



ACADEMIA DE PESCAS E CIÊNCIAS DO MAR DO NAMIBE

Somos uma instituição voltada no desenvolvimento de actividades de ensino, investigação científica e prestação de serviços a comunidade, através da promoção, difusão, criação, transmissão da ciência e cultura, bem como a promoção e realização de investigação científica, nos domínios das pescas.

☎ 244 934 477 374
✉ APCMN@APCMN-EDU.AO

📘 @APCMN
🌐 WWW.APCMN-EDU.AO

Técnicas laboratoriais mais utilizadas na detecção de ácidos nucleicos

Madalena Inácio

Assistente

Academia de Pescas e Ciências do Mar do Namibe, Farol de Noronha, CP 274, Moçâmedes, Namibe.

Endereço eletrónico: madalena.inacio@apcmn-edu.ao | clenioeduane2011@hotmail.com

Resumo

O dogma central da Biologia Molecular é resumido em três mecanismos: replicação, transcrição e tradução. Todos estes mecanismos também podem ocorrer in vitro através do uso de novas plataformas tecnológicas da PCR e da enzima transcriptase reversa (RT) também conhecida por DNA polimerase RNA-dependente que “imitam” estes processos. A descoberta da RT por David Baltimore e Howard Temin veio alterar o dogma central da Biologia Molecular (DNA->RNA->Proteína), permitindo compreender as enfermidades e a patogenicidade causados por retrovírus. Com estas novas ferramentas moleculares, actualmente é possível obter avaliações completas dos níveis biológicos que anteriormente eram inatingíveis. O objectivo deste trabalho é de rever os princípios básicos das principais técnicas laboratoriais utilizadas na investigação de ácidos nucleicos.

Palavras passe: PCR; RT-PCR em tempo real; Amplicons; RT; Biologia Molecular; electroforese.

Introdução

Para realização de todas as técnicas de Biologia Molecular, primeiramente é necessário a extração e posteriormente isolamento do material genético a partir da amostra biológica. Existem vários protocolos bioquímicos e kits comerciais de extração do material genético (DNA e RNA) disponível no mercado, porém todos são amplamente semelhantes. Por exemplo, as técnicas de extração do RNA envolve a ruptura mecânica dos tecido e células, perturbação das macromoléculas e nucleótidos complexos, separação do RNA das biomoléculas indesejadas (proteínas e DNA), concentração do RNA através da precipitação da solução ou via eluição deste a partir de uma matriz solida. O RNA isolado é tratado com água ultrapura ou com DNase para eliminar qualquer risco de contaminação com enzimas, traços de DNA ou outra molécula. O processo de extração e isolamento do RNA por si só, é um processo desafiador porque o RNA degrada com muita facilidade devido a acção de vários factores, como das enzimas RNase, podendo então afectar os resultados do ensaio.

PCR

A técnica convencional de reacção em cadeia da polimerase (do inglês PCR - Polymerase Chain Reaction) é uma técnica da Biologia Molecular que consiste na síntese de DNA *in vitro* mediante o qual a partir de pequenas quantidades de DNA alvo é possível obter bilhões de amplicons (cópias) duplicados deste em minutos. Esta poderosa tecnologia foi desenvolvida pela primeira vez pelo bioquímico americano Kary Mullis em 1983, permitindo a amplificação exponencial de fragmentos específicos dos ácidos nucleicos e a detecção de sequências de DNA ou RNA (Debnath et al 2010). Esta característica é extremamente importante não somente nas pesquisas biotecnológicas, mas também nos usos comerciais, incluindo nos testes genéticos (como de paternidade), criminologia forense, sequenciamento do genoma humano e microbiano, no controlo da qualidade industrial e nos diagnósticos *in vitro* de doenças como virais e bacterianas.

A PCR emprega diferentes componentes: DNA alvo (extraído da amostra biológica na qual contem o fragmento a ser amplificado) que se pretende estudar, 4 desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), um par de primers ou iniciadores específicos, DNA polimerase (geralmente a Taq-polimerase), um tampão (KCl), água ultrapura e um cofactor (Mg) para actividade da DNA polimerase.

