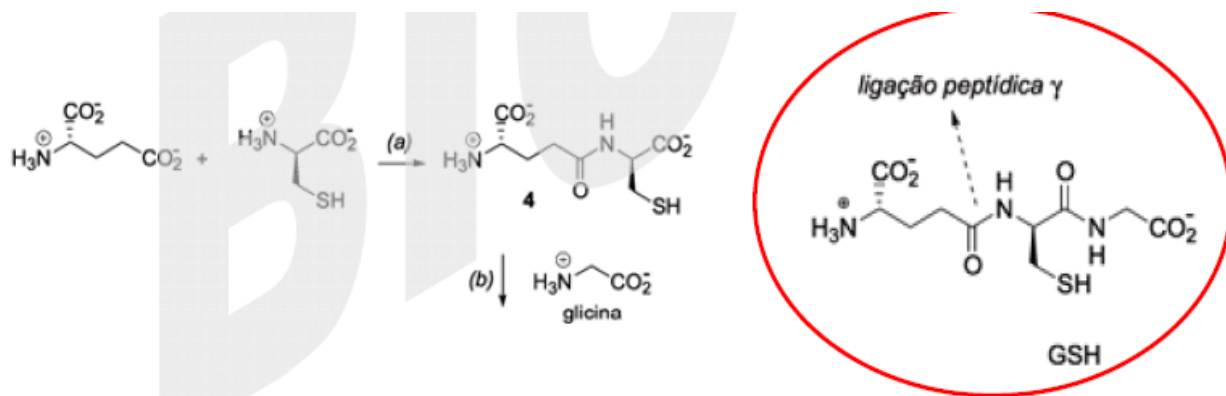
Características gerais, propriedades e distribuição

As enzimas GST têm um importante papel fisiológico, nomeadamente em processos de destoxificação e protecção do *stress* oxidativo, pelo que são mais abundantes em órgãos como o fígado ou o rim. De referir, ainda, que certos xenobióticos são activados toxicologicamente através das GSTs. As enzimas GST localizam-se, preferencialmente, no citoplasma da maior parte das células de mamíferos, contudo também estão presentes no retículo endoplasmático, no núcleo, nas membranas plasmáticas e nas mitocôndrias. No fígado, representam cerca de 5% do total de proteínas citosólicas. Cada tecido tem um grupo único de isoenzimas GST, sendo também a sua proporção relativa variável de tecido para tecido.

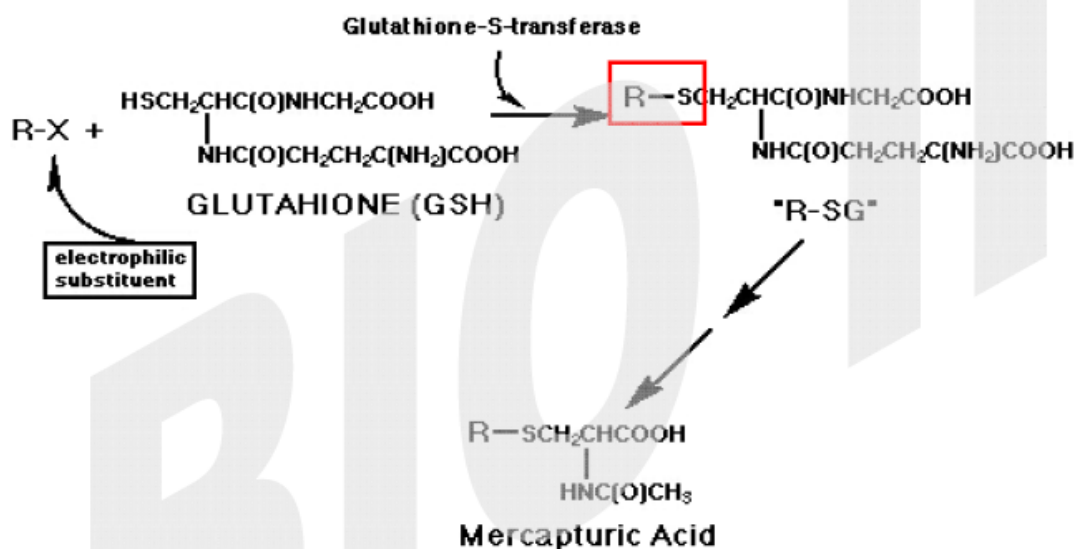
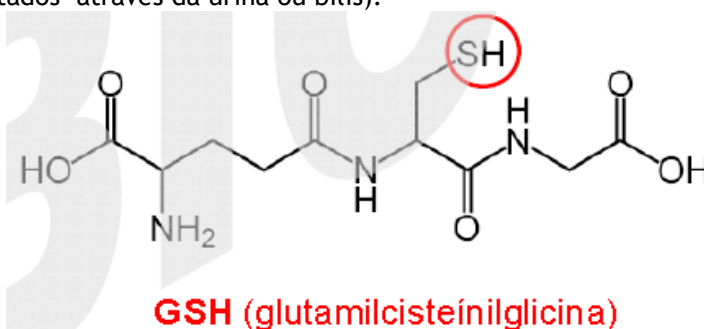
Entre as características atribuídas a estas enzimas salienta-se o facto de serem induzidas por agentes como o fenobarbital, bem como pelos anti-oxidantes fenólicos, hidrocarbonetos policíclicos e aditivos alimentares. A agressão de substâncias químicas carcinogénicas é igualmente responsável pelo aumento da sua actividade. Certos xenobióticos são activados pelas GSTs.

Vias metabólicas

Nas reacções em que as GSTs intervêm como enzimas na conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato, o átomo de enxofre da GSH é o dador de electrões para o ataque nucleofílico do 2º substrato, electrofílico. Ocorre, assim, a formação de tioésteres, que constituem o passo inicial da biossíntese do ácido mercaptúrico, via metabólica importante por ser um meio de eliminação de compostos potencialmente citotóxicos ou mutagénicos, bem como de compostos farmacologicamente activos. Assim, as GSTs são um dos componentes da designada fase II do sistema enzimático de destoxificação, sendo responsáveis pela conjugação, ou redução de compostos electrofílicos, com o tripéptido endógeno GSH (glutamilcisteinilglicina), na sua forma reduzida, evitando desta forma a formação de aductos com proteínas ou com o DNA e a produção de espécies reactivas de oxigénio. Os compostos glutathione conjugados são depois metabolizados por cisão dos resíduos glutamato e glicina, acetilação dos grupos amina livres no resíduo de cisteínil e formação do produto final, o ácido mercaptúrico. Este é, depois, excretado através da urina ou, mais frequentemente, através da bilis.

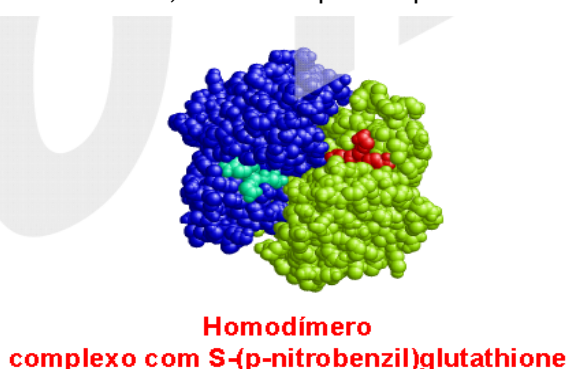
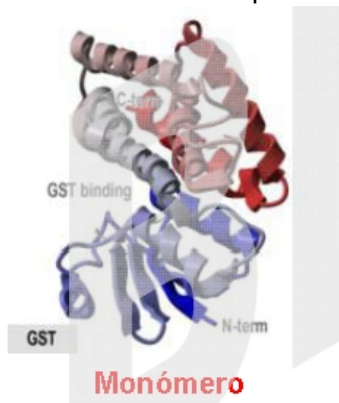


O S - da GSH é o dador de electrões para o ataque nucleofílico do 2.º substrato, electrofílico \rightarrow tioésteres. Estes, conjugados com glutathiona são metabolizados por cisão dos resíduos glutamato e glicina, acetilação dos grupos amina livres no resíduo de cisteínil e formação do produto final: derivados do ácido mercaptúrico (excretados através da urina ou bÍlis).

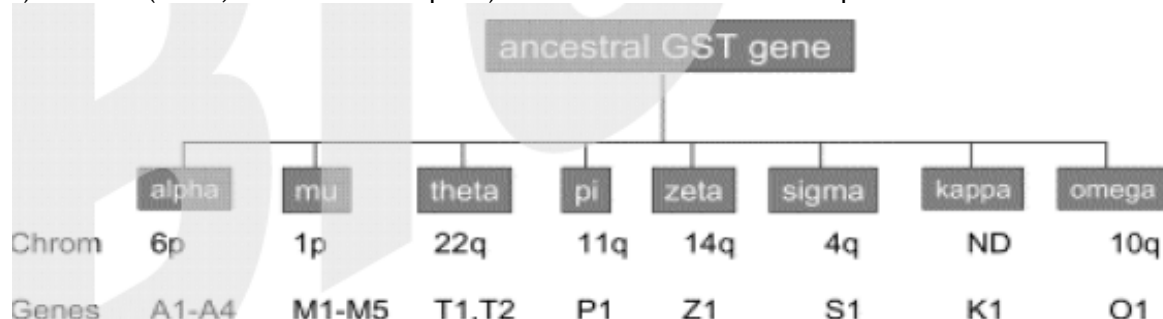


Estrutura e nomenclatura

Estruturalmente as GSTs são proteínas globulares diméricas, com uma massa molecular de 20 a 29 kDa por subunidade. São tipicamente homodímeros, embora se possam por vezes formar heterodímeros.



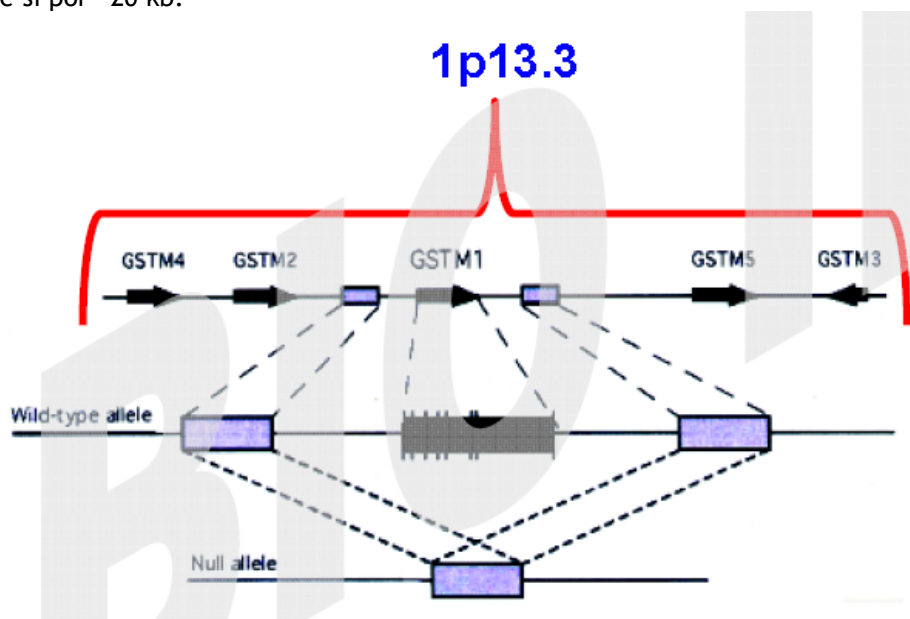
Com base na sequência de aminoácidos das GSTs foram identificadas nos mamíferos 8 classes diferentes denominadas GST Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Zeta, Kappa e Omega, cuja expressão é específica do tecido e da espécie. Dentro da mesma classe as GSTs partilham pelo menos 40% de homologia, enquanto que entre classes diferentes a homologia não ultrapassa os 30%. Às várias enzimas de cada classe é atribuído um número de acordo com a ordem cronológica da sua descoberta. Letras minúsculas são usadas como prefixo para designar o nome comum da espécie a que se refere a GST em questão. Os genes que codificam para as classes GSTM1 (mu, cromossoma 1p13.3), GSP1 (pi, cromossoma 11q13) e GSTT1 (theta, cromossoma 22q11.2) são conhecidos como sendo polimórficos.



Polimorfismo do gene *GSTM*

O polimorfismo genético dos sistemas enzimáticos pode condicionar diferentes respostas inter-individuais à toxicidade ambiental, assim como a compostos endógenos, podendo estar implicado na susceptibilidade a variadas doenças.

Cada classe de GST é codificada por um gene ou uma família de genes; os genes *H(b)* ou *B* codificam para a classe Mu de proteínas ou GSTM. Os 5 genes que compõem o *cluster* que comporta esta classe estão localizados na banda 1p13 do cromossoma 1 e estão dispostos dentro do *cluster* como 5'-M4-M2-M1-M5-3'-3'-M3-5'. O gene *GSTM3* está orientado com a sua extremidade 3' para a extremidade 3' do gene *GSTM5* (orientação "cauda-cauda"), enquanto os restantes genes se dispõem numa orientação "cauda-cabeça", espaçados entre si por ~20 kb.



Na designação do alelo a letra que o representa é separada da designação do *locus* por um asterisco. O alelo nulo é denotado com a letra O a seguir ao asterisco. O gene *GSTM1* (8 exões e 7 intrões) é polimórfico, tendo sido caracterizados três alelos: *GSTM*A*, *GSTM*B* e *GSTM*O*. A proximidade física dos *loci* do *GSTM1* e do *GSTM2*, com homologia de 99% de sequência de nucleótidos, sugere que o alelo nulo possa ter resultado de um *crossing-over* homólogo desigual entre duas regiões repetitivas de 4,2 kb adjacentes ao gene *GSTM1*, resultando numa deleção de uma região com 18 kb contendo todo o gene *GSTM1*, ou alternativamente na produção de um *cluster* contendo duas cópias do gene *GSTM1* que se traduz numa actividade enzimática ultra-rápida.

Significado fisiológico

Aproximadamente 50% da população europeia estudada é homozigótica para a deleção do gene *GSTM1*, sendo esta deleção associada a um aumento do risco de desenvolvimento de determinados tipos de cancro, principalmente quando conjugada com outros factores genéticos e ambientais. A elevada proporção da população portadora desta deleção, confirma, no entanto, não se tratarem de genes que comprometam a vida.

Por fim, de notar que a diferente distribuição das GSTs nos vários tecidos, bem como a variação da sua expressão inter-individual, poderá estar na origem de uma maior susceptibilidade por parte de certos órgãos ou mesmo indivíduos. Assim, não serão de estranhar diferenças de comportamento face à toxicidade exercida por alguns fármacos e por certas substâncias carcinogénicas.

2. Isolamento de componentes celulares de um tecido animal

Objectivo

Isolar mitocôndrias de tecidos animais (fígado de rato) por fraccionamento dos componentes celulares, após homogeneização dos tecidos.

Fraccionamento celular

Visa o isolamento dos diversos componentes da célula, permitindo o estudo da respectiva:

- Estrutura;
- Composição química;
- Função.

O isolamento dos organitos engloba duas operações:

- Homogeneização de tecidos;
- Fraccionamento dos componentes celulares.

Homogeneização

Existem 3 tipos de homogeneizadores:

- Homogeneizador de lâminas: utiliza-se para tecidos duros, por exemplo tecido muscular; apresenta a desvantagem de efectuar uma homogeneização relativamente violenta e indiscriminada, o que conduz muitas vezes à desintegração de uma parte dos organitos celulares; recorre-se à sua utilização quando se pretende dosear os componentes solúveis totais, como por exemplo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc.

- Homogeneizador de êmbolo: utiliza-se para tecidos moles e friáveis, tais como o fígado e o cérebro; a sua vantagem reside na boa preservação da estrutura e função dos organitos celulares;

- Homogeneizador de ultra-sons: utiliza-se para vários tipos de tecidos celulares, mas conduz a uma homogeneização rápida e bastante violenta.

No nosso caso, uma vez que pretendemos preservar as mitocôndrias, utilizamos o homogeneizador de êmbolo ou de Potter-Elvehjem. Este é indicado para tecidos moles e friáveis (ex. fígado, cérebro).

O tecido é cortado em pequenos pedaços e homogeneizado na presença de tampão. O meio de homogeneização utilizado na aula era composto por 0,25 M sacarose, 10 mM Hepes-NaOH pH 7,4 e 1 mM EDTA.

A vantagem da utilização deste tipo de homogeneizador é a boa preservação da estrutura e função dos organitos celulares.

As amostras devem ser mantidas em gelo.

No decorrer da homogeneização pode ser necessário fazer pequenas pausas para que o calor libertado pela acção mecânica não danifique a amostra.

Qualquer que seja o tipo de homogeneizador a utilizar, há sempre a considerar as condições de ensaio, como sejam o pH, a temperatura, a força iónica do meio de homogeneização e o tempo e velocidade de homogeneização.

O meio de homogeneização é uma solução salina isotónica e tamponada que rompe a membrana plasmática mas mantém a integridade dos organitos (pressão osmótica semelhante aos organitos).

- Sacarose - pode interferir com ensaios enzimáticos;
- Manitol ou Sorbitol;
- Agente quelante (EDTA ou EGTA): remover Ca^{2+} ou Mg^{2+} → inactivar proteases.

A homogeneização de tecidos origina uma suspensão que contém algumas células intactas, organitos



celulares, bem como fragmentos e partículas intracelulares, de tamanho e composição diferentes.

A variabilidade na composição - conteúdo em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos - determina que os vários organitos e partículas celulares tenham densidades diferentes.

Centrifugação

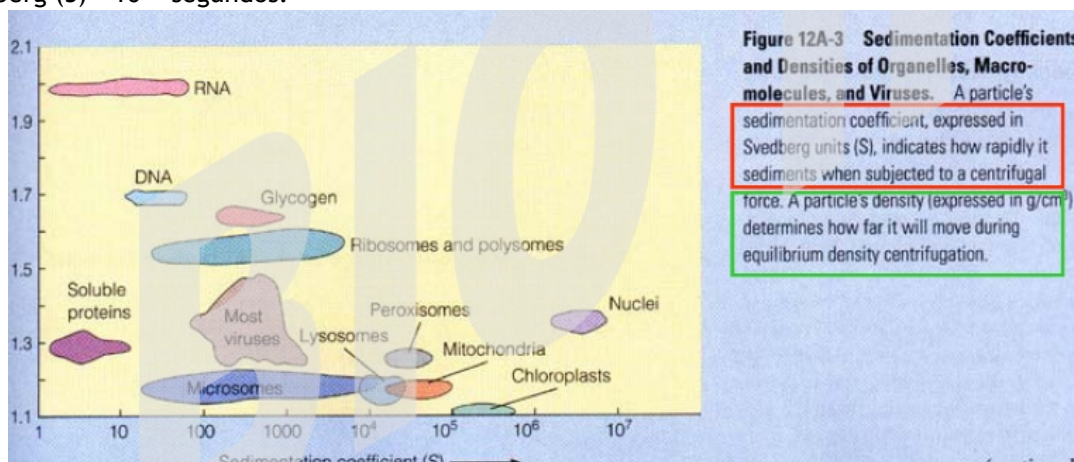
A centrifugação é a operação ideal para a separação dos vários organitos celulares, visto que a velocidade de sedimentação depende do tamanho (massa) e especialmente da densidade dos seus componentes. A velocidade de sedimentação depende da velocidade angular do rotor, do raio efectivo e das propriedades da partícula. As propriedades das partículas exprimem-se pelo coeficiente de sedimentação, o qual depende da massa, do volume e da forma da partícula. A centrifugação diferencial permite remover primeiro os componentes celulares mais pesados.