Os primers são sequências oligonucleotídicas complementares a sequência de interesse, desenhadas e produzidas no laboratório ou compradas em uma empresa biotecnológica. Estes definem as sequências alvos do material genético em que sofrera amplificação, variando entre de 15 a 30 bases. Idealmente, os primers terão um conteúdo de GC de 40 a 60% (Debnath 2010).

A Taq-polimerase é uma enzima derivada da bactéria *Thermus aquaticus*, e é muito usada na PCR de rotinas onde o objectivo principal é obter a detecção da amplificação de um produto, permitindo obter produtos com altos rendimentos em relação as outras DNA-polimerase.

Tipicamente, a PCR requer uma plataforma de instrumentação com termociclador que consiste numa serie de 20-35 ciclos térmicos repetidos de amplificação. Segundo Pestana et al (2010), cada ciclo corresponde a três (3) fases reguladas por diferentes temperaturas permitindo deste modo a duplicação do material genético: (1) desnaturação, consiste na separação da fita dupla do DNA alvo obtido pelo aumento da temperatura do termociclador (94°C); (2) anelamento ou hibridização dos primers (Forward e Reverse) nas sequencias complementares da cadeia simples do DNA (45-55°C) formando um pequeno segmento na fita que fornece para DNA polimerase uma extremidade 3' para adição de um novo nucleótido; (3) extensão e polimerização, corresponde a síntese de duas novas fitas do DNA pela Taq-polimerase devido a activação desta através do aumento da temperatura (72 °C).

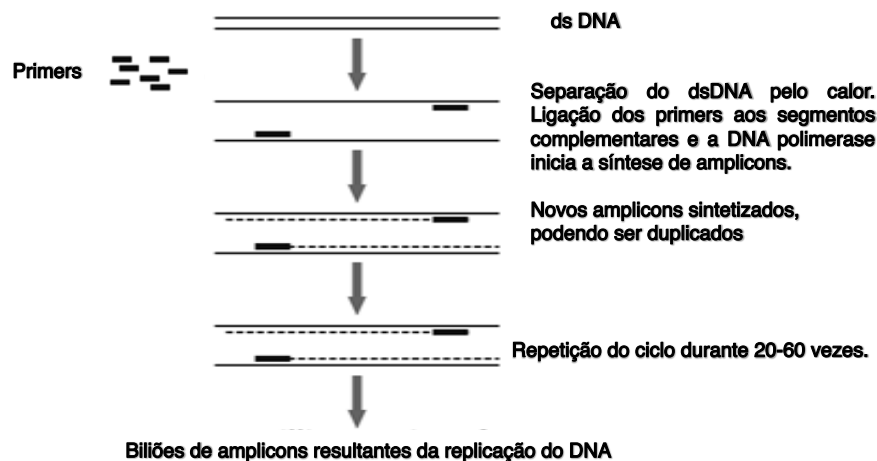


Figura1 Conceito de PCR. **Fonte:** Debnath et al (2010).

No final da reacção da PCR, seu produto amplificado é monitorado e analisado via electroforese (Figura 2). Esta tecnologia é extremamente sensível e flexível tendo disponível várias plataformas, incluindo RT-PCR em tempo real, Nested-PCR, PCR multiplex, Hyper-PCR e outras plataformas.

Electroforese

A electroforese é uma ferramenta biológica que envolve a análise de sequências genicas dos ácidos nucleicos extraídos a partir de amostras biológicas, permitindo a detecção, separação, purificação, quantificação e investigação da qualidade e integridade das mesmas (Figura2). A separação génica **metodológica** é comumente realizada via electroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida (PAGE) como acima citado.