A força que actua numa partícula durante a centrifugação depende da massa da partícula, da velocidade angular do rotor e do raio do rotor da centrífuga (r).

A força aplicada exprime-se como um múltiplo da força da gravidade e denomina-se Força Centrífuga Relativa (g). A velocidade do rotor (velocidade de centrifugação) costuma exprimir-se em r.p.m.

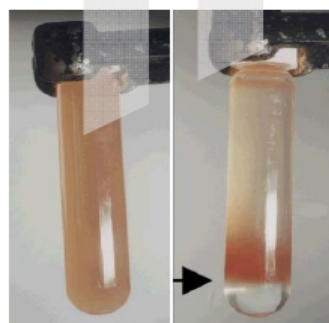
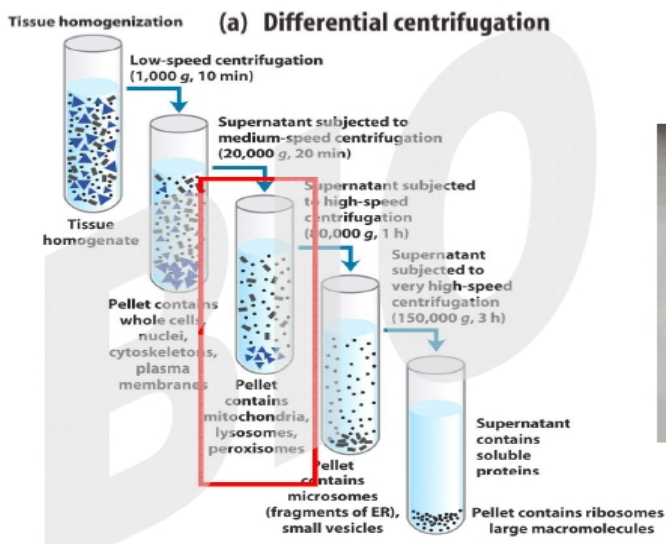
$$FCR = (1,118 \times 10^{-5}) (\text{rpm})^2 r$$

A velocidade de sedimentação das partículas depende essencialmente das suas propriedades (massa, volume e forma da partícula), as quais se exprimem pelo coeficiente de sedimentação, o qual representa a razão entre a velocidade de sedimentação e a força centrífuga relativa. Exprime-se em unidades Svedberg (S) - 10^{-13} segundos.



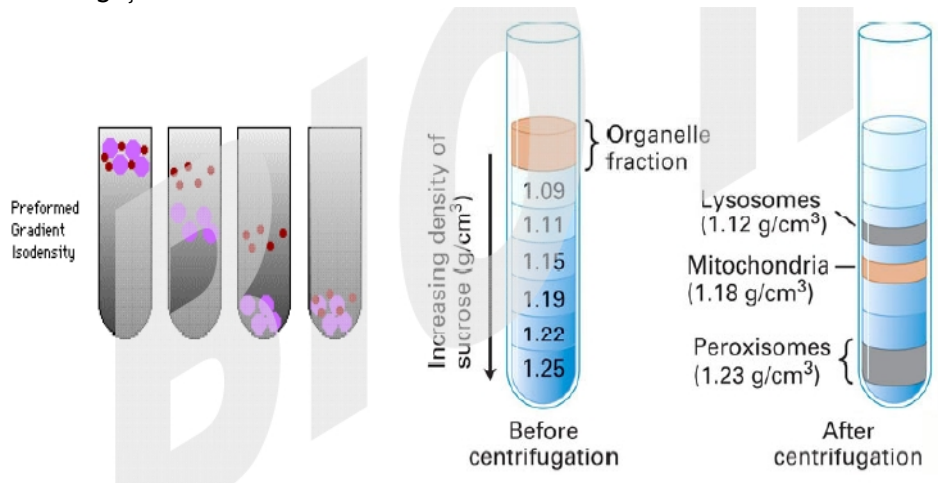
Tipos de centrifugação:

- Centrifugação diferencial (material suspenso num meio com viscosidade e densidade constantes);
- Centrifugações sucessivas → velocidades crescentes → tempos diferentes;
- Centrifugação em gradiente de densidade (material suspenso num soluto que forma um gradiente de densidade (solutos iónicos e não-iónicos));
- Técnica zonal: gradiente pré-formado (ideal para partículas de tamanho definido - proteínas, DNA, RNA);
- Técnica isopícnica (isodensidade): gradiente forma-se durante a centrifugação.



Centrifugação diferencial, o tipo de centrifugação utilizado na aula.

Centrifugação zonal:



Centrifugação em gradiente de densidade (vantagem em termos de pureza) - o material a ser fraccionado é suspenso num soluto que forma um gradiente de densidade; o gradiente deve satisfazer as seguintes propriedades:

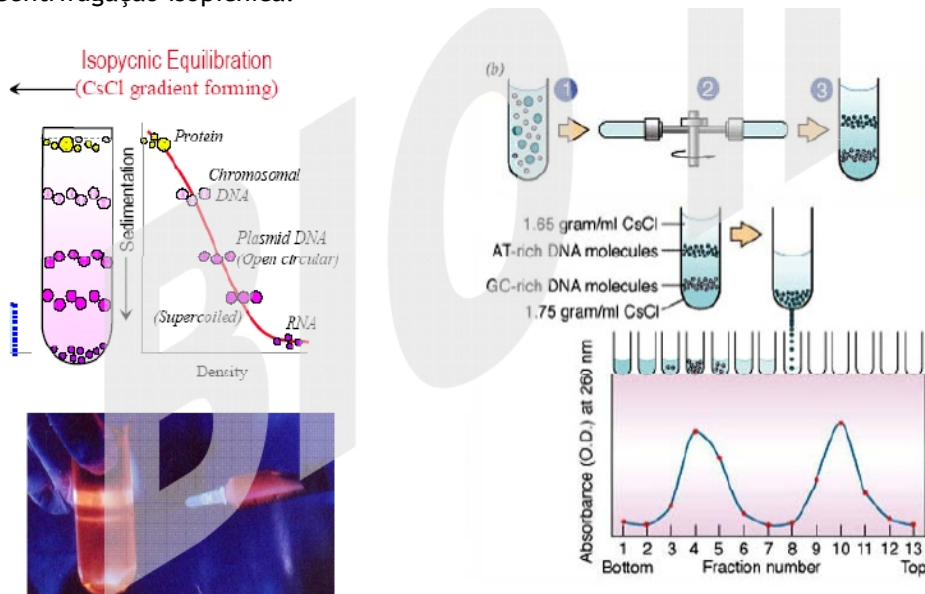
- Cobrir a zona de densidades necessária à separação pretendida;
- Não interferir com as espécies em separação, nem com a sua análise;
- Ser de fácil remoção;
- Não apresentar viscosidade elevada;
- Apresentar uma propriedade que permita a determinação da sua concentração;
- Ser formado por um soluto de pH suficientemente elevado para não penetrar nas membranas biológicas.

Preparação de gradientes:

- Auto-formação - consiste na preparação de uma mistura de amostra com uma solução uniforme do meio gradiente, seguida de centrifugação durante a qual se forma o gradiente (de equilíbrio ou isopícnico) utiliza-se com os sais de cério;
- Método de difusão - origina gradientes descontínuos (por ser um método manual); existem duas variantes: uma consiste na adição ao tubo de centrífuga de sucessivas camadas de concentração decrescente do soluto do gradiente, cada uma delas aplicada sobre a anterior, a outra consiste em aplicar camadas de densidade crescente;
- Sistemas misturadores - origina gradientes contínuos; os sistemas são constituídos por dois reservatórios de secção recta, os quais comunicam inferiormente, sendo provido de um agitador o reservatório de onde flui o gradiente já formado.

A análise de gradientes pode ser efectuada de modos diversos, de acordo com as moléculas a analisar. Assim, pode ser efectuada por UV (proteínas), pela visualização da cor laranja conferida pelo brometo de etídio (ácidos nucleicos) e ainda por métodos turbidimétricos.

Centrifugação isopícnica:



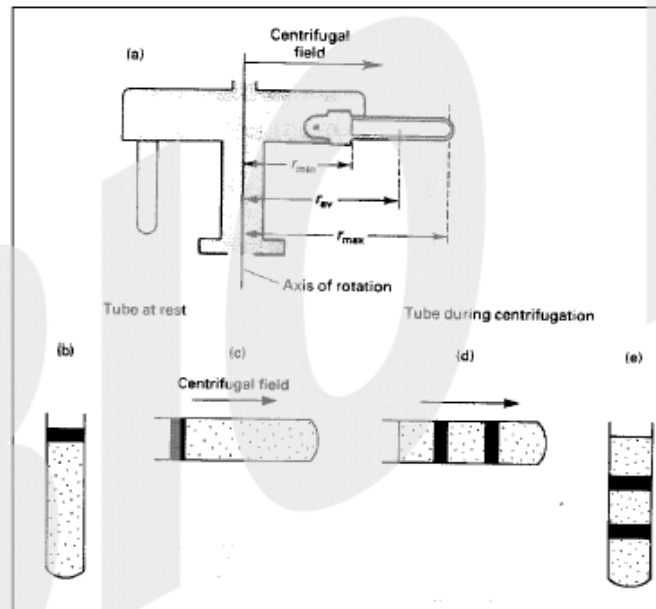
Tipos de centrífugas:

- Centrífugas de bancada: até 5000 rpm;
- Centrífugas de laboratório: de 5000 a 20000 rpm; controlo da temperatura;
- Ultracentrífugas: até 500000 rpm; controlo de temperatura e vácuo (para impedir o atrito).

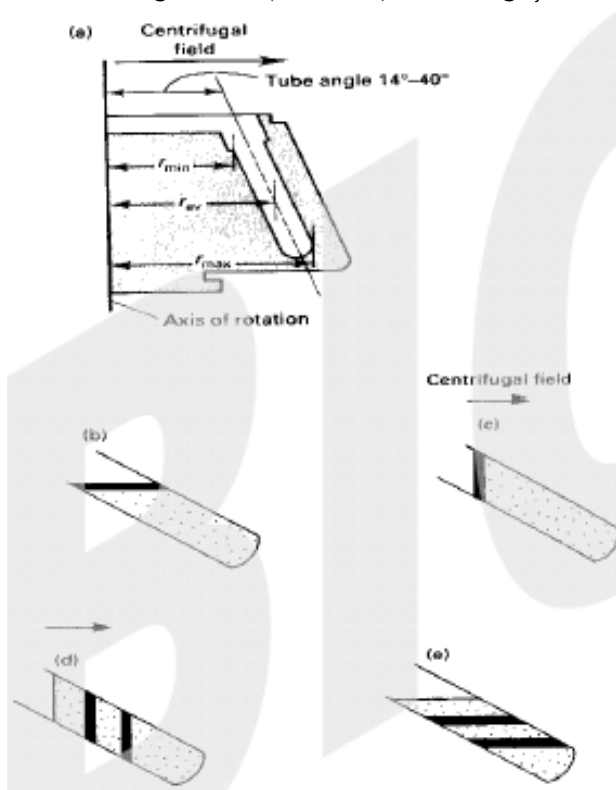
Tipos de rotores:

Os rotores são geralmente accionados por um motor eléctrico, embora haja centrífugas de turbina de ar, as quais permitem acelerações e desacelerações mais suaves (mais caras). Os rotores de baixa velocidade são construídos de liga de alumínio e os de elevada velocidade em titânio.

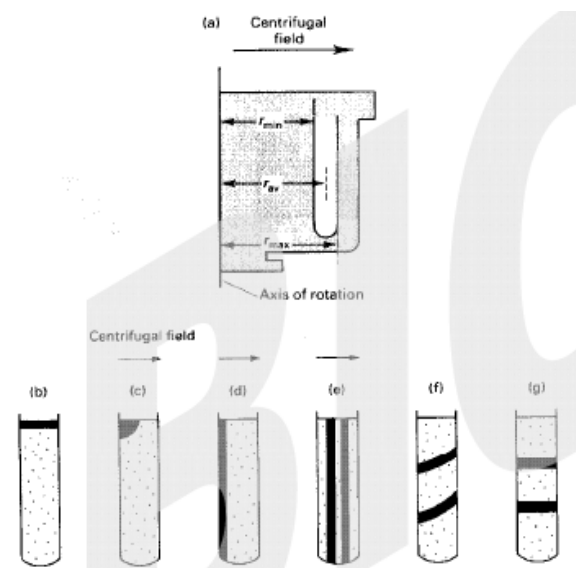
- Tubos oscilantes ou basculantes: centrifugação zonal e isopícnica;



- Tubos de ângulo fixo (10° a 40°): centrifugação diferencial;



- Tubos verticais (0°): centrifugação zonal e isopícnica.



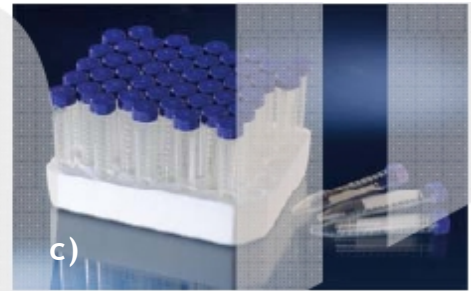
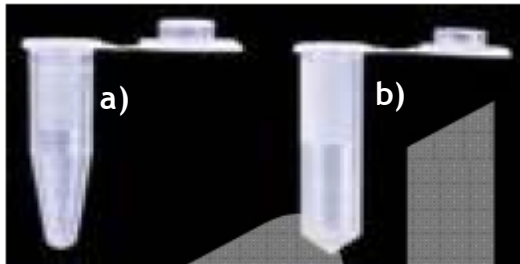
O filme protector anodizado dos rotores de alumínio é muito fino e não confere elevada protecção contra a corrosão, pelo que é necessário manusear com cuidado para evitar riscos. Também o uso de soluções ácidas, básicas e soluções salinas pode danificar o filme protector, corroendo-o e levando à falha do rotor.

É ainda necessário equilibrar as amostras para evitar danos no eixo da centrífuga, devido à vibração causada pelo rotor em desequilíbrio.

Nomograma: gráfico que relaciona escalas de velocidade de centrifugação em rpm, FCR (g) e raio (distância do eixo da centrífuga ao tubo - cm).

Contentores das amostras

- Eppendorfs: microtubos de 1,5 mL ou de 2,0 mL;
- Tubos de 15 mL.



a) Microtubo de 1,5 mL; b) Microtubo de 2,0 mL; c) Tubos de 15 mL.

Para avaliação do processo de fraccionamento celular faz-se a determinação de marcadores da integridade dos organitos, os quais são normalmente enzimas características de cada organito.

Análise do protocolo desenvolvido

Cortar o fígado em pequenos pedaços



Homogeneizar (homogeneizador de Potter) em gelo (-4°C) - 20 mL de meio para 2g de tecido



Guardar 200 μL homogen. total



Centrifugar 2 mL a 950, durante 10 min., a 4°C
(precipitar cels intactas, núcleos, citoesqueleto e membr. plasmáticas)



Remover o sobrenadante para um tubo de 1 mL



Centrifugar a 8500 g, durante 10 min., a 4°C
(além de outros organitos, fracção mitocondrial)



Rejeitar o sobrenadante e lavar o precipitado com 1 mL de meio de homogeneização



Homogeneizar por pipetagem



Centrifugar a 8500 g, durante 10 min., a 4°C



Rejeitar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 160 μL de meio de homogeneização



Homogeneizar por pipetagem

3. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Têm sido desenvolvidas diversas técnicas de quantificação de proteínas. Contudo, a maioria tem limitações, seja porque não são suficientemente sensíveis ou são baseadas em reacções com aminoácidos específicos existentes na proteína. Uma vez que o conteúdo em aminoácidos varia de proteína para proteína, nenhuma técnica é apropriada a todas as proteínas.

Espectrofotometria

Na análise de uma nova amostra determina-se primeiro o espectro de absorção da amostra. Este mostra como a absorção de luz depende do comprimento de onda da luz. O espectro é um gráfico de absorvência (A) vs. comprimento de onda (λ) e é caracterizado pelo comprimento de onda a que absorvência é maior ($\lambda_{\text{máx}}$).

O $\lambda_{\text{máx}}$ é muito importante, pois é característico de cada composto e dá-nos informação sobre a estrutura da substância em análise. De modo a obter uma sensibilidade mais elevada as medições analíticas são sempre efectuadas usando luz no $\lambda_{\text{máx}}$.

A absorvência (A) varia com a largura do percurso da luz (ℓ), ou seja a largura da célula onde está a amostra e a concentração da substância em análise (c).

Estes dois parâmetros podem ser combinados numa equação geral denominada por *Lei de Lambert-Beer*: $A = \epsilon \ell c$

ϵ = absortividade molar ou coeficiente de extinção molar (antigamente) - varia com o comprimento de onda utilizado na medição, traduz o máximo de absorção de uma substância a um determinado comprimento de onda, propriedade intrínseca de uma substância, expressa-se normalmente em $\text{mole}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$

ℓ = largura do percurso de luz, ou seja largura da amostra que a luz atravessa, representa-se normalmente pelo símbolo ℓ e expressa-se normalmente em cm

c = concentração da amostra analisada, representa-se por c e expressa-se normalmente em mole L^{-1} .

O espectrofotómetro permite medir e reportar/registar a absorvência em unidades quantificáveis.

Normalmente uma substância por si só não absorve luz, no entanto podemos utilizar um ou mais reagentes que produzem compostos corados em função da concentração da substância.

Quantificação de proteínas

As proteínas absorvem luz na região do ultravioleta com dois máximos de absorção 280 nm e 200 nm.

Os aminoácidos aromáticos são a principal razão para o pico de absorvência a 280 nm. As ligações peptídicas são as principais responsáveis pelo pico a 200 nm.

A estrutura secundária, terciária e quaternária afectam a absorvência e por isso factores como o pH, força iónica, etc. podem alterar o espectro de absorção.

O ϵ de cada proteína depende do seu conteúdo em resíduos de Trp, Tyr e Phe e pode ser prevista pela sequência de aminoácidos.

ENSAIOS DE ABSORVÊNCIA

Absorvência a 280 nm:

- Intervalo: 20 μg a 3 mg; Volume: depende da cuvete - 200 μL a 3 mL;
- Exactidão: razoável; Conveniência: excelente mas necessário UV;
- Interferentes: detergentes, ácidos nucleicos, partículas, gotas de lípidos, plástico, vidro - cuvets de quartzo.

Absorvência a 205 nm:

- Intervalo : 1 a 100 μg ; Volume: depende da cuvete - 200 μL a 3 mL;
- Exactidão: razoável; Conveniência: Muito bom;
- Interferentes: detergentes, ácidos nucleicos, partículas, gotas de lípidos, plástico, vidro - cuvets de quartzo.

Coeficiente de absortividade molar:

- Intervalo : 20 μg a 3 mg; Volume: depende da cuvete - 200 μL a 3 mL;
- Exactidão: ~2% (muito boa); Conveniência: Muito bom;
- Interferentes: detergentes, ácidos nucleicos, partículas, gotas de lípidos, plástico, vidro.

ENSAIOS COLORIMÉTRICOS

Método do Biureto

Intervalo : 1 a 10 mg; Volume: 800 µl a 3 mL; Exactidão: Boa; Conveniência: Boa; Interferentes: sais de amónio.

Método de Lowry

Intervalo: 2 a 100 µg; Volume: depende da cuvete - 800 µl a 3 mL; Exactidão: Boa; Conveniência: moroso (40-60 min); Interferentes: ácidos fortes, sulfato de amónio, EDTA.

Método do Ácido Bicínico

Intervalo : 0.2 a 50 µg; Volume: 1 mL; Exactidão: Boa; Conveniência: Boa; Interferentes: ácidos fortes, sulfato de amónio, EDTA, lípidos.

Método de Bradford

Intervalo : 1 a 20 µg (micro), 20 a 200 µg (macro); Volume: 1 mL(micro), 5.5 mL (macro); Exactidão: Boa; Conveniência: Excelente; Interferentes: detergentes.

PADRÕES E CURVA DE CALIBRAÇÃO

A medição da absorvência de luz por uma amostra não nos diz muito se não tivermos algo para comparar, ou seja, um padrão - albumina sérica bovina (BSA).

Curva de calibração:

- Prepara-se uma série 3-5 soluções padrão de concentração conhecida;
- Intervalo: baixa a elevada concentração □ concentração da nossa amostra deve estar incluída de modo a cumprir a Lei de Lambert-Beer;
- Fazemos o ensaio;
- Gráfico de Absorvência vs Concentração desses padrões e traçamos uma recta;
- A partir desta curva de calibração podemos ler a concentração da nossa amostra através da sua Absorvência (A).

Referência (Branco):

Para calibrar o espectrofotómetro é necessário uma cuvete referência - branco - que é idêntica em todos os aspectos aos padrões e amostras a analisar mas não contém a substância X que se quer quantificar. Com o feixe de luz bloqueado o espectrofotómetro será ajustado para ler absorvência infinita.

Com a cuvete de referência no feixe de luz o espectrofotómetro será ajustado para ler uma absorvência zero - “acertar o zero do aparelho”. Assim, a amostra contendo a substância X dará uma absorvência entre 0 e ∞.

Quantificação de proteínas - cuidados/considerações:

- Garantir que apenas a substância em análise é responsável pela absorção de luz no comprimento de onda de interesse - não deverão existir solutos que afectem a absorvência da amostra ou padrões;
- Condições de preparação dos padrões e amostras devem ser idênticas;
- Variação de volume em que se preparam os padrões e amostras inexactidão;
- Uso de igual volume para padrões e amostras simplifica o processo;
- Tempo de leitura após reacção, temperatura e outros factores físicos devem ser mantidos;
- Erros de pipetagem podem afectar o volume total e portanto o resultado obtido;
- A curva de calibração pode representar-se por absorvência *versus* quantidade de substância (massa) em vez de concentração - pode ser mais fácil trabalhar com quantidades enquanto se faz o ensaio especialmente quando é necessário fazer diluições -> necessário saber o volume de amostra usado no ensaio para determinar a concentração;
- Quantidades de substância abaixo de um determinado mínimo não vão ser detectadas;
- Uma quantidade/concentração acima de um determinado máximo vai saturar o ensaio e a Lei de Lambert-Beer deixa de se verificar, isto é, os aumentos na quantidade/concentração não afectam proporcionalmente a absorvência;
- Deve trabalhar-se dentro da zona linear do ensaio, isto é, quando a absorvência é directamente proporcional à concentração - padrões devem incluir a gama de concentrações do ensaio: optimização;
- Amostra muito concentrada - resultado “fora da curva” de calibração -> Diluição da amostra -> determinação da concentração a partir da curva de calibração necessário multiplicar o valor obtido pela factor de diluição (F) aplicado (diluir 1/10 então F = 10);
- Se não temos ideia da gama de concentrações da nossa amostra, preparação de várias diluições da amostra de modo que pelo menos uma delas caia dentro da gama de concentrações da curva de calibração, evitando assim repetir o ensaio.

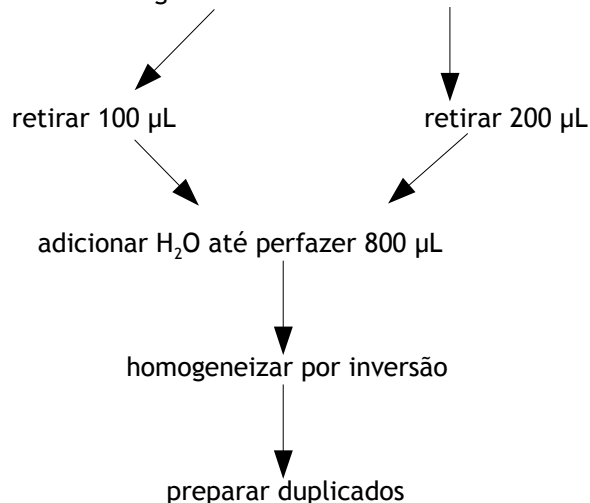
Método de Bradford

O método de Bradford baseia-se no facto de o comprimento de onda máximo do corante azul de Coomassie mudar de 465 nm para 595 nm quando ligado a proteínas.

A intensidade da cor é proporcional ao teor proteico da amostra. A sensibilidade é de 1 µg de proteína.

Análise do protocolo desenvolvido

Preparar 5 mL de uma diluição 1/500 da amostra de homogeneizado total e de extracto mitocondrial



Preparar 1 mL do padrão de albumina (originalmente a 10 mg/mL) e homogeneizar por inversão

Preparar os vários pontos da curva de calibração:

Tubo	Água destilada (µL)	Padrão de Albumina 1/100 (µL)	Proteína (µg/mL)
1 (branco)	800	0	0
2	790	10	
3	750	50	
4	700	100	
5	600	200	

→ agitar todos os tubos no vórtex

↓

adicionar a todos 200 µL de Bradford e homogeneizar por inversão

↓

Ler as absorvâncias a 595 nm (até 15 min. depois de adicionar o Bradford)

4. Identificação de uma proteína animal

A identificação de uma proteína baseia-se nas interações antígeno-anticorpo e a técnica denomina-se Western Blotting ou Immunoblotting.

Compreende uma série de procedimentos / técnicas:

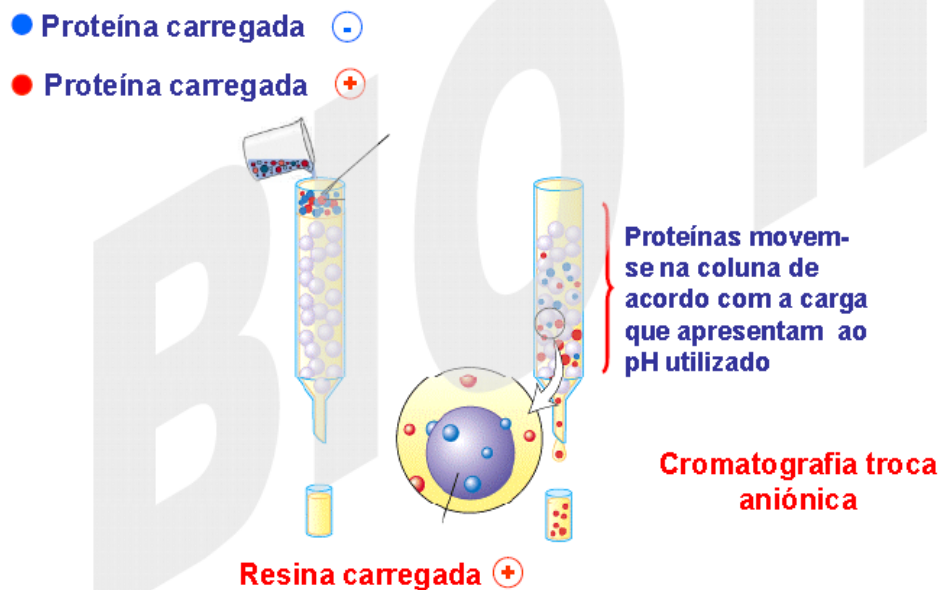
- Separação das proteínas por electroforese em gel de poliacrilamida/SDS;
- Transferência das proteínas para um suporte sólido (blotting);
- Hibridação com anticorpos específicos;
- Detecção dos imunocomplexos formados (quimioluminescência ou auto-radiografia).

A separação de proteínas pode efectuar-se com base nos seguintes parâmetros:

1. Propriedades ácido-básicas:
 - a) Cromatografia de troca-iónica;
 - b) Electroforese.
2. Diferenças de solubilidade:
 - a) Adição de ácidos;
 - b) Adição de iões.
3. Dimensões moleculares:
 - a) Ultracentrifugação;
 - b) Cromatografia de exclusão molecular ou gelfiltração.
4. Afinidade para outras moléculas (metais, anticorpos, etc.):
 - a) Cromatografia de afinidade

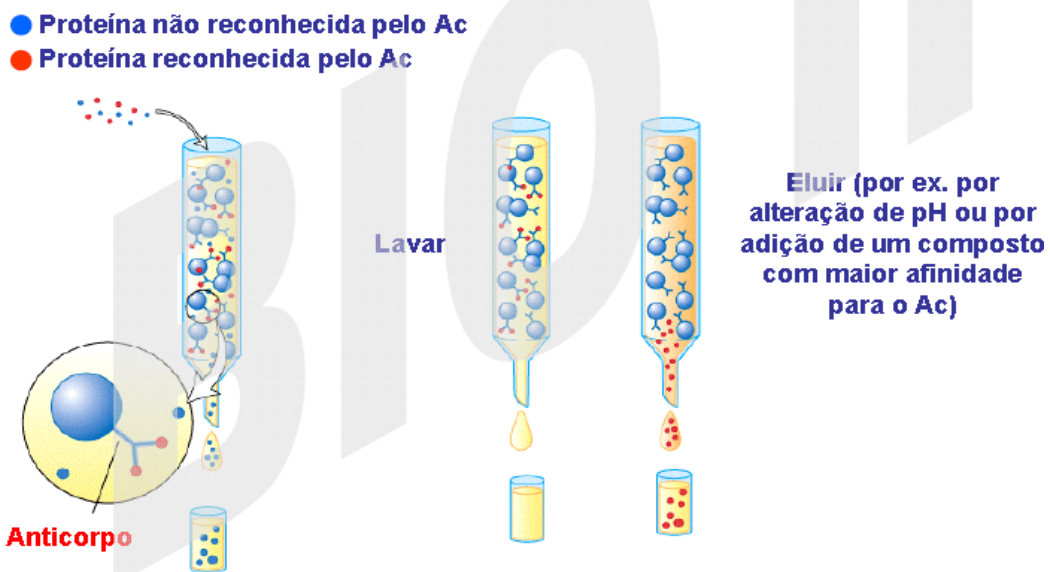
CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÓNICA

Necessário ionização da proteína/péptido



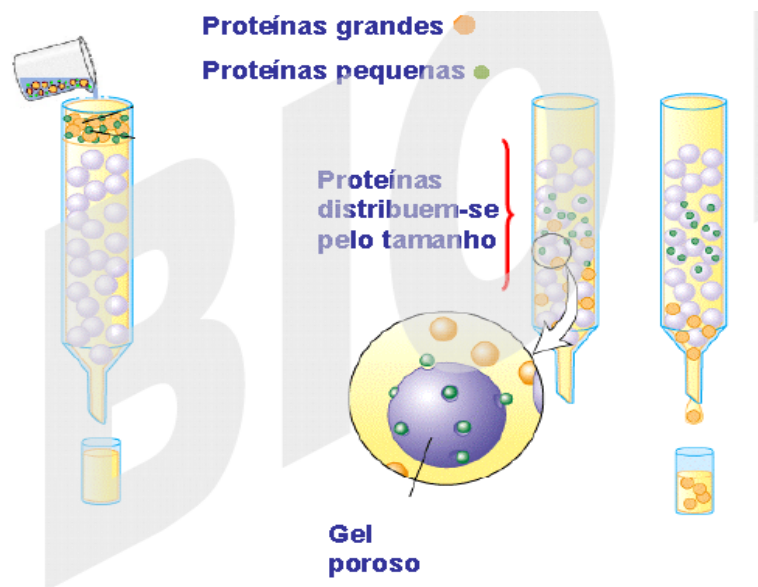
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Baseado em diferenças de tamanho entre as proteínas a separar.



CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Baseado na afinidade da proteína/péptido para a matriz que tem como ligando iões metálicos, anticorpos, etc...



Electroforese

Migração de uma partícula carregada sob a influência de um campo eléctrico.

Um grupo com carga eléctrica efectiva migra num campo eléctrico para o cátodo ou para o ânodo, dependendo da sua carga.

As proteínas apresentam carga a qualquer valor de pH diferente do seu ponto isoeléctrico -> migram quando sujeitas a uma diferença de potencial -> velocidade de migração depende da densidade de carga (razão carga / massa) da proteína; quanto maior for esta razão, maior será a velocidade de migração da molécula;

Migração de uma proteína num gel durante a electroforese: tamanho + forma.

Desde que um campo eléctrico seja removido antes que as moléculas da amostra cheguem aos eléctrodos, os componentes terão sido separados segundo a sua mobilidade electroforética. A electroforese é então uma forma incompleta de electrólise.

A migração da proteína é inversamente proporcional ao logaritmo da sua massa.

Equipamento

Fonte de energia - gera voltagem constante (< 4kV) ou corrente constante (< 200 mA)

✦ Unidade de electroforese



Sistemas de géis verticais



Sistemas de géis horizontais

Normalmente usadas para separar proteínas em géis de poliacrilamida

Aplicação da amostra

A amostra é depositada em cada poço e a voltagem aplicada. A fonte de energia estabelece uma

diferença de potencial entre os eléctrodos da unidade de electroforese, originando uma corrente eléctrica

Matrizes

Tipo I - papel, acetato de celulose, sílica gel, celulose:

- Materiais inertes que servem essencialmente de suporte;
- Separação das proteínas processa-se através da densidade de carga a determinado pH;
- Actualmente pouco usados (excepto acetato de celulose);

Tipo II - agarose, amido e poliacrilamida:

- Gel - primeiro usado foi o gel de amido;
- Meios porosos □ dimensão do poro é da mesma ordem de grandeza das moléculas proteicas □ separação baseia-se na densidade de carga e no tamanho molecular -> influenciam a velocidade de migração;

- Poros do gel de agarose → suficientemente grandes → separação baseia-se na densidade de carga;
- Poros dos géis de amido e de poliacrilamida → mesma ordem de grandeza das moléculas proteicas □ interferem na migração.

Poliacrilamida: polímero sintético do monómero acrilamida.

Pode ser preparada a partir de reagentes altamente purificados de forma reprodutível.

Separação de proteínas por electroforese em gel de poliacrilamida.

Vantagens:

- Boa resolução (vasta gama de tamanho de poros; para proteínas e ácidos nucleicos de tamanho pequeno a moderado (até aproximadamente 1×10^6 Daltons) - separação é baseada no crivo molecular e mobilidade electroforética;

- Transparência;
- Estabilidade (física da matriz sob uma vasta gama de valores de pH, temperatura e força iónica);
- Inércia química (interacção mínima entre as moléculas migrantes e a matriz);
- Dimensão de poros muito variável;
- Grande reprodutibilidade;
- Efeito electroendosmótico desprezável;
- Aplicável à escala macro e micro.

Inconvenientes - toxicidade:

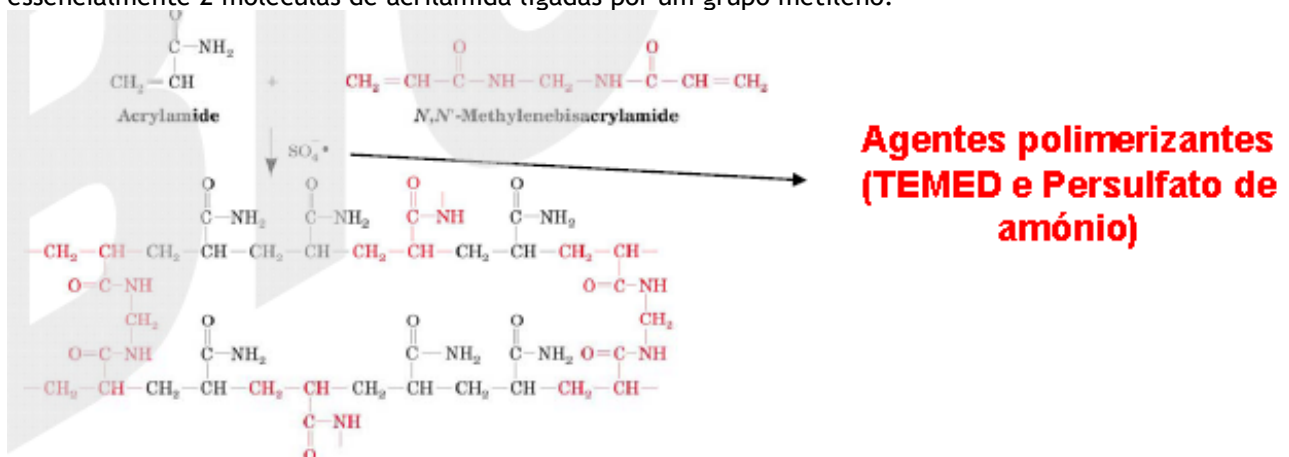
- Acrilamida - neurotóxico; uma solução a 1% pode causar irritações cutâneas e mesmo distúrbios do SNC; suspeita de ser cancerígena;

- Catalisadores e iniciadores - N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina, N,N'-metilenobisacrilamida e persulfato de amónio também necessitam de cuidado especial no seu manuseamento pois são tóxicos.

PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)

Polimerização de monómeros de acrilamida → formação de longas cadeias que se interligam formando uma rede □ catálise por radicais livres □ iniciada pela adição de persulfato de amónio e de uma base N, N, N', N'- tetrametiletenodiamina (TEMED).

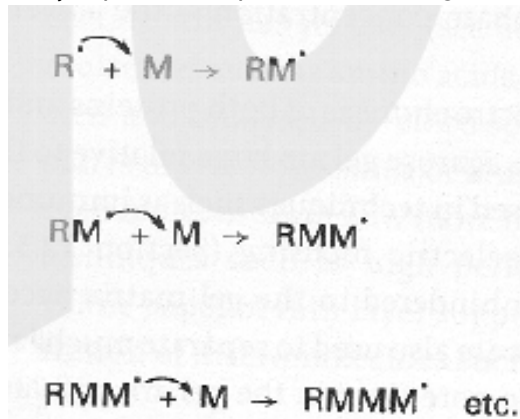
Bisacrilamida (N, N'- metilenobisacrilamida) o monómero de ligação - bisacrilamida é essencialmente 2 moléculas de acrilamida ligadas por um grupo metileno.