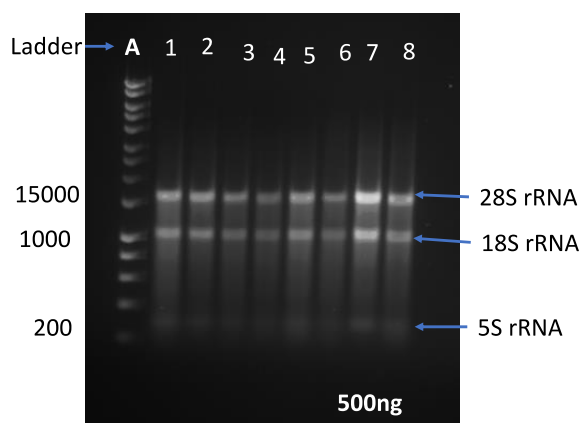


Figura 2 RNA de larvas de tilapia submetidos na electroforese em gel de agarose. **Fonte:** Inácio, Madalena (2018).

RT-PCR

A PCR em tempo real (RT-PCR) também conhecido por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), consiste na reação de transcrição reversa do RNA total seguida pela amplificação por PCR para síntese do DNA complementar (cDNA). Tal como qualquer outra DNA polimerase, a transcriptase reversa utiliza o RNA total para síntese de cDNA, além de requerer a presença de primers e de dNTPs (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) para esta síntese. RT-PCR é extremamente sensível na detecção e quantificação de RNA mensageiro (mRNA). Actualmente, esta poderosa ferramenta tem sido largamente e cada vez mais utilizada devido a sua elevada sensibilidade, boa reprodutividade e ampla faixa de quantificação. Esta técnica é mais sensível na detecção e quantificação da expressão genética, que permanece, permitindo a obtenção de resultados rápidos a curto prazo de tempo. Todos os instrumentos da RT-PCR baseiam-se na detecção de sinais fluorescentes.

A amplificação de qualquer amplicon na RT-PCR em tempo real é definido em quatro fases: (1) baseline, contem toda amplificação que ocorre abaixo do nível da sua detecção; (2) exponencial, ocorre amplificação que aumenta significativamente a sua eficiência. Nesta fase, o aumento da fluorescência é directamente proporcional ao aumento dos produtos amplificados durante todos ciclos da PCR; (3) linear, ocorre redução na eficiência de amplificação; (4) platô, fase final dos ciclos da PCR.

Detecção dos amplicons

Tal como qualquer outra técnica de PCR, esta tecnologia necessita de um termociclador modificado ligado a um software capaz de excitar e capturar sinais fluorescentes e um computador para aquisição e análise dos dados da reação traduzidos em valores numéricos. Os químicos comumente disponíveis no mercado para RT-PCR em tempo real usados na detecção dos amplicons de RNA ou DNA utilizam corantes fluorescentes: SYBR® Green, TaqMan®, Beacons moleculares e Scorpions. SYBR® Green e TaqMan® são os mais utilizados.

O corante SYBR® Green I é um protótipo fluorogénico livre intercalante que permite detectar o DNA ou RNA. Este corante emite fluorescência quando incorporado e ligado a dsDNA recém sintetizada, detetando todo DNA e outros produtos não específicos da PCR presentes na amostra. Na RT-PCR em tempo real, a emissão dos sinais fluorescentes é fracamente detectado durante a desnaturação e a sua intensidade aumenta durante a polimerização do DNA (Figura 3). SYBR® Green I tem sido usado em muitas aplicações, como na detecção do RNA viral.

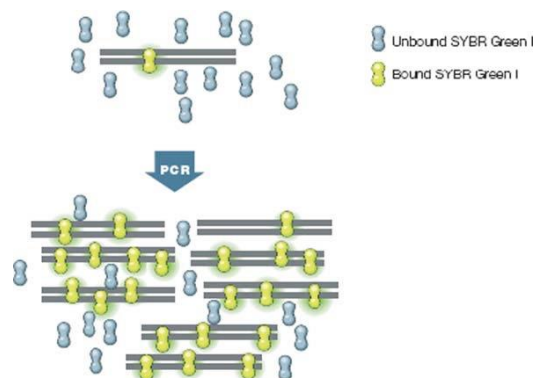


Figura3 Técnicas de RT-PCR em tempo real: Funcionamento do corante SYBR® Green I.

Fonte: Pestana et al (2010).