No sistema persulfato de amónio - TEMED este último catalisa a decomposição do ião persulfato para originar um radical livre que por sua vez, inicia a polimerização.



Se o radical livre for representado por $R\cdot$ e M for um monómero de acrilamida, então a polimerização pode ser representada da seguinte forma:



O oxigénio inibe a polimerização, de modo que as misturas de gel são normalmente desgaseificadas antes de utilizadas (e é também por isso que se cobre com isopropanol).

Sistemas de tampão dissociadores - géis desnaturantes

A maioria dos estudos de proteínas baseados em PAGE usam sistemas dissociadores.

As técnicas electroforéticas comuns não se aplicam à medição de massas moleculares: mobilidade influenciada pela carga e pelo tamanho. Se as proteínas forem tratadas para terem uniformidade de carga → mobilidade electroforética → tamanho.

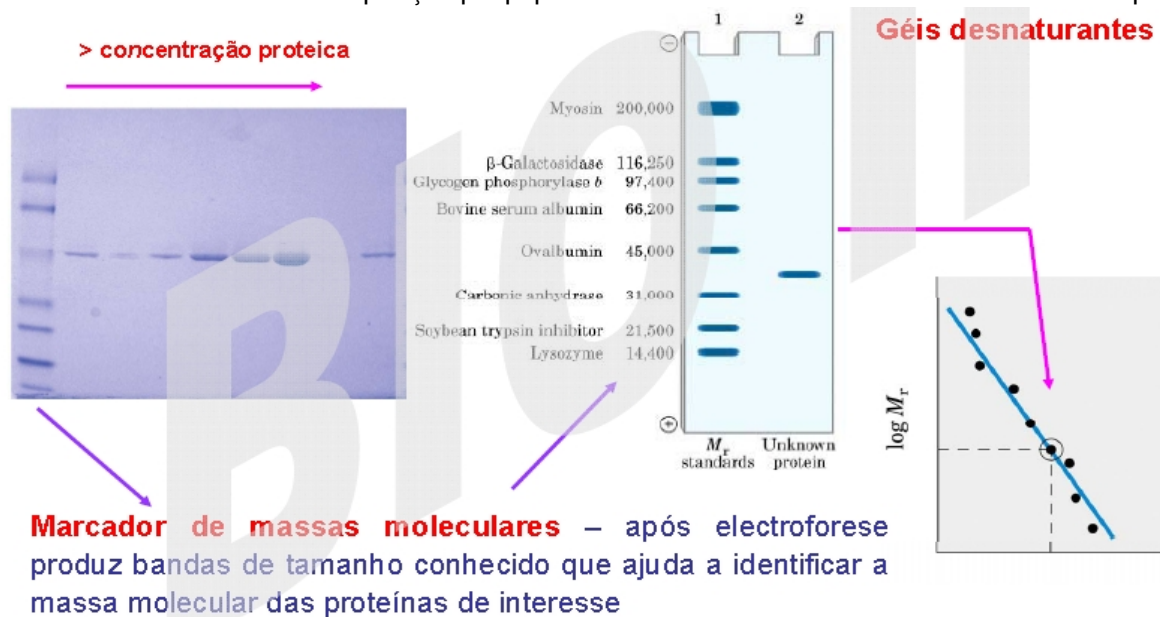
PAGE + sistema tampão que dissocia as proteínas nas suas sub-unidades polipeptídicas: agente dissociador mais comum detergente iónico (aniónico) SDS (dodecil sulfato de sódio $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{-Na}^+]$) - SDS - PAGE

A mistura proteica é desnaturada por aquecimento a 100°C durante alguns minutos na presença de um excesso de SDS e de um tiol (β -mercaptoetanol) o qual reduz as pontes dissulfureto presentes e que mantêm a estrutura proteica terciária.

O SDS rompe a estrutura secundária, terciária e quaternária → proteínas desnaturadas → estrutura em forma de disco com uma série de moléculas SDS carregadas negativamente ao longo da cadeia polipeptídica (1 molécula de SDS : 2 resíduos Aas).

As cargas intrínsecas das proteínas são insignificantes quando comparadas com as cargas negativas fornecidas pelo SDS, de modo que os complexos SDS - polipéptido ficam com cargas idênticas e migrarão estritamente de acordo com o tamanho do polipéptido - carga negativa.

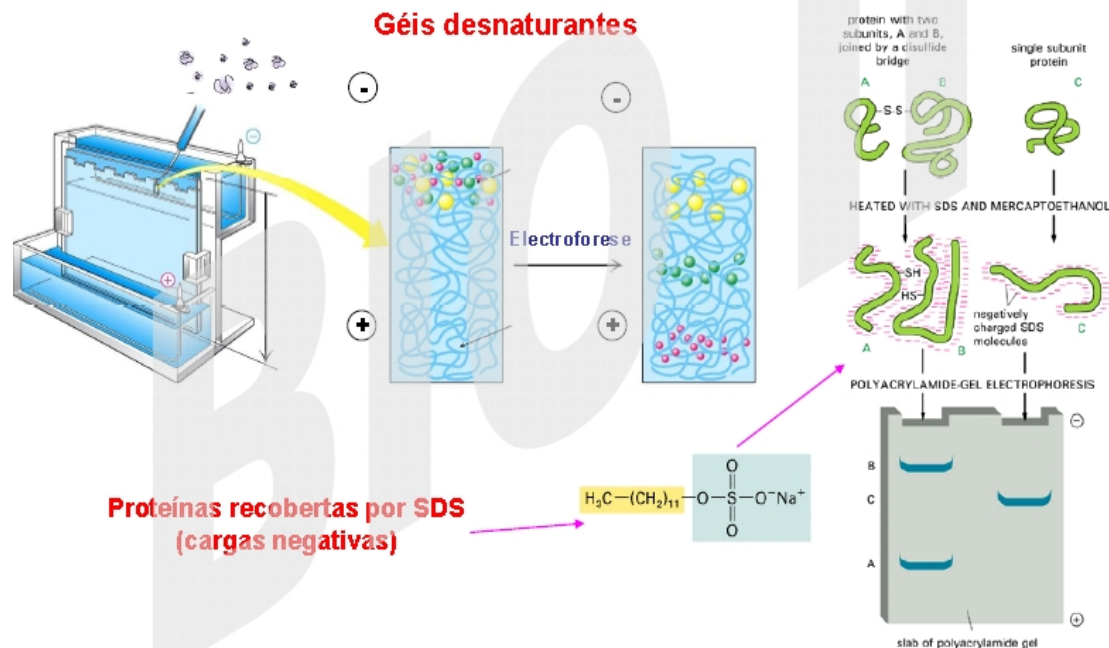
Permite determinar a composição polipeptídica da amostra e massa molecular relativa de proteínas



Sistemas tampão não-dissociadores - Géis nativos

Quando se pretende preservar a interação entre as sub-unidades, a conformação nativa da

proteína, bem como a sua actividade biológica.



Separação de proteínas por electroforese em gel de poliacrilamida

SISTEMAS DE TAMPÃO CONTÍNUOS

Os mesmos iões no tampão da amostra, gel e reservatórios, pH constante. A amostra é depositada directamente no gel de resolução (separação).

SISTEMAS DE TAMPÃO DESCONTÍNUOS (multifásicos)

Iões diferentes no gel, reservatórios, pH descontínuo. A amostra é depositada num gel de concentração, de poro largo (baixa concentração de acrilamida; 4% acrilamida) - proteínas movem-se livremente sob um campo eléctrico.

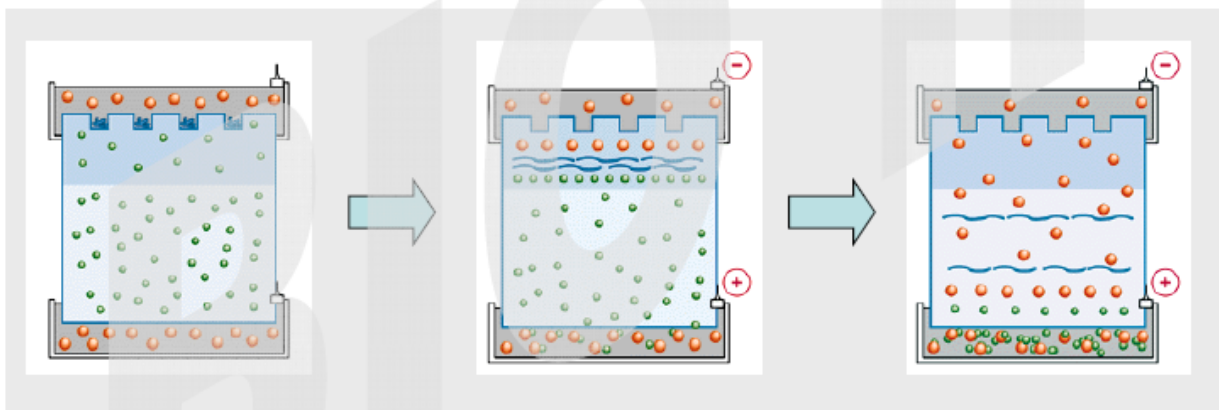
O gel de concentração colocado sobre o gel de resolução, de poro fino (elevada concentração de acrilamida > 7% - 15% acrilamida).

Vantagem: aplicação de grandes volumes de amostra sem perda de resolução.

Escolha da concentração de acrilamida -> factor crítico para a separação óptima dos componentes de uma mistura proteica por electroforese. A concentração do monómero de ligação/bisacrilamida é importante: à medida que esta concentração aumenta, a dimensão do poro diminui, atingindo um mínimo quando a bisacrilamida representa 5% da mistura acrilamida/bisacrilamida.

Sistemas de tampão descontínuos (Laemli)

Gel de concentração: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (gel de baixa concentração)



Gel de resolução: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (gel de alta concentração)

Tampão de corrida: Tris-Glicina, pH 8.8

Preparação da amostra

Quantidade de amostra → sobrecarga conduz à distorção das bandas no gel; quantidade insuficiente impedirá a detecção de componentes presentes em pequena concentração.

Quantificação de proteínas antes da electroforese para a obtenção de bons resultados → aplicar no gel ~1 - 10 µg de cada polipéptido □ 50 - 100 µg de uma mistura complexa.

Tampão da amostra também contém:

- Sacarose ou glicerol - agente que confere densidade - quando aplicada no gel, a amostra permanece numa camada bem definida no fundo do poço e não se mistura com o tampão de migração;
- Azul de bromofenol - corante ionizável - molécula pequena, não retardada, indica linha de frente da electroforese, permite monitorizar a corrida electroforética;
- Ditiotretitol ou β-mercaptoetanol - composto tiólico - rompe as pontes dissulfureto entre os polipéptidos.

Antes da aplicação das amostras no gel → desnaturação a 100°C

Análise dos Géis: Coloração das proteínas

Coloração - Azul Brilhante de Coomassie (solução a 1% de corante) numa mistura de metanol : água : ácido acético glacial - desnaturante para precipitar ou fixar as proteínas no gel, o que evita que as proteínas sejam retiradas do gel enquanto este está ser corado.

Muito sensível - banda fracamente corada → ~ 0,1 µg proteína.

Diferenciação - lavagem com solução diferenciadora - metanol:água:ácido acético glacial - remove o corante não ligado às proteínas que ficam visíveis como bandas azuis num fundo transparente

Com o objectivo de arquivar resultados pode proceder-se à fotografia dos géis ou à sua secagem.

Apesar da coloração de Coomassie ser muito sensível, muitas vezes é necessário maior sensibilidade e por isso é usada uma coloração com nitrato de prata. Os iões prata (Ag⁺) são reduzidos a prata metálica na proteína, onde a prata se deposita para originar uma banda preta ou castanha.

As colorações de prata podem ser usadas imediatamente após a electroforese (A) , ou alternativamente A após coloração com azul de Coomassie (B) - bandas maiores do gel podem ser identificadas com o Coomassie e as bandas menores, não detectadas pelo Coomassie, podem ser resolvidas utilizando coloração de prata.

A coloração de prata é 100x mais sensível do que o azul brilhante de Coomassie: ~ 0.1 ng.

Análise dos Géis: Quantificação

A quantificação das proteínas é em regra geral efectuada por densitometria. Existem vários densitómetros que funcionam passando o gel corado através de um feixe de luz (laser) e medindo a luz transmitida. Apresentação gráfica das zonas das proteínas (picos de absorvência) contra a distância de migração, e as áreas dos picos calculadas para obter dados quantitativos - semi-quantitativo:

- Gama limitada de concentrações de proteína às quais é possível uma relação linear entre absorvência e concentração;
- Quantidades iguais de proteínas diferentes não coram sempre da mesma maneira com um dado corante;
- Método alternativo/mais barato - cortar as bandas obtidas, eluir o corante em 50% piridina - espectrofotometria a 605 nm.

Análise do protocolo desenvolvido

Montar os moldes para a electroforese



Preparar cerca de 10 mL de gel de separação a 12% (para 2 géis):

	Gel a 12%
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	3,6 mL
Tampão do gel de separação	3,2 mL
Água destilada	3,4 mL
APS a 10%*	125,0 µL
TEMED*	12,5 µL

*Adicionar o APS e o TEMED só no final, para iniciar a polimerização



Misturar bem e pipetar para o sistema de electroforese até à altura de 5 cm



Nivelar o gel pipetando 1 mL de isopropanol



Aguardar que o gel polimerize antes de retirar o isopropanol



Preparar cerca de 5 mL de gel de concentração a 4% (para 2 géis):

	Gel a 4%
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	500 μ L
Tampão do gel de concentração	1,25 mL
Água destilada	3,845 mL
APS a 10%*	50 μ L
TEMED*	10 μ L

*Adicionar o APS e o TEMED só no final, para iniciar a polimerização



Misturar bem e pipetar o gel para o sistema de electroforese



Colocar o pente em posição para formar os poços e aguardar que o gel polimerize



Retirar o pente e encher os reservatórios superior e inferior com tampão de corrida

Preparar as amostras:

Pipetar para microtubos 100 μ g de proteína do extracto mitocondrial e do homogeneizado total



Adicionar tampão TE até 16 μ L e juntar 4 μ L de tampão das amostras a cada tubo



Homogeneizar cuidadosamente, evitando fazer bolhas e manter no gelo



Pipetar 5 μ L de marcador de massas moleculares para um microtubo e adicionar igual volume do tampão das amostras



Aquecer as amostras a 95 °C, 5 min. e colocar em gelo durante 5 min. (esta fase do gelo só é determinante para ácidos nucleicos, pois impede a renaturação; como a desnaturação das proteínas é irreversível, não é imprescindível para proteínas).



Centrifugar e voltar a pôr no gelo

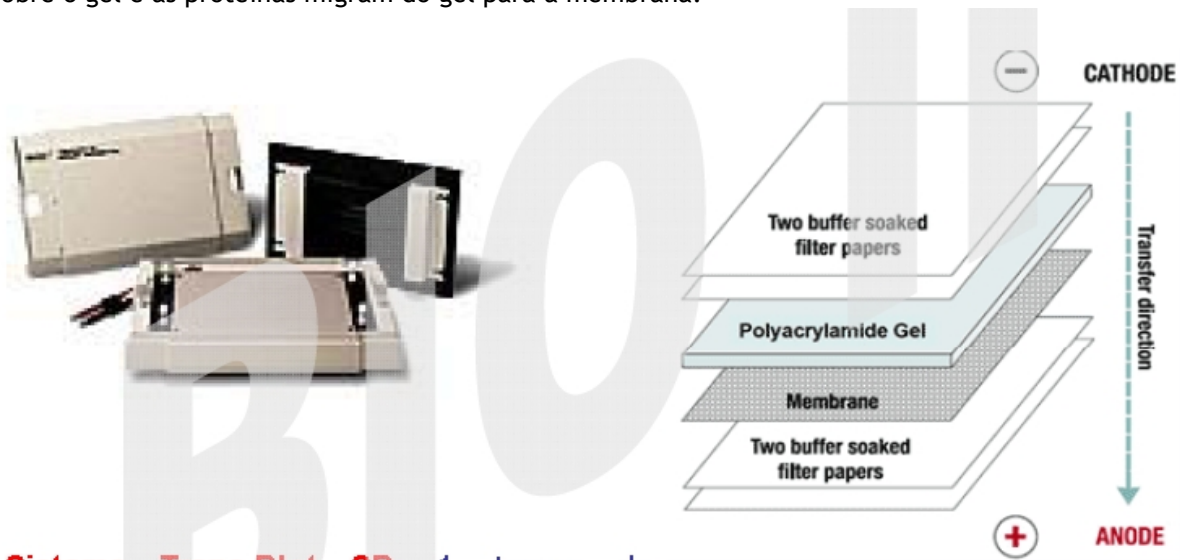


Aplicar e iniciar a corrida a 140 V (para 2 géis)

Transferência de proteínas para membrana

Após separação das proteínas por SDS-PAGE, transferência e imobilização de proteínas para membranas (PVDF ou nitrocelulose). Aplica-se o princípio da electroforese: corrente eléctrica é aplicada

90° sobre o gel e as proteínas migram do gel para a membrana.

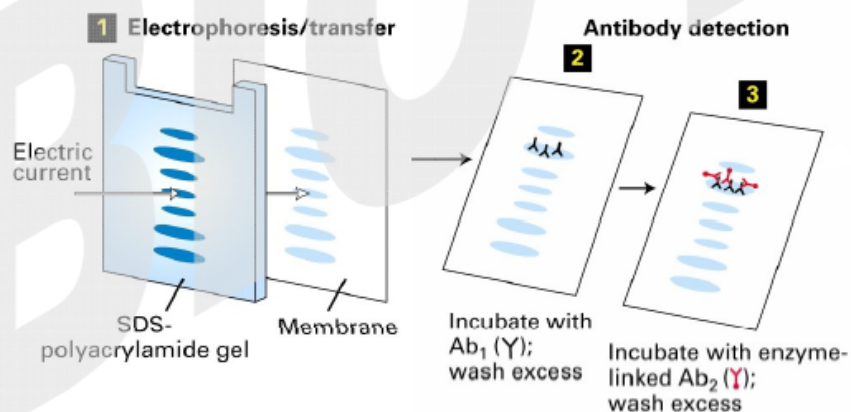


Sistema Trans-Blot SD: 1. tampa de segurança; 2. Cátodo; 3. Papel de filtro; 4. Gel; 5. Membrana; 6. Papel de filtro; 7. Ânodo; 8. Cabos de corrente; 9. Base.

As proteínas são transferidas, pela aplicação de um campo eléctrico, para uma membrana de nitrocelulose, que retém as moléculas proteicas, constituindo uma réplica do posicionamento das proteínas no gel.

Western-blot

Imunodeteção da proteína alvo (numa mistura de proteínas) através do uso de anticorpos monoclonais ou policlonais (2)



1. "Blocagem" da membrana antes da aplicação do anticorpo

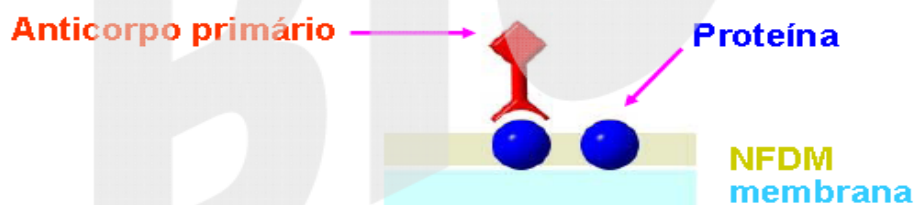
Objectivo: reduzir interacções não-específicas entre a membrana e o anticorpo;

Procedimento: incubação da membrana após transferência numa solução de albumina sérica bovina (BSA) ou uma solução de leite magro em pó (NFDM).

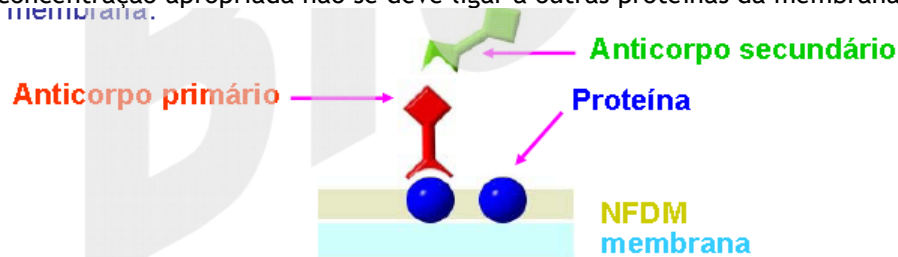
2. Anticorpo primário

▫ Anticorpo específico da proteína de interesse;

▫ Incubação da membrana após "blocagem" com o anticorpo diluído num tampão com BSA ou leite magro e algum detergente;

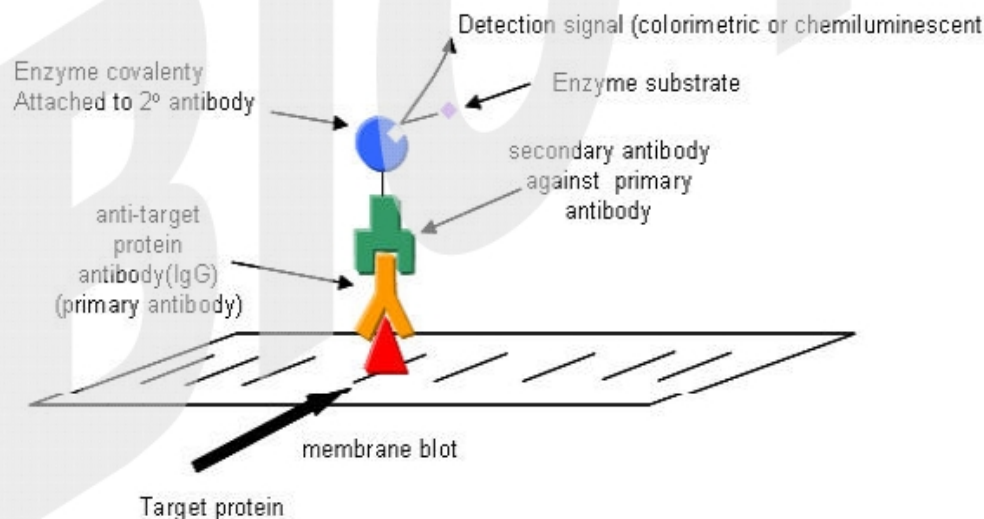


- Em concentração apropriada não se deve ligar a outras proteínas da membrana.
- Após lavagem da membrana para remover anticorpo primário não ligado à proteína incuba-se a membrana com um anticorpo secundário;
- Liga-se ao anticorpo primário;
- Encontra-se ligado a biotina ou a uma enzima *reporter* - fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano - que permite a identificação visual do complexo proteína - Ac 1° - Ac 2° por emissão de fluorescência - ou apresenta-se marcado radioativamente;
- Em concentração apropriada não se deve ligar a outras proteínas da membrana.

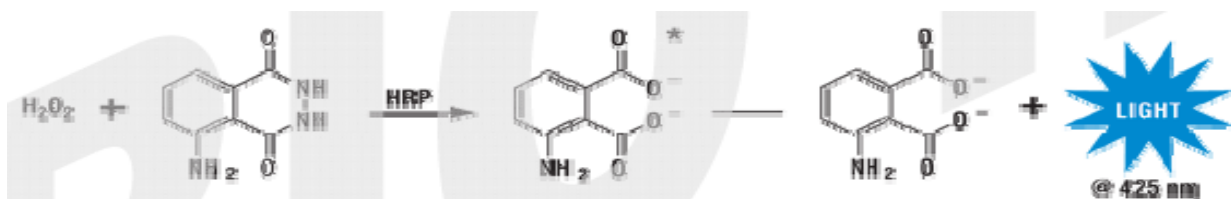


4. Revelação

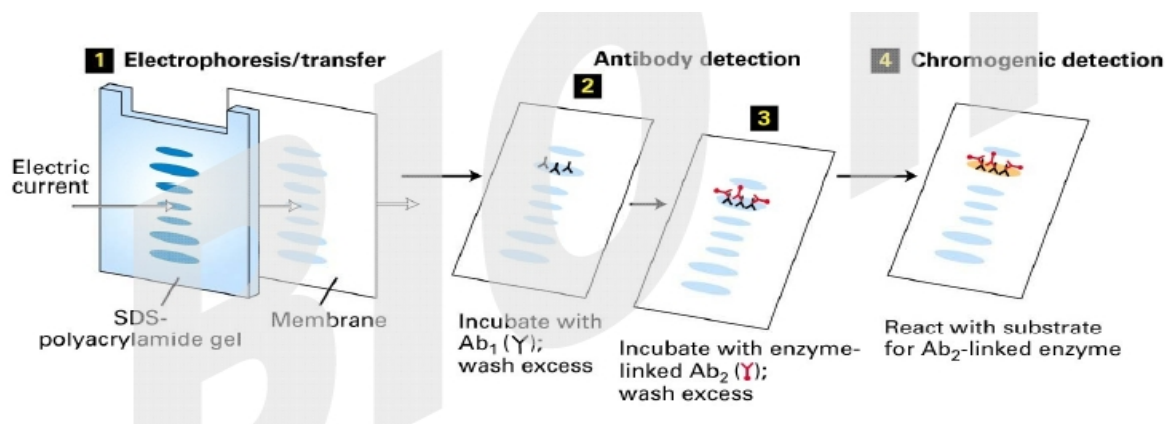
- Lavagem da membrana para remover anticorpo secundário e incubação com o substrato enzimático de modo a que as posições da membrana onde se encontra anticorpo secundário emitem luz;

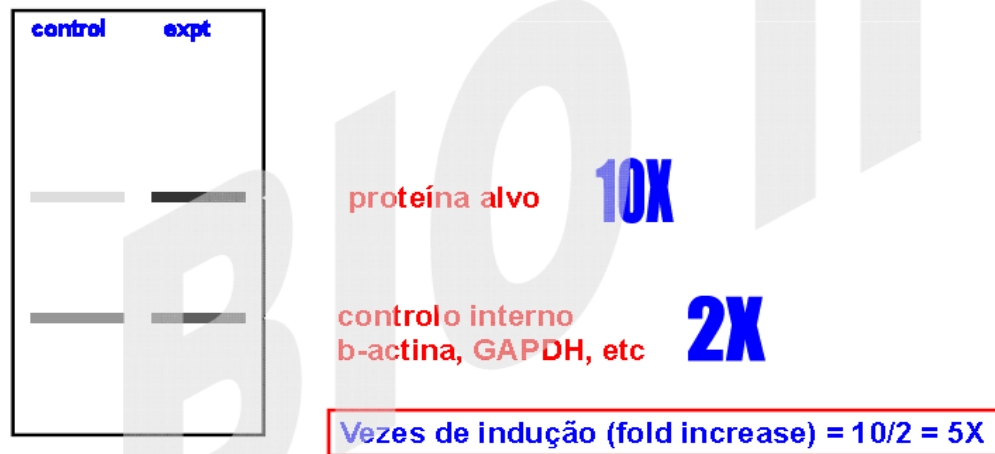


- Com o Ac marcado com peroxidase de rábano utiliza-se um agente quimioluminiscente (luminol; ECL - enhanced chemiluminescence) - o produto da reacção produz luminiscência proporcional à concentração da proteína;
- Incubação com substrato enzimático feita em contacto um filme fotográfico que depois é revelado;



- As bandas correspondentes à proteína de interesse aparecerão como regiões escuras num filme fotográfico - por comparação da densidade das diferentes bandas podemos inferir da abundância da proteína de interesse em diferentes amostras.





Análise do protocolo desenvolvido

Preparar cerca de 100 mL de tampão de transferência 1x, por cada dois géis.



Cortar o papel de filtro e a membrana de nitrocelulose à medida do gel.



Hidratar previamente o papel de filtro e a membrana na solução de transferência 1x, durante cerca de 15 min, tendo o cuidado de mergulhar lentamente a membrana para não formar bolhas.



Montar a *sandwich* na seguinte ordem:
 1 folha de papel de filtro - tirar bolhas
 Membrana - tirar bolhas
 Gel - tirar bolhas
 1 folha de papel de filtro - tirar bolhas



Colocar a tampa no sistema de transferência.



Proceder à electrotransferência durante 15-30 min a 10-15 V.



Uma vez terminada a transferência, desmontar o sistema e guardar o gel para coloração em solução de azul brilhante de Coomassie.



Lavar a membrana com água destilada. Adicionar à membrana peróxido de hidrogénio a 15% e agitar durante 15 min.



Bloquear a membrana com leite magro a 5% em tampão TBS, durante pelo menos 3 h à temperatura ambiente.



Incubar com os anticorpos e revelar em câmara escura

Notas:

- Não colocar o sistema em água. Lavar apenas com esguicho e secar com papel.
- Não ultrapassar os 25 V.
- Não transferir por mais de duas horas.
- Não ajustar o pH do tampão.

5. Ácidos nucleicos e DNA

Ácidos Nucleicos: cadeias de nucleótidos ligados por ligações fosfodiéster.

Oligonucleótidos: cadeias de ácidos nucleicos com < 50 nucleótidos.

Polinucleótidos: cadeias de ácidos nucleicos com > 50 nucleótidos.

Direccionalidade das ligações fosfodiéster (5'-3') significa que oligo- e polinucleótidos têm extremidades estruturalmente diferentes.

DNA

- 2 cadeias polinucleotídicas;
- Cada cadeia tem um grupo OH livre;
- Cadeias antiparalelas - polaridade inversa das 2 cadeias;
- Sequências das bases - distingue um DNA (ou RNA) de outro;
- Convenção - escrever a sequência de ácidos nucleicos começando na extremidade 5' da molécula, usando letras únicas maiúsculas que representam cada uma das bases. Ex: CGGATCT;
- Não é preciso incluir os grupos fosfato ou açúcares □ idênticos ao longo da molécula de DNA (ou RNA);
- Os grupos fosfato terminais podem, se necessário, ser indicados usando a letra p Ex: 5' -pCGGATCT-3' = fosfato presente na extremidade 5' da molécula.

DNA nativo

Cadeias polinucleotídicas unidas por pontes de H entre uma base púrica e uma base pirimídica; arranjadas em dupla hélice; bases estão no centro da molécula; esqueleto açúcar-fosfato na parte exterior.

Propriedades químicas

Conferidas pelas bases azotadas:

- Resistência à oxidação;
- Efeito mutagénico pelo ácido nitroso (C-U; A-Hipoxantina);
- Reacção com:
 - Agentes alquilantes;
 - Formaldeído (com adenina e citosina de DNA desnaturado);
 - Glioxal;
 - Hidrazina;
 - Hidroxilamina.

Conferidas pela pentose:

- Oxidação;
- Reacção com ácidos fortes concentrados;
- Ribose + furfural → ruptura das ligações β-N-glicosídicas;
- Reacções colorimétricas: ribose + furfural; desoxirribose + difenilamina.

Conferidas pelo grupo fosfato:

- Acidez das soluções;
- Formação de complexos com catiões (Mg^{2+} e Mn^{2+}) e com proteínas básicas (histonas e protaminas).

Propriedades físicas

- Solubilidade/carga;
- Nucleobases, nucleósidos e nucleótidos → solúveis em água numa ampla gama de valores de pH;
- Devido à natureza hidrofílica dos açúcares, os nucleósidos são mais solúveis do que as correspondentes bases;
- pH biológico (pH 5-9) → nucleósidos são neutros;
- Nucleótidos com di- e trifosfatos transportam múltiplas cargas negativas - a presença de grupos fosfato carregados nos nucleótidos fornece sítios para interacções electrostáticas com sítios carregados positivamente de proteínas e iões metálicos.

Estabilidade

Nucleósidos e nucleótidos → estáveis em soluções aquosas numa vasta gama de valores de pH

Semi-vida para a hidrólise das ligações fosfodiéster no DNA → ~ 200 milhões de anos → elevada estabilidade → DNA o mais apropriado para armazenamento a longo termo da informação genética.

RNA → muito mais propenso a hidrólise: o grupo 2'-OH fornece um nucleófilo interno para esterificação da ligação 3', 5'-fosfodiéster.

A grande labilidade do RNA relativamente à hidrólise torna-o menos apropriado para material genético do que o DNA.

Elevada massa molecular.

Absorção de luz no ultra-violeta;

Moléculas que contêm bases purinas e pirimidinas absorvem fortemente luz UV → as purinas, nucleósidos e nucleótidos com purinas → coeficientes de extensão molares mais elevados que os derivados pirimidínicos.

O comprimento de onda no qual ocorre máxima absorvência é normalmente perto de 260 nm

Densidade

Função linear da percentagem de pares $G \equiv C$, visto serem mais densos do que os pares $A = T$.

Viscosidade

Associada ao grande comprimento das moléculas e à relativa rigidez da dupla hélice

Extracção de ácidos nucleicos

O DNA encontra-se associado a proteínas básicas (histonas) e não básicas (DNA polimerases, RNA polimerases, topoisomerases...).

Para isolar o DNA teremos que proceder à destruição das membranas celular e nuclear, por tratamento com agentes desnaturantes (SDS) e com proteases (proteínase K), que promovem também a dissociação do complexo DNA-proteína. O DNA é separado das outras moléculas por extracção com uma mistura de fenol/clorofórmio e finalmente precipitado por acção do etanol (ou isopropanol).

No decorrer da técnica podem ocorrer condições que promovam alterações estruturais do DNA:

- Corte de ligações fosfodiéster: DNAses, $pH < 2$, $T > 90^\circ C$;
- Corte de ligações B-N-glicosídicas: $pH < 2$;
- Destruição de ligações de hidrogénio: $pH > 10$; $pH < 3$; $T > 80^\circ C$, redução da força iónica do meio;
- Cisão da dupla hélice: agitação mecânica.

Desnaturação da molécula de DNA

As duas cadeias anti-paralelas de DNA - mantidas unidas apenas pelas forças fracas das pontes de hidrogénio entre bases complementares, e parcialmente por interacções hidrofóbicas entre pares de bases empilhadas adjacentes.

É necessária pouca energia para separar alguns pares de bases → alguns pedaços pequenos de DNA □ conformação em cadeia simples.

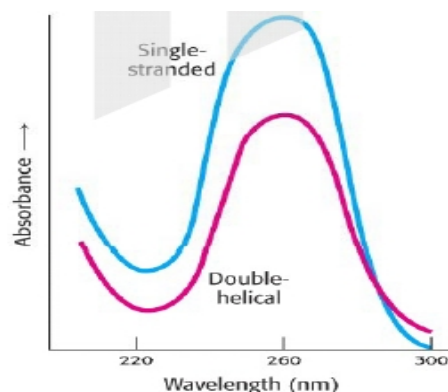
Contudo, tais pedaços imediatamente emparelham de novo à temperatura ambiente - predomina a cadeia dupla.

A desnaturação da molécula de DNA → separação das suas duas cadeias → variação nas suas propriedades físicas; ocorre:

- Valores extremos de pH
- Temperaturas elevadas
- Diminuição da constante dieléctrica do meio
- Exposição: ureia, amidas, outros compostos análogos.

Como consequência da desnaturação observam-se os seguintes fenómenos:

- Diminuição da viscosidade das soluções de DNA → quebra das ligações e portanto perda de rigidez;
- Aumento da sua densidade → DNA em cadeia simples é mais denso que em cadeia dupla;
- Aumento significativo da absorção de luz ultra-violeta → efeito hipercrómico → ruptura das pontes de H;
- Aumento significativo da absorção de luz ultra-violeta → efeito hipercrómico;
- Esta desnaturação pode ser seguida espectrofotometricamente por monitorização da absorvência de luz: 260 nm;
- As bases empilhadas da dupla cadeia de DNA absorvem menos luz do que as bases menos concentradas das moléculas de cadeia simples, e portanto a absorvência de DNA a 260 nm aumenta à medida que o DNA se desnatura → efeito hipercrómico.



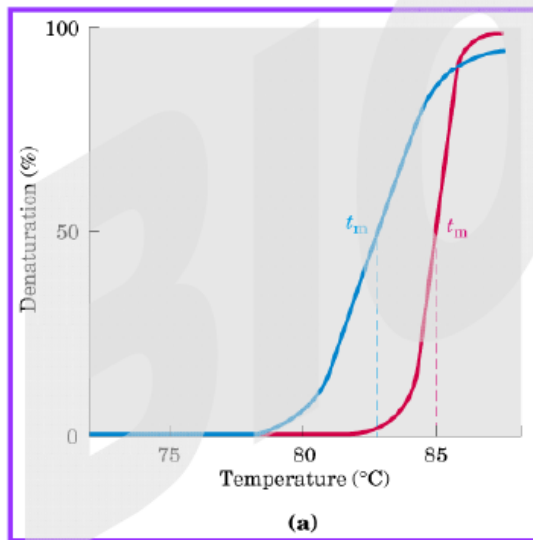
Temperatura de fusão - Desnaturação do DNA pelo calor

Se uma solução de DNA é aquecida $> 90^{\circ}\text{C}$ a energia cinética suficiente para desnaturar o DNA completamente, fazendo com que se separe em duas cadeias simples.

Desnaturação por ação do calor (fusão) define-se uma constante: temperatura de fusão ou temperatura no ponto médio de transição (T_m): temperatura a que as duas cadeias se encontram semidissociadas (50% do DNA é fundido) \rightarrow depende: pH, da força iônica e do tamanho e composição de bases do DNA.

T_m $>$ para os DNAs que contêm elevada proporção de citosina e guanina \rightarrow estimativa da % de C+G numa amostra de DNA.

Relação T_m vs. conteúdo C+G : citosina e a guanina formam 3 pontes H quando emparelhadas; Timina e adenina apenas formam duas pontes H \rightarrow sequências com predominância de pares CG \rightarrow mais energia para as separar ou desnaturar.