O TaqMan® baseia-se na actividade da Taq-polimerase e utiliza uma sonda fluorescente específica que detecta somente os genes alvos, reduzindo consideravelmente o aparecimento de falsos negativos. Este método é duplamente marcado por um fluoróforo repórter e um quencher. Quando a sonda está intacta, o repórter e o quencher ficam próximos um do outro, o que impede a emissão de qualquer fluorescência. Após a desnaturação o primer e a sonda ligam-se ao cDNA. Após a hibridação destes e durante a fase de extensão, a actividade da Taq- polimerase cliva a sonda, que separa os corantes repórter e quencher, e a fluorescência é então detectada (Figura 4).

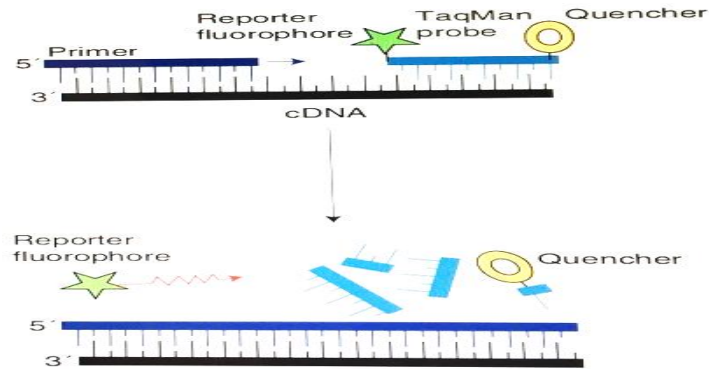


Figura4 Técnicas de RT-PCR em tempo real: Funcionamento do sistema TaqMan®. **Fonte:** Arya, Shergill, Williamson, Gommersall, Arya & Patel (2005).

Conclusão

Nas últimas décadas com o desenvolvimento das tecnologias omicas, as ferramentas da Biologia Molecular mostraram-se ser eficazes e eficientes na investigação biológica *in vitro*, permitindo compreender o funcionamento dos sistemas biológicos. A introdução da tecnologia de PCR revolucionou o campo de pesquisas científicas e biomédicas, permitindo alterações nos diagnósticos e prognósticos de enfermidades devido a sua sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e capacidade de amplificação e detecção de pequenos fragmentos génicos de DNA ou RNA de interesse em reduzido tempo. Durante a minha dissertação de mestrado, com objectivo de investigar os diferentes efeitos das misturas de poluentes ambientais em larvas de tilápia, mediante o uso de técnicas transcriptómicas e primers específicos de expressão genética do mRNA, foram utilizadas as mesmas plataformas tecnológicas descritas acima, sendo que estas mostraram-se ser eficazes e eficientes na obtenção dos resultados.

Referências Bibliográficas

Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N. & Patel, H. R.H. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Rev. Mol. Diagn.** **5(2)**, 209–219 (2005). doi: 10.1586/14737159.5.2.209. ISSN 1473-7159

Coffin, J.M & Fan, H. 2016. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Epub*,3(1): 29-51.doi: 10.1146/annurev-virology-110615-035556.

Debnath, M.; Prasad, G. B.K.S. & Bisen, P.S. 2010 **Molecular diagnostics: promises and possibilities**. ISBN 978-90-481-3260-7. doi:10.1007/978-90-481-3261-4_9, Springer.

HAAS, D.J. & TORRES, A.C.D.2016 Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica De Medicina Veterinária (26)**. ISSN:1679-7353.

Lowe, R; Shirley, N; Bleackley, M; Dolan, S & Shafee, T.2017 Transcriptomics technologies. **Plos Comput Bio** 13(5): e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>

Nicholson, P.; Rawiwan, P. & Surachetpong, W. Detection of tilapia lake virus using conventional RT-PCR and SYBR Green RT-qPCR. **J.Vis.Exp.(141)**, e58596, doi: 10.3791/58596 (2018).

Pestana, E.; Belak, S.; Diallo, A.; Crowther, J.R. & Viljoen, G.J.2010 **Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR Applications**, DOI 10.1007/978-90-481-3132-7_3, Springer.

Shipley, G.L. An introduction to real-time PCR. In: Dorak, M.T.2007 **Real-time PCR**. Taylor & Francis Group. ISBN 0–203–96731–3. <http://www.garlandscience.com>