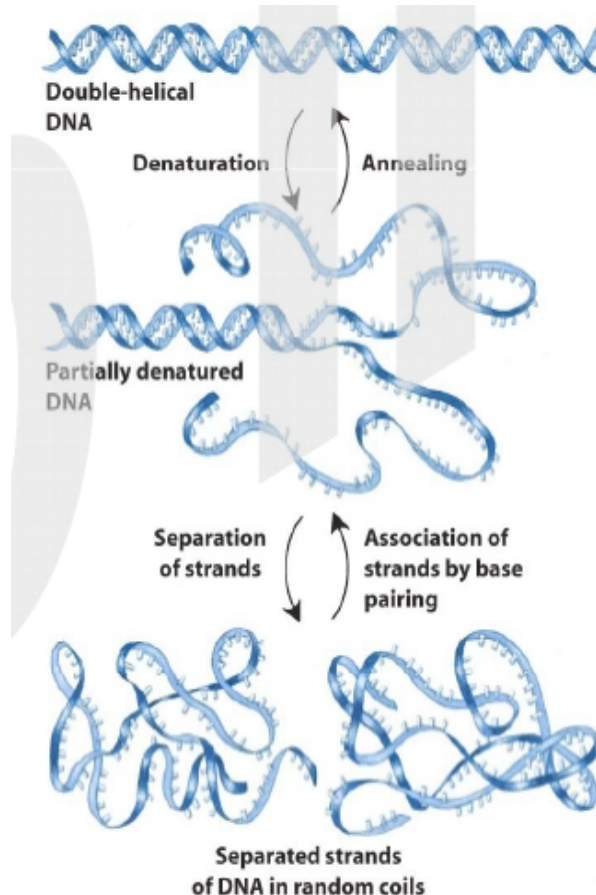
**T_m vs.
Desnaturação
do DNA pelo
calor**

Renaturação (annealing) da molécula de DNA

Processo de reemparelhamento das bases, com reconstituição da dupla hélice, quando se arrefece lentamente uma solução de DNA previamente desnaturada.

No entanto, apenas se forma uma molécula de cadeia dupla estável se cadeias complementares colidirem de uma forma tal que as suas bases se emparelham, o que é um acontecimento improvável se o DNA é muito longo e complexo (i.e. se contém um grande número de genes diferentes).

Se o arrefecimento dessa solução for demasiado brusco impede-se a difusão das cadeias de DNA no



meio, o que evita a renaturação, permanecendo o DNA desnaturado.

Métodos de Separação de Ácidos Nucleicos

- Electroforese
- Cromatografia
- Ultracentrifugação
- Diferenças de solubilidade

ELECTROFORESE

Poliacrilamida:

- Maior resolução: analisar fragmentos pequenos de ácidos nucleicos até 500 bp (350 Da);
- Concentrações 4% - 20%;
- Tampões: TBE;
- Géis desnaturantes: ureia (concentration final 7-8M)

Agarose:

- Separação de ácidos nucleicos de > 100 bp;
- Concentrações: 0.4% - 4%
- Tampões: TAE ou TBE (não-desnaturantes) e MOPS-formaldeído (desnaturantes);

O tamanho do poro no gel é controlado pela concentração inicial de agarose ou poliacrilamida: poros de tamanho grande são formados com concentrações baixas e poros de tamanho pequeno são formados a partir de concentrações mais elevadas.

Gel de agarose → analisar RNA ou DNA de 100 - 50.000 bp (50 kb) - separação pelo tamanho da molécula:

- Simples e eficaz para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA/RNA;
- Métodos de coloração sensíveis;
- Vasta gama de massas moleculares (>100 bp);
- Analítica ou preparativa;
- Qualitativa ou quantitativa;
- Verificar pureza e integridade de DNA/RNA;
- Avaliar extensão de uma reacção enzimática → clonagem de DNA;
- Agarose: produto extraído de algas - polissacárido linear (MW_r ~ 12.000): repetição de uma unidade básica de agarobiose, que compreende unidades alternadas de galactose e 3,6-anidrogactose;
- Disponibilidade de agarose com baixo ponto de fusão (62 a 65°C) - géis podem ser liquefeitos por aquecimento a 65°C - amostras de DNA separadas num gel podem ser recortadas, resolubilizadas e recuperadas;
- Propriedades gelificantes - pontes de hidrogénio inter- e intramoleculares: dentro e entre as cadeias longas de agarose;
- Géis de agarose - suspensão de agarose desidratada num tampão aquoso e posterior ebulição da mistura até se formar uma solução translúcida;
- Após arrefecimento da mistura a 50°C, a solução de agarose é colocada num molde formado por placas de vidro ou plástico, envolvidas por uma parede de adesivo ou moldura de plástico para dar ao gel uma profundidade de 3 mm - deixada arrefecer à temperatura ambiente para formar um gel rígido;
- Poços de aplicação - formados por pente de plástico formador de poços na solução do gel, e remoção deste pente uma vez o gel pronto;
- Não é necessário gel de concentração para a electroforese de DNA - mobilidades das moléculas de DNA são muito maiores no poço do que no gel e portanto todas as moléculas no poço se acumulam contra o gel no início da corrida;
- Para uma análise rápida que não precisa de uma separação excessiva das moléculas de DNA, é usual usar mini-géis com menos de 10 cm de comprimento;
- Os géis de DNA são invariavelmente corridos como géis horizontais, submarinos ou submergidos ▫ gel está totalmente imerso no tampão

Protocolo:

1. Preparação do gel com uma concentração de agarose apropriada ao tamanho dos fragmentos a separar;
2. Aplicação no molde e colocação do pente formador de poços;
3. Remoção do pente após formação do gel e deposição das amostras de DNA/RNA nos poços do gel;
4. Electroforese por aplicação de uma voltagem adequada por um período adequado à separação óptima dos fragmentos a analisar;

5. Coloração do gel ou visualização directa do gel se o corante é incorporado no gel por exposição a uma luz UV;

6. Registo fotográfico do gel;

7. A voltagem aplicada aos extremos de um gel gera um campo eléctrico com uma força definida pelo comprimento do gel e pela diferença de potencial nas extremidades (V/cm) o DNA migra em direcção ao ânodo (grupos fosfato carregados (-)).

Como a razão carga/massa é idêntica para todas as moléculas de DNA há separação efectiva pelo tamanho. Mr de um fragmento de DNA pode ser determinada pela sua mobilidade electroforética: aplicação de padrões marcadores de DNA de conhecida Mr no mesmo gel.

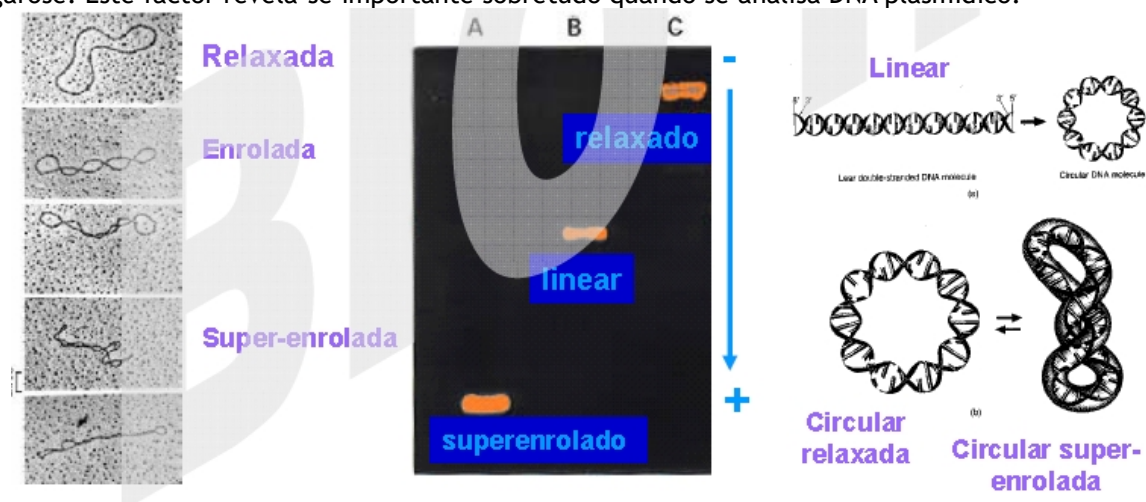
Parâmetros que afectam a migração do DNA/RNA no gel

□ Concentração de agarose / Dimensão molecular do DNA - papel importante na separação electroforética □ determina a gama da dimensão das moléculas de DNA que podem ser separadas adequadamente;

□ Voltagem aplicada → moléculas de DNA migram a uma velocidade proporcional à voltagem aplicada; contudo, à medida que se aumenta esta última, verifica-se que as moléculas de maiores dimensões migram a uma velocidade proporcionalmente mais elevada que os fragmentos mais pequenos. Consequentemente, quando se pretende separar moléculas de grandes dimensões deve utilizar-se géis de baixa concentração e aplicar-se voltagens igualmente baixas (1V/cm);

□ Tampões de electroforese □ os dois tampões mais utilizados são o Tris/acetato (TAE) e o Tris/borato (TBE). Ambos apresentam um efeito praticamente idêntico na mobilidade do DNA, contudo diferem bastante na sua capacidade de tamponamento - TBE > capacidade de tamponar o meio, no entanto não se deve utilizar quando se pretende recuperar as moléculas de DNA a partir do gel e purificá-las (ex: sequenciação).

□ Conformação do DNA - fragmentos de DNA com a mesma massa molecular mas com conformação diversa (linear, circular super-enrolada ou circular relaxada) migram com velocidades diferentes num gel de agarose. Este factor revela-se importante sobretudo quando se analisa DNA plasmídico.



O DNA íntegro aparece como uma banda única e bem definida, fluorescente, de intensidade proporcional ao teor da amostra em DNA. O DNA degradado aparece como um arrastamento (*smear*) característico.

Amostra de DNA - quantidade de DNA a analisar depende:

□ largura do poço - tamanho dos dentes do pente;

□ espessura do gel - volume da solução de agarose e altura do molde;

□ número e tamanho dos fragmentos de DNA - 5 - 200 ng fragmentos únicos; 10 g amostras com vários fragmentos e de várias dimensões (ex. ensaios de restrição DNA genómico);

□ Corantes indicadores de migração - monitorização da separação electroforética através de corantes que se incorporam na solução de deposição da amostra:

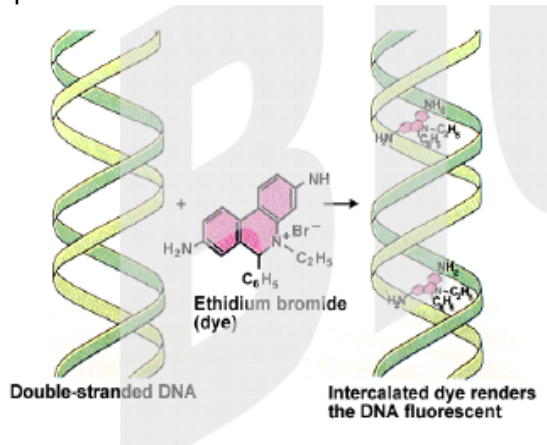
- Azul de Bromofenol (gel agarose 0,8% acompanha fragmentos de 300 bp);

- Xileno Cianol (gel agarose 0,8% acompanha fragmentos de 9 kb) 0,8%;

Podem interferir com a visualização dos fragmentos com os quais migram conjuntamente.

- Brometo de etídio - utilizado para visualização directa do DNA/RNA no gel - molécula plana cíclica que se intercala entre as bases empilhadas do DNA/RNA e emite fluorescência vermelho-alaranjada (590 nm) quando iluminado com luz UV - detecção muito sensível (< 5 ng) mas visualização prolongada pode danificar o DNA por dimerização dos pares de bases e corte das cadeias - pode ser adicionado directamente à solução de agarose antes da formação do gel ou numa solução onde se mergulha o gel após

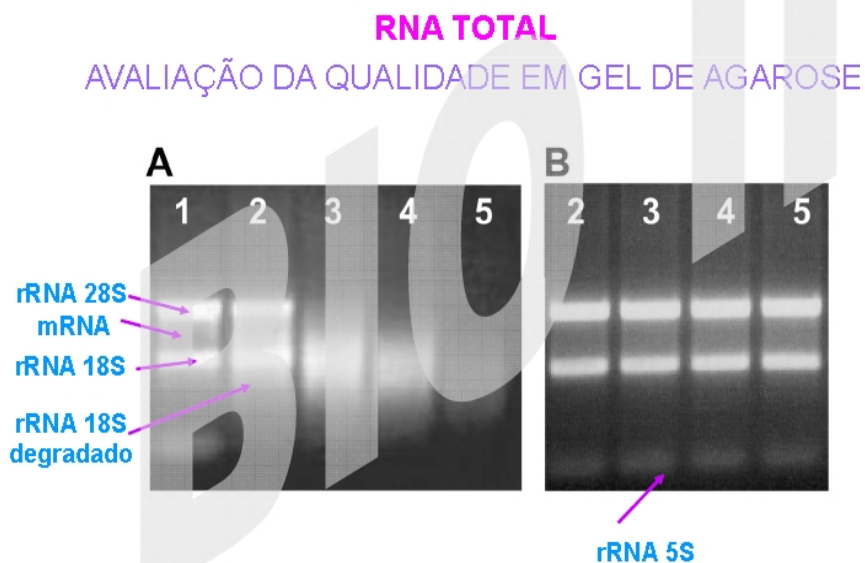
electroforese; potente mutagénico, suspeito de ser cancerígeno - manusear com luvas e protecção dos olhos quando se usa luz UV.



Marcador de massas moleculares - aplicado num dos poços do gel - solução contendo fragmentos de DNA de massas moleculares conhecidas, de modo a que se possa construir uma curva de calibração para o cálculo do tamanho/massa de fragmentos de DNA / RNA desconhecidos. Ex: 100 bp DNA ladder; produtos de digestão do pBR322 (fragmento pequenos) ou fago lambda (fragmentos maiores).

6. Estudo da expressão de um gene animal

Extracção de RNA total



TRIZOL: Mistura de fenol + isoticianato de guanidina (agente caotrópico):

- desnaturação proteica;
- dissociação de complexos ribonucleoproteicos;
- inibição RNases.

Clorofórmio (+ álcool isoamílico):

- desnaturação proteínas/ lípidos;
- separação de fases.

Isopropanol:

- Precipitação RNA;
- Etanol 75% - Lavagem RNA.

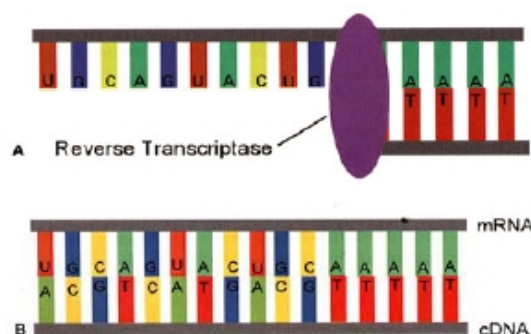
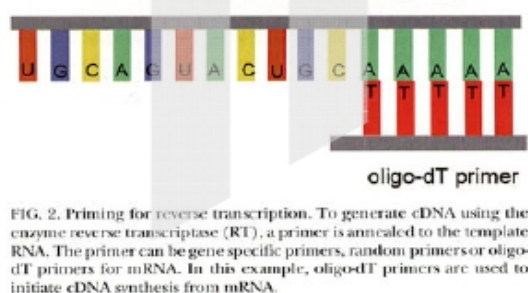
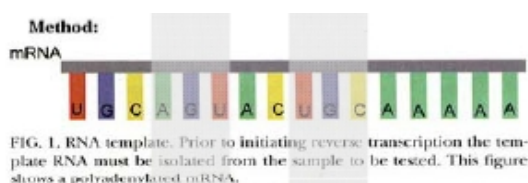
Tratamento de soluções com DEPC (dietilpirocarbonato) - inactivação RNases:

- Uso de luvas;
- Tratamento do material de plástico, vidro, etc..

Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucleicos

- Verificar integridade do DNA/RNA ▫ Electroforese em gel de agarose;
- Avaliar quantitativamente e qualitativamente a preparação de DNA/RNA - espectrofotometria;
- As soluções de ácidos nucleicos absorvem luz ultravioleta - máximo de absorvência a 260 nm ▫ anéis aromáticos das bases;
- Pode-se determinar (ácido nucleico) numa solução - A260;
- Uma solução de DNA de cadeia dupla de concentração 50 µg DNA por mL tem uma absorvência de 1,0 a A260 numa cuvette de quartzo de 1 cm: concentração DNAds (µg/mL) = A260 x FD x 50;
- Uma solução de RNA ou DNA de cadeia simples de concentração de 40 µg/mL tem uma absorvência de 1,0 a A260 numa cuvette de 1 cm: concentração DNAss/RNA (µg/mL) = A260 x FD x 40;
- A concentração mínima de ácidos nucleicos que pode ser determinada com precisão é 2,5-5,0 µg/mL
- O método espectrofotométrico para ácidos nucleicos é simples, rápido, não destrutivo e muito sensível; contudo, mede tanto DNA como RNA
- Os contaminantes também podem ser identificados por espectrofotometria de ultravioleta de 200 nm a 300 nm: razão A260/A280 ~ 1,8 indica - amostra está livre de contaminação por proteínas que absorvem fortemente a 280 nm;
- Razão A260/A230 ~ 2,2 - amostra está livre de contaminação por fenol usado durante a extracção que absorve fortemente a 230 nm.

Síntese de cDNAs por Transcriptase Reversa (RT)



1. Conversão de mRNA numa cadeia simples de DNA complementar do RNA (cDNA), por acção de uma enzima - Transcriptase Reversa (RT) - RT do vírus do mieloblastoma aviário (AMV-RT).
 2. Conversão de cDNA de cadeia simples num cDNA de cadeia dupla, por acção de uma enzima (DNA polimerase)
 3. Amplificação por PCR (RT-PCR)
- Thermus flavus (Tfl DNA polimerase) Polymerase Chain Reaction (PCR) - Reacção de polimerização em cadeia
- O estudo das propriedades genéticas ou da actividade dos genes a nível molecular depende do teor de moléculas de ácidos nucleicos disponíveis, de forma a permitir a sua análise pelos métodos correntes. Estima-se que independentemente do método utilizado seja necessário 10^5 - 10^6 moléculas de DNA ou RNA para um único teste analítico.
- Foram feitos esforços no sentido de aumentar o poder de resolução e baixar o limite de detecção

dos métodos existentes.

Em 1983, Kary Mullis inventou um novo método de análise de ácidos nucleicos: incremento do número de moléculas → PCR - Polymerase Chain Reaction: Prémio Nobel da Química (1993).

É uma técnica simples e facilidade de manipulação.

É frequentemente uma das primeiras técnicas a ser usada quando se analisa DNA.

Esta técnica permite partir de quantidades mínimas de DNA e, por amplificação enzimática *in vitro*, obter mais de 1 milhão de cópias de determinado fragmento de DNA, usualmente chamado template de DNA ou DNA molde.

Pode ser considerado como uma técnica análoga do processo de replicação do DNA que ocorre nas células.

É também uma técnica que substitui em muitos casos os métodos tradicionais de clonagem, uma vez que cumpre a mesma função, a produção de grandes quantidades de DNA a partir de quantidades mínimas de DNA molde.

Para além da sua utilidade na clonagem de DNA, o PCR é uma ferramenta da medicina forense.

Pode também ser usado para a detecção de infecções virais não sintomáticas

Diagnóstico pré-natal de uma vasta gama de doenças genéticas.

Método de síntese de ácidos nucleicos *in vitro* através do qual um determinado fragmento de DNA pode ser especificamente replicado.

Necessário para a reacção de PCR:

- DNA (ou RNA - RT-PCR) molde;
- Primers (oligonucleótidos iniciadores);
- Tampão de reacção (Tris, KCl, Mg²⁺, albumina de soro bovino/ detergente);
- Nucleótidos (dNTPs);
- Polimerase de DNA (DNA polimerase).

DNA/RNA molde

Contém o fragmento a amplificar (DNA alvo): dimensão menor → > eficiência do PCR.

Necessário ter algum conhecimento da sua sequência para a escolha dos primers ou oligonucleótidos iniciadores.

Isolado de qualquer fonte biológica: sangue, tecidos (biópsias cirúrgicas), células (espermatozoides), raízes de cabelo.

Primers ou oligonucleótidos iniciadores

PCR bem sucedido: escolha dos primers.

Conhecimento da sequência do DNA alvo: bases de dados genéticas.

Programas informáticos para desenho de primers e estabelecimento das condições de PCR óptimas.

Complementares de sequências que ladeiam o DNA alvo e não de outras sequências presentes no DNA molde ou ligeiramente diferentes de modo a incluir alterações nas cópias em relação ao DNA alvo.

Devem ter o mesmo conteúdo em G + C.

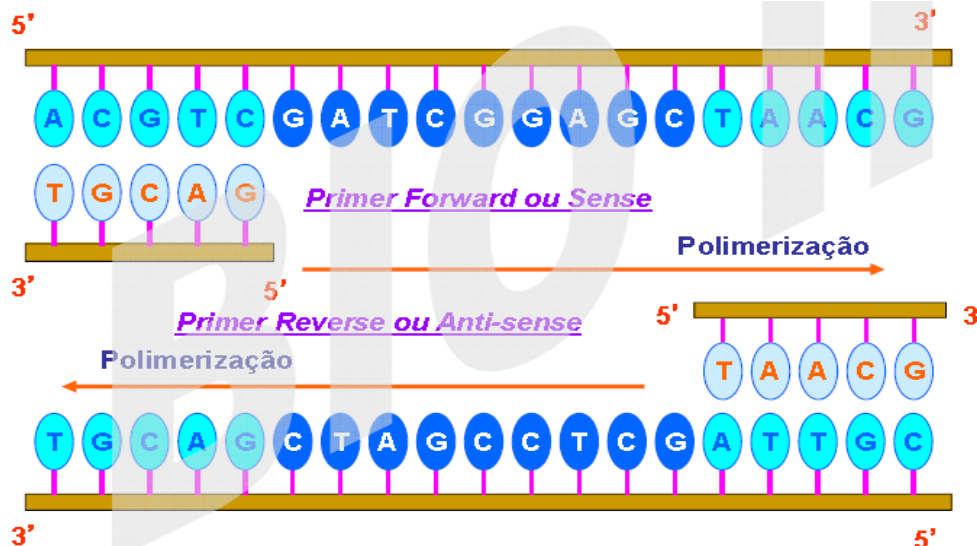
Devem ter T_m (temperatura de fusão) semelhantes.

20-30 nucleótidos: impede formação de híbridos estáveis à temperatura de polimerização (72°C).

Sequências diferentes entre si □ não podem ser autocomplementares ou formar dímeros (primers-dimers).

Frequente quando a sequência a amplificar está pouco concentrada e a reacção se prolonga por muitos ciclos.

Extremidade 3' de um primer emparelha com a extremidade 5' do outro primer.



- Tris confere pH óptimo para a DNA polimerase.
- Sal (ex. KCl) < 50 mM → facilitar a hibridação dos primers, mas > 50 mM inibe a actividade DNA polimerase.
- BSA, gelatina, detergentes não-iónicos (ex. Tween 20) → estabiliza a DNA polimerase.
- Mg^{2+} / Mn^{2+} → co-factores da DNA polimerase: a sua concentração influencia:
 - Temperatura de dissociação do DNA molde e do produto de PCR;
 - Hibridação dos primers;
 - Actividade DNA polimerase;
 - Especificidade do produto de PCR;
 - Fidelidade da cópia em relação ao DNA molde;
 - Formação de dímeros dos primers.

Nucleótidos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

- Solução stock, pH 7;
- 20-200 μ M de cada dNTP → equilíbrio óptimo entre:
 - Rendimento;
 - Especificidade;
 - Fidelidade - evitar erros de incorporação.

DNA polimerase

Fragmento de Klenow da DNA polimerase I de *E. coli*.

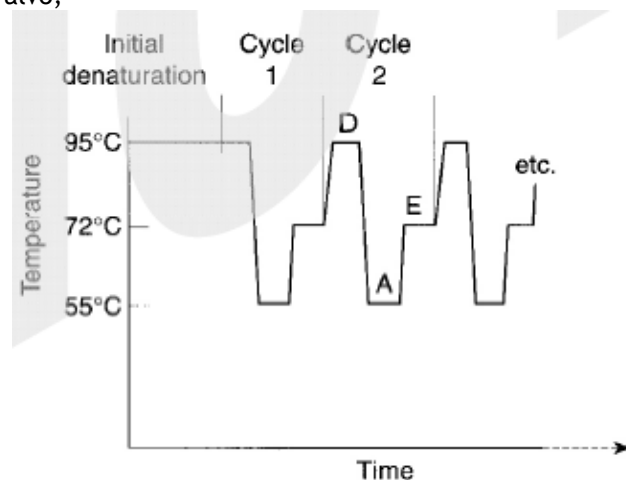
1ª enzima utilizada na técnica de PCR:

- actividade polimerásica 5'- 3' e exonucleásica 3'-5' (37°C); desnatura com a temperatura necessária para desnaturar o DNA - necessário após cada ciclo adicionar mais enzima; actividade a 37°C favorece a formação de falso híbridos (rendimentos inferiores e produtos PCR heterogéneos);
- DNA polimerase termo-estáveis (actividade 70-72°C);
- Bactérias termófilas: resistentes a 96°C → automatização do PCR;
- > especificidade e > rendimento do PCR;
- Taq (*Thermus aquaticus*) - actividade polimerásica e exonucleásica 5'- 3';
- Tfl (*Thermus flavus*): actividade polimerásica 5'- 3' de DNA de cadeia dupla (Mg^{2+}), formação de cadeia dupla de DNA a partir RNA molde na direcção 5'-3' (Mn^{2+}) e actividade exonucleásica 5'- 3'.

Ciclos de amplificação

30 - 35 ciclos com 3 etapas cada:

1. Desnaturação do DNA: 92-96°C, 30-40 sec.;
2. Ligação dos primers às cadeias (hibridação/ annealing) - 55-60°C, 30-40 sec.;
3. Extensão pela enzima termoestável - 72°C - depende do tamanho do produto - acumulação exponencial (X_2) do DNA alvo;



ETAPA 1 - DESNATURAÇÃO

- DNA molde de dupla cadeia é desnaturado por aquecimento > 90°C - duas cadeias dissociadas, livres em solução;
- DNA alvo fica acessível;
- Temperatura versus tempo variam com: natureza da amostra, conteúdo em G+C (3 pontes H, ligação mais estável que A+T); temperatura demasiado baixa → desnaturação incompleta (permite reemparelhamento das cadeias de DNA); diminuição do rendimento da reacção; temperatura demasiado elevada e/ou durante muito tempo → declínio rápido da DNA polimerase.

ETAPA 2 - HIBRIDAÇÃO / ANNEALING

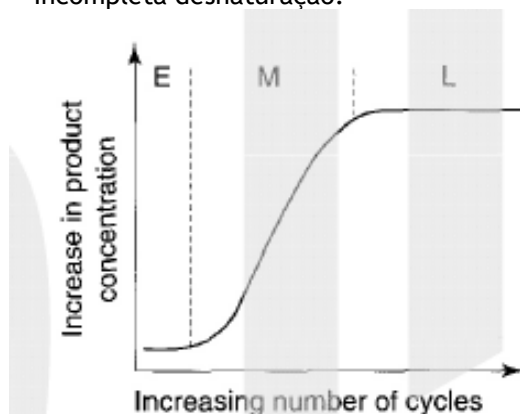
- Ligação dos 2 primers, presentes em excesso, aos locais que flanqueiam o DNA alvo, para os quais são complementares;
- Iniciadores da síntese de DNA - fornecem um grupo 3'-OH livre para a DNA polimerase;
- Temperatura é reduzida para 40-60°C - favorecer o emparelhamento dos primers com o DNA alvo em vez do reemparelhamento das cadeias de DNA molde;
- Eficiência versus especificidade - temperatura e tempo variam com: composição em bases dos primers: > conteúdo em G+C → > temperatura: evita formação de falsos híbridos (> especificidade);
- Comprimento e concentração dos primers;
- Necessário otimização caso a caso: > especificidade, > rendimento, temperatura ideal de primers com 20 nt 2°C (A + T) + 4°C (G + C).
- Otimização da temperatura de hibridação. Ex.: Tm primer 54°C;
- Otimização da concentração de Mg^{2+} no tampão de reação. Ex Variar $[Mg^{2+}]$ em incrementos de 0,5 mM.

ETAPA 3 - ELONGAÇÃO

- Elongação ou extensão do complexo primer-DNA;
- DNA polimerase com actividade 5'-3';
- Síntese de DNA começa a partir de ambos os primers até as novas cadeias serem extendidas ao longo e para além do DNA alvo;
- Temperatura de elongação, depende da enzima utilizada;
- Tempo de elongação, depende do tamanho e concentração do DNA alvo, do tamanho do produto de PCR e da temperatura de elongação.

Número de ciclos

- Acima de 35 ciclos: efeito plateau:
 - Depleção de reagentes;
 - Perda de actividade da polimerase;
 - Reemparelhamento do produto;
 - Incompleta desnaturação.

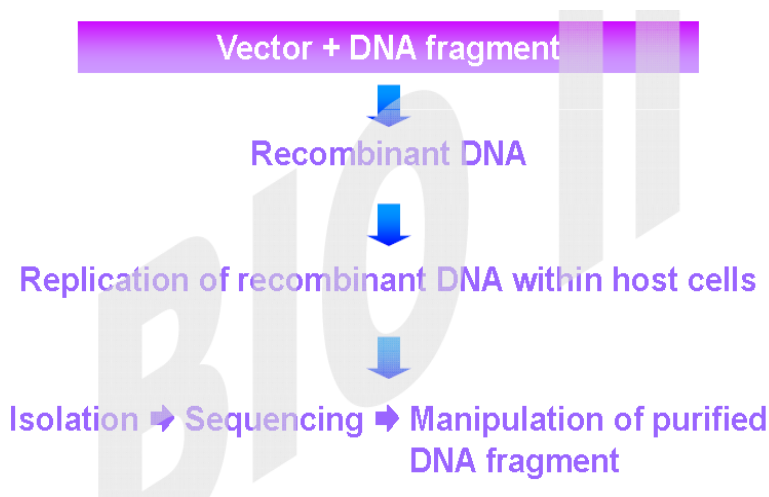


$$2^n$$

n – número de ciclos

O cDNA correspondente ao gene da β -actina é, frequentemente, usado como padrão interno nas amplificações do mRNA em estudo.

Tecnologia de DNA recombinante



Metodologias

Endonucleases de restrição: enzimas que cortam as sequências de DNA em sítios específicos (ex., EcoRI at GAATTC).

Vectores de Clonagem: Moléculas de DNA que incorporam DNA estranho e se replicam dentro de um organismo hospedeiro (ex. plasmídeo pUC18 em *E. coli*).

Livrarias: clones que no seu conjunto representam um DNA (genómico ou cDNA).

Electroforese: separação de moléculas utilizando um campo eléctrico.

Sequenciação DNA: determinação da sequência das bases para uma cadeia de DNA.

Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR): amplificação de uma região específica dentro dum genoma.

Plasmídeos Bacterianos

- Moléculas de DNA circulares de dupla cadeia;
- Dimensão: 1kb a 200kb;
- Encontrados numa variedade de espécies bacterianas;
- Frequentemente, contêm genes que codificam para proteínas que na natureza são benéficas para o hospedeiro bacteriano: resistência a antibióticos, produção de enterotoxinas, enzimas de restrição e de modificação;
- Comportam-se como unidades genéticas acessórias “ replicon ” que se replicam independentemente do cromossoma bacteriano (pode atingir um elevado número de cópias por célula);
- Depende das enzimas codificadas pelo hospedeiro para a sua replicação e transcrição.

Uso:

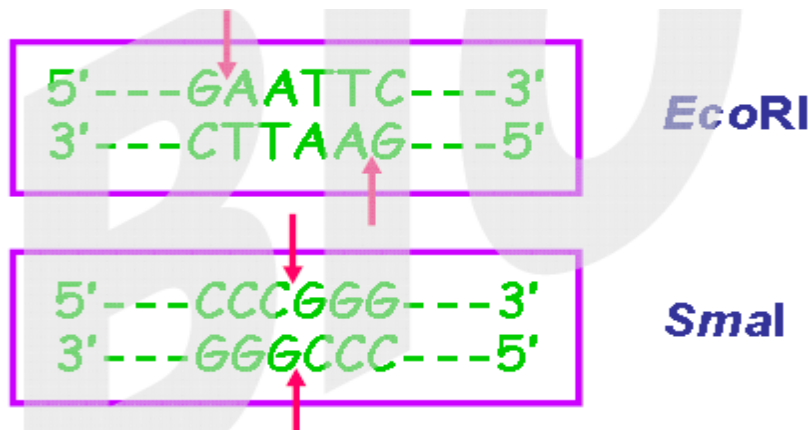
- Clones de pequenos fragmentos de DNA (100-5,000 bp) mantidos em células *E. coli*;
- Desenho: origem de replicação activa permite múltiplas voltas de replicação durante cada divisão celular → muitas cópias de plasmídeos estão presentes em cada célula;
- Genes conferindo resistência a antibióticos (ampicilina, canamicina) são usados como marcadores de selecção das cópias de plasmídeo;
- Marcadores fenotípicos são usados como indicadores da presença de DNA estranho (*lacZ*);
- Os plasmídeos são introduzidos na *E. coli* por transformação e são facilmente purificados a partir de um caldo de cultura.

Enzimas de restrição ou Endonucleases de restrição (ER)

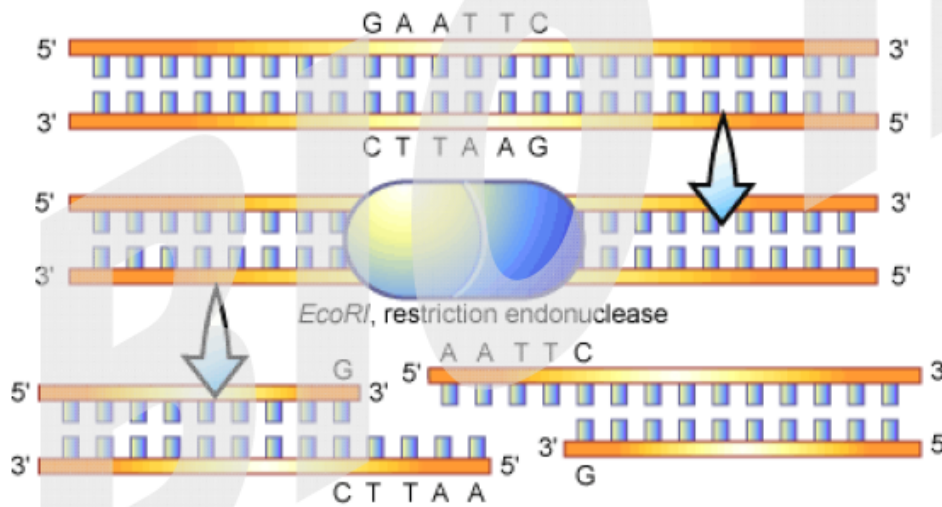
- Enzimas específicas de determinados tipos de bactérias; função: proteger a bactéria da acção de DNAs estranhos;
- Catalisam reacções de hidrólise das ligações fosfodiéster que mantêm unidos dois nucleótidos situados dentro das cadeias de DNA - endonucleases ou endodesorribonucleases;
- Actuam em sítios específicos - sítios de restrição apresentam normalmente um eixo de simetria - palíndromas;
- Peças críticas para a manipulação de moléculas de DNA, devido à especificidade com que “cortam” sequências de DNA”;
- Cada ER reconhece uma sequência específica e hidroliza (“cliva”, “corta” ou “digere”) essa sequência sempre que esta esteja presente no DNA.

Palíndromas:

- As endonucleases de restrição geralmente reconhecem e cortam palíndromas, onde as 2 cadeias da dupla hélice de DNA apresentam a mesma sequência quando lidas na direcção 5’-3’.



Sítios de restrição – palindromas (Tipo II)



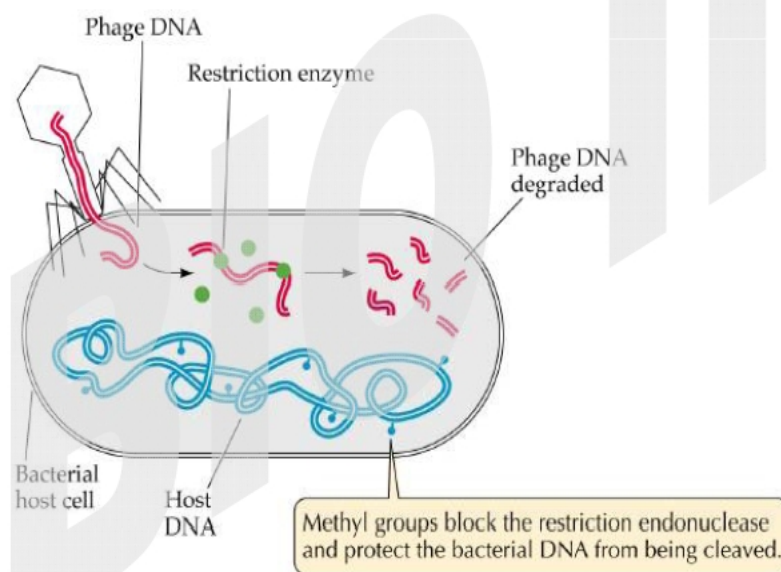
Fazem parte de um sistema denominado sistema de modificação-restrição → sistema de protecção bacteriano - além de cortarem o DNA estranho à bactéria (DNA viral, bacteriano ou animal), protegem o DNA bacteriano através da transferência de grupos metilo para as bases citosina e adenina → metilação do DNA bacteriano → para evitar que este seja degradado.

Tipo I: são enzimas constituídas por 3 subunidades proteicas; reconhecem os sítios de restrição mas cortam as cadeias de DNA em local afastado dessa zona (mais de 1000 pares de bases);

Tipo II: trata-se das enzimas mais simples que se conhece, sendo constituídas por apenas uma subunidade proteica. Caracterizam-se por só possuírem actividade de restrição, cortarem as cadeias de DNA de maneira previsível e constante, em local dentro ou adjacente à sequência reconhecida, necessitam de magnésio como co-factor, não necessitam de ATP e a maior parte das enzimas reconhecer sequências de 4 ou 6 pares de nucleótidos. O único tipo utilizado em Biologia Molecular;

Tipo III: são enzimas constituídas por duas subunidades proteica se que necessitam da presença de magnésio e ATP; reconhecem os sítios de restrição mas cortam as cadeias de DNA a uma distância de 24-26 pares de bases.

Sistema de protecção bacteriano



Nomenclatura

- O género e a espécie do organismo que contém a ER é identificado pela primeira letra do género e pelas duas primeiras letras da espécie;
- A identificação da estirpe ou tipo é indicada a seguir à abreviatura do género-espécie;
- Quando uma estirpe tiver mais do que uma ER e respectivos sistema de modificação, estas vêm

indicadas por algarismos romanos;

d) Conforme se trate de uma ER ou respectiva metilase de modificação, a abreviatura é precedida por “endonuclease R” ou “metilase M”. Quando se torna claro que se trata apenas de ER a designação “endonuclease R” é omitida.

EcoRI

E *Escherichia*
co *coli*
R estirpe RY13
I primeira enzima isolada a partir desta estirpe

Ensaaios de restrição

Hidrólise de moléculas de DNA em sítios específicos pela acção de endonucleases de restrição que reconhecem as sequências que vão hidrolisar (ou “cortar”);

Dos ensaios de restrição podem resultar 2 tipos de fragmentos:

1. Fragmentos coesivos ou “sticky ends”

- Resultam da acção de enzimas que hidrolisam as ligações fosfodiéster em locais ligeiramente afastados (2-4 nucleótidos) do eixo de simetria e apresentam sequência 5' e 3' protuberantes;

- Permitem que fragmentos obtidos por hidrólise com uma mesma enzima se possam ligar, por pontes de hidrogénio entre esses nucleótidos, que são complementares, devido à simetria da sequência de restrição - um único fragmento de DNA pode re-circularizar através da ligação intramolecular das suas duas extremidades - ligação covalente obtida com a enzima DNA ligase;

- Bastante explorados na tecnologia de DNA recombinante base da clonagem;

2. Fragmentos não-coesivos ou “blunt ended”

- Resultam da acção de enzimas que hidrolisam as ligações fosfodiéster ao nível do eixo de simetria originando fragmentos sem extremidades protuberantes cuja ligação requer a actividade de uma DNA ligase;

- De um modo geral, enzimas de restrição diferentes reconhecem sequências diferentes;

- Existem várias enzimas, isoladas de espécies bacterianas diferentes, que cortam cadeias de DNA nas mesmas sequências - isosquisómeras.

Unidade de enzima de restrição - quantidade de enzima necessária para digerir completamente 1µg de DNA do fago λ, num volume de reacção de 50µl, durante 1 hora, nas condições óptimas de pH, força iónica e temperatura 1µg DNA.

1 U enzima:

- Volume final geralmente 20 µL;

- Incubação efectuada à temperatura recomendada durante 1h-

Tampão de digestão:

- Tris (pH óptimo);

- Reacção parada pela adição de uma solução contendo EDTA (ex. LB);

- DTT (ditiotreitól) ou β-mercapto-etanol (inibidores de nucleases);

- Albumina de soro bovino (inibidora de proteases);

- Cloreto de magnésio (co-factor magnésio);

- Cloreto de sódio (força iónica);

Cada enzima necessita de condições específicas (descritas em tabelas):

- ER são termo-sensíveis e reagentes bioquímicos dispendiosos - uso exige planificação considerável e cuidada;

- Cada ER tem que ser estudada para as suas condições óptimas de reacção:

- intervalo de pH específico (geralmente 7,5 -8,0);

- composição do tampão;

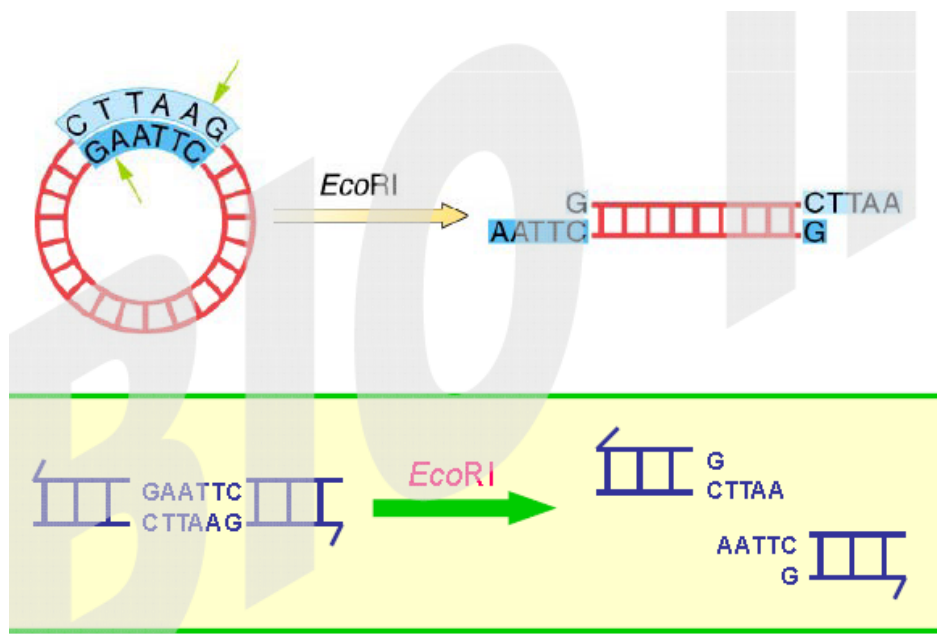
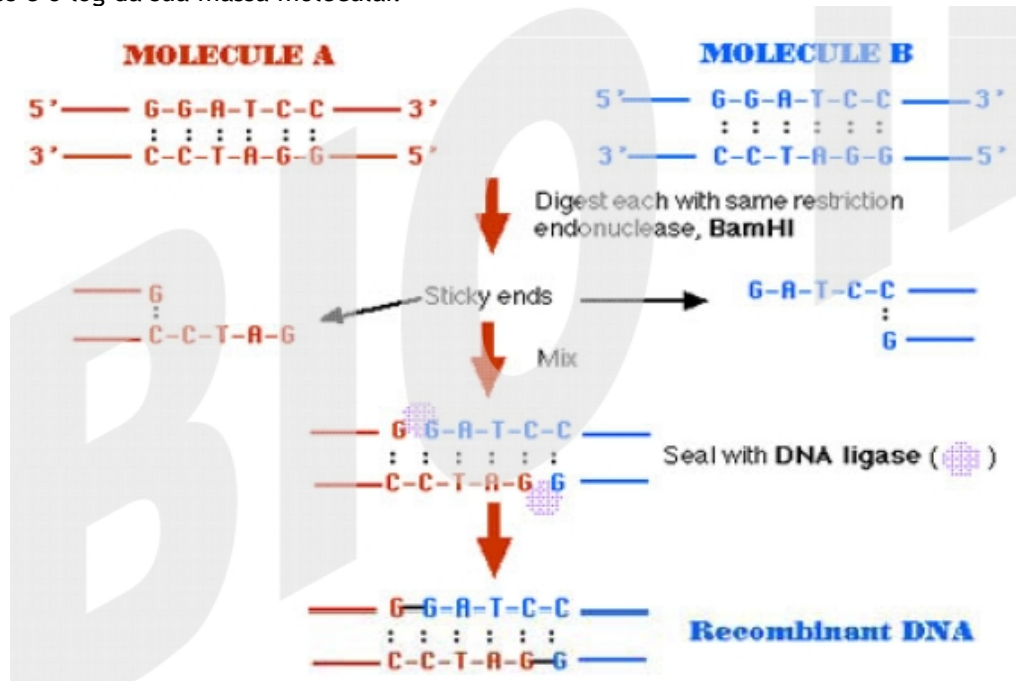
- temperatura de incubação (geralmente 37°C);
- Esta informação é fornecida para cada enzima pelo fornecedor ou pela literatura:

As ERs são muito instáveis podem ser armazenadas a -20°C num tampão contendo 50% glicerol. Quando manuseadas devem ser armazenadas em gelo e nunca à temperatura ambiente

Devido ao custo elevado a digestão com ER deve ser feita à escala micro (uma reacção típica contém < 1 µg DNA e 1 U ER).

Quando se pretende efectuar digestões múltiplas - digerir a mesma molécula de DNA com várias enzimas ▫ deve começar-se pela enzima que actua à força iónica mais baixa, ajustando-se depois o pH e a força iónica necessários à actuação das restantes enzimas.

No final dos ensaios de restrição deve proceder-se à análise dos fragmentos de restrição obtidos ▫ electroforese em gel de agarose → proporcionalidade inversa entre a distância percorrida pelos fragmentos e o log da sua massa molecular.



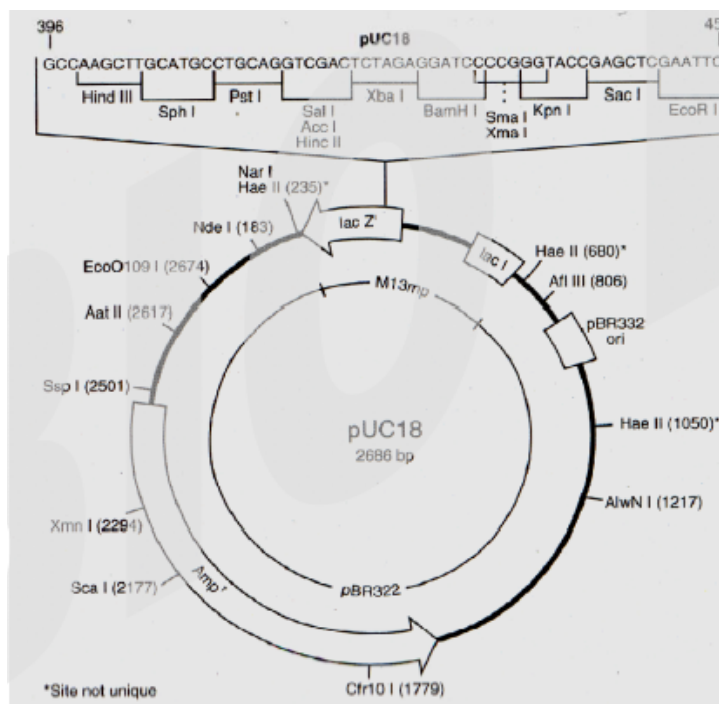
Mapas de restrição de fragmentos de DNA

Moléculas de DNA pequenas, após clivagem com uma enzima particular, vai produzir um número limitado de fragmentos. É pouco provável que este mesmo conjunto de fragmentos seja o mesmo para duas moléculas de DNA diferentes, por isso o perfil de fragmentos pode ser considerado uma impressão

digital do substrato de DNA.

□ O perfil de restrição é produzido pela electroforese da mistura da reacção de clivagem através de géis de agarose, seguida de coloração com brometo de etídio;

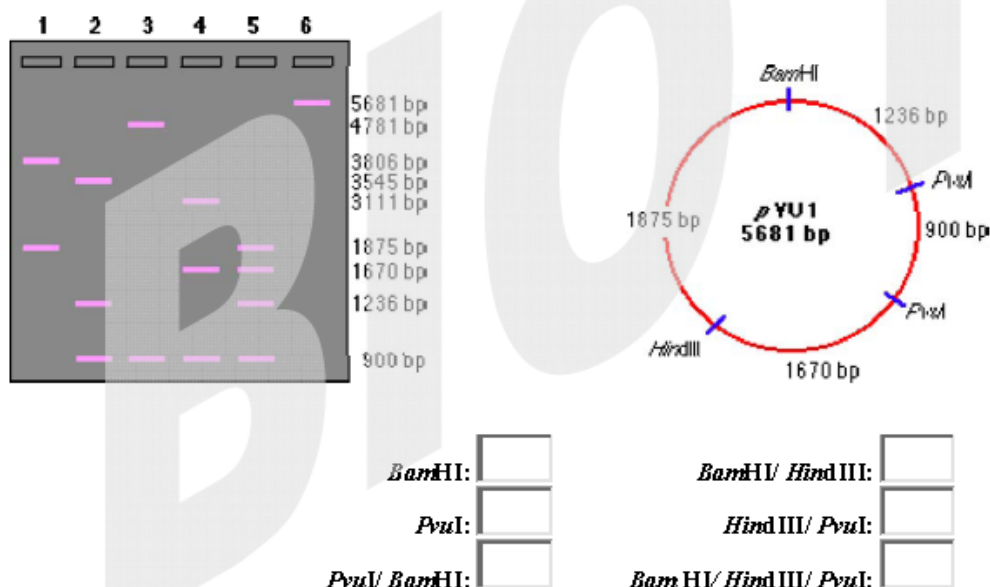
□ A separação dos fragmentos é baseada no seu tamanho molecular com fragmentos grandes permanecendo perto.



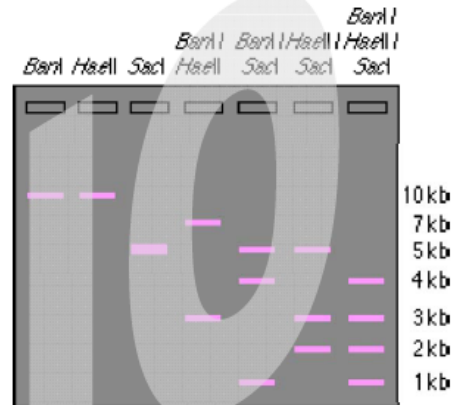
Exemplos

1. Considere que fez uma electroforese em gel de agarose, para verificar o mapa de restrição do plasmídeo pVU1, abaixo desenhado. Desgraçadamente, estava distraído (a) e não registou que enzima(s) utilizou em cada uma das misturas de reacção que foram analisadas (1 a 6).

Consulte o mapa de restrição do plasmídeo e o esquema da separação electroforética realizada apresentados, e indique qual ou quais foram as enzimas utilizadas em cada um dos ensaios de restrição (1 a 6).



2. As enzimas de restrição *BanI*, *HaeII* e *SacI* foram usadas na construção do mapa de restrição do plasmídeo pNUT. Efectuaram-se digestões simples e múltiplas, e os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose. Os resultados obtidos estão representados no esquema seguinte:



Construa o mapa de restrição do plasmídeo pNUT para as enzimas *BanI*, *HaeII* e *SacI*, indicando no esquema a posição relativa dos diferentes sítios de restrição.

Análise dos protocolos desenvolvidos

EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

Nota: O sucesso de qualquer preparação de RNA depende da contaminação pelas ribonucleases, de origem endógena e exógena, que poderão degradar o RNA. O procedimento de extracção do RNA recorre ao reagente TRIZOL, o qual contém fenol e isotiocianato de guanidina. Depois da homogeneização, removem-se contaminantes por extracção com solventes orgânicos e precipita-se o RNA com isopropanol. Por fim, lava-se o sedimento com etanol a 75% e redissolve-se o RNA em água DEPC.

A. Homogeneização

Homogeneizar o tecido no reagente TRIZOL, na proporção de 1 mL de TRIZOL por cada 50-100 mg de tecido



Transferir 1 mL do homogeneizado para um microtubo e agitar no vortex suavemente

B. Extracção com solventes orgânicos (separação de fases)

Incubar o homogeneizado durante 10 min à temperatura ambiente (dissociação completa dos complexos nucleoproteicos)



Adicionar 0,2 mL de clorofórmio.



Agitar o tubo vigorosamente, com a mão, durante 15 segundos e incubar à temperatura ambiente durante 2 ou 3 minutos



Centrifugar a 12.000 g, durante 15 min a 4°C. Após centrifugação a mistura separa-se em 3 fases: a) uma fase inferior vermelha de fenol-clorofórmio (DNA e proteínas); b) uma interfase leitosa; e c) uma fase aquosa superior, incolor. O RNA encontra-se exclusivamente na fase aquosa.

C. Precipitação do RNA

Transferir a fase aquosa para um novo microtubo e adicionar 0,5 mL de isopropanol



Incubar durante 10 min à temperatura ambiente e depois centrifugar a 12.000 g, durante 10 min a 4°C. O precipitado de RNA, por vezes invisível antes da centrifugação, forma um sedimento gelatinoso no fundo e na parte lateral do tubo

D. Lavagem do RNA

Remover o sobrenadante



Adicionar 1 mL de etanol a 75%



Misturar suavemente por inversão, 2 ou 3 vezes. Centrifugar a 7.500 g, durante 5 min a 4°C

E. Redissolução do RNA

Secar o sedimento ao ar, durante 5-10 min, ou sob vácuo, durante 2 min



Dissolver o RNA em 200 µL of H₂O DEPC. Guardar a amostra -80°C

F. Análise quantitativa e qualitativa do RNA

Diluir 10 µL de amostra em 990 µL de H₂O DEPC



Usar H₂O DEPC como branco. Acertar o zero do espectrofotómetro a 260 nm



Ler a absorvência a 230, 260 e 280 nm

Determinar a concentração da solução de RNA: $\text{Concentração de RNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{FD} \times 40$

A₂₆₀: Absorvência em 260 nm

FD: Factor de diluição

Factor 40: 1 unidade de absorvência a 260 nm corresponde a uma solução de RNA com a concentração de 40 µg/mL

Este protocolo permite obter > 1 µg de RNA total por 1 mg de tecido hepático.



Calcular a razão de leituras a 260 e 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) e a 260 e 230 nm (A₂₆₀/A₂₃₀), a qual dá, respectivamente, uma estimativa da pureza do RNA relativamente à contaminação com proteínas e fenol. Uma razão de 1,8-2,0 e 2,2-2,4 indica, respectivamente, ausência de contaminação proteica e fenólica.

A₂₈₀: Absorvência em 280 nm

A₂₃₀: Absorvência em 230 nm

A₂₆₀/A₂₈₀ → 1,8 - 2,0 → sem contaminação proteica

A₂₆₀/A₂₃₀ → 2,2 - 2,4 → sem contaminação fenólica



Avaliar a integridade do RNA por electroforese de ~ 5 µg de RNA, em gel de agarose a 1%. As bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S devem ser claramente visíveis, devendo a banda 28S apresentar, sensivelmente, o dobro da intensidade da banda 18S. O arrastamento (*smear*) entre estas duas bandas corresponde aos mRNAs. O arrastamento que se observar abaixo da banda 18S resulta geralmente da degradação do mRNA. A última banda, mais ténue, corresponde ao RNA ribossomal 5S.

Notas:

- Usar sempre luvas e evitar o contacto com a pele ou roupa durante a utilização de TRIZOL (contém fenol e isotiocianato de guanidina que causam queimaduras).
- Usar sempre luvas e material descartável e estéril para evitar contaminação com RNases.
- Preparar a H₂O DEPC na hote misturando dietilpirocarbonato (DEPC) e água desionizada até a concentração final de 0,1% (v/v). Incubar toda a noite à temperatura ambiente, na hote. Autoclavar durante 20 min, pelos menos duas vezes. A autoclavagem assegura a remoção completa de DEPC.

ELECTROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS EM GEL DE AGAROSE

Preparar o gel de agarose a 1%



Preparar e aplicar a amostra de DNA/RNA e o marcador de massas moleculares



Migração do DNA/RNA



Visualização e registo de resultados

Nota: Não incluí a análise dos restantes protocolos, por um lado porque já fui explicado o fundamento na introdução teórica dos trabalhos, por outro porque a esquematização iria ficar exactamente igual ao protocolo inicial.