

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE ATIVIDADE DIDÁTICA DE BIOLOGIA MOLECULAR, APLICÁVEL EM COMUNIDADES OU EM SALA DE AULA

Carolina Luiza de Quadros^{1*}, André Ramos²

1. Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
2. Professor Titular da UFSC - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética /Orientador

Resumo

A eletroforese é uma importante ferramenta de análise do DNA, usada para separá-lo de acordo com o seu tamanho. Nela o DNA pode ser corado com produtos intercalantes que tornam possível a sua visualização. No projeto Imagine (UFSC) de popularização científica, há um módulo (DNA, Diversidade e Hereditariedade), que utiliza um protocolo de eletroforese para análise do DNA dos próprios participantes, onde se faz a comparação genotípica entre indivíduos. O mesmo protocolo tem sido aplicado em aulas práticas para alunos de graduação da UFSC. Problemas técnicos com o corante intercalante foram detectados e o presente trabalho buscou solucionar o problema. Foram feitos testes utilizando as recomendações do fabricante do corante *Safer* (Kasvi), que se mostrou ineficiente, por alterar a fidelidade da genotipagem. Por esse motivo, foi testado um novo corante, que produziu resultados confiáveis. Houve então a substituição do corante utilizado no protocolo para *Unisafe Dye* (Uniscience).

Autorização legal: A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (CAAE: 87772818.2.0000.0121).

Palavras-chave: DNA; Material Didático; Eletroforese.

Introdução

A técnica de eletroforese é importante como ferramenta de análise do DNA, capaz de separá-lo de acordo com o tamanho dos fragmentos de interesse. Ao final da eletroforese, o DNA pode ser corado com produtos intercalantes, como o brometo de etídio (que, apesar de ser amplamente utilizado, é tóxico), e outros corantes disponibilizados mais recentemente no mercado (que não são tóxicos). Todos eles, quando expostos à luz ultravioleta (UV), emitem fluorescência, tornando possível a visualização de bandas de DNA no gel (ALBERTS et al., 2017; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). Dentro de um período de algumas décadas, o emprego de técnicas de biologia molecular, como a eletroforese, passou de cursos especializados, fornecidos a estudantes de pós-graduação, para cursos com caráter mais introdutório (PEREZ-PONS; QUEROL, 1996).

O projeto Imagine, criado em 2013 por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), busca a popularização científica, compartilhando o conhecimento dos laboratórios da instituição com pessoas de diferentes localidades (RAMOS; RAZZERA, 2014). Atualmente, o projeto possui módulos disponibilizados em seu site¹ na forma de Recursos Educacionais Abertos (REAs). Entre eles, encontra-se o módulo "DNA, Diversidade e Hereditariedade"², que inclui um protocolo de eletroforese, que é o interesse da presente pesquisa. Ele faz parte de etapas experimentais que visam a comparação genotípica entre os indivíduos participantes, utilizando os marcadores moleculares AT3-I/D (rs3138521) e PV92-Alu (rs3138523) (MUNIZ, 2008; PROJETO IMAGINE, 2014). Estes mesmos protocolos, desenvolvidos pelo projeto de extensão, passaram a também ser utilizados em aulas práticas oferecidas a alunos de graduação em Ciências Biológicas da UFSC.

Problemas técnicos com o corante intercalante de DNA utilizado (*Safer* da marca Kasvi) foram detectados durante as aplicações do módulo e das aulas práticas e, por eles afetarem a confiabilidade dos resultados, o presente trabalho buscou a otimização desse passo do protocolo, através da comparação de diferentes tipos de corantes disponíveis no mercado, incluindo o clássico brometo de etídio. O objetivo era identificar um corante não tóxico que não interferisse na velocidade de corrida dos fragmentos de DNA e assim garantisse a fidedignidade do protocolo.

Metodologia

De acordo com o protocolo do módulo "DNA, Diversidade e Hereditariedade"², intitulado "Etapa 3: Confecção de gel de agarose 1%, aplicação das amostras e eletroforese", foram utilizados os seguintes materiais: agarose, solução tampão TBE 0,5x, cuba para eletroforese, fonte de corrente elétrica, corante para visualização de DNA (*Safer* da marca Kasvi), corante de rastreamento e marcador de peso molecular (ou *Ladder*). O *Ladder* utilizado possuía os seguintes tamanhos: 50, 100, 150, 200, 250 (banda mais brilhante), 300, 400 e 500 pares de base (pb). A concentração de 1% de agarose era recomendada no protocolo original, mas uma concentração de 2% foi utilizada ao longo das padronizações do presente trabalho, com base em

1 - <<http://projetoimagine.ufsc.br>>

2 - <<http://projetoimagine.ufsc.br/files/2014/01/REAs-DNA-Final-hiperlinks-PT-VERS%C3%83O-2.0.pdf>>

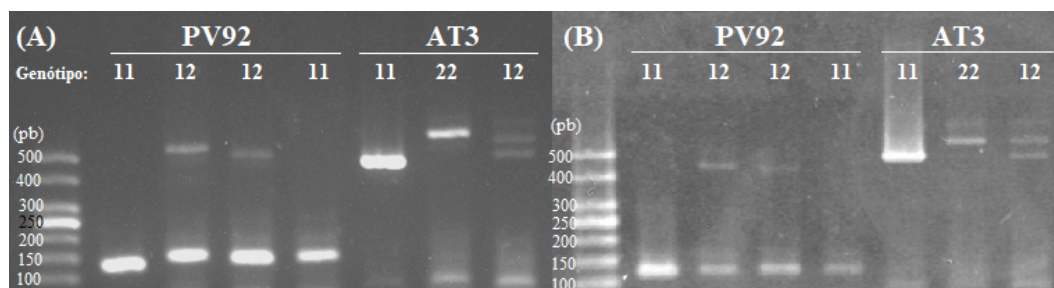
testes preliminares. O TBE 5x, composto por Tris (tris(hidroximetil)aminometano a 445mM), ácido bórico (445mM) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético a 5mM), foi diluído 10 vezes para a solução de trabalho (0,5x). Utilizamos as seguintes condições (teto ou limite máximo de cada parâmetro) para um gel de 10 x 10 cm: 150 V, 300 mA, 100 W por 40 minutos. Para cada amostra aplicada utilizou-se, como protocolo de referência, 2 µL do corante *Safer* (Kasvi) e 10 µL de produto de PCR. No caso do *Ladder*, utilizou-se 1 µL do corante e 5 µL de *Ladder*. O sistema de fotodocumentação móvel utilizado, foi o L-Pix STi da Locus Biotecnologia. A variável testada, a fim otimizar a técnica de eletroforese, foi o tipo e marca do corante intercalante de DNA: *Safer* (Kasvi), *UniSafe Dye* (20,000x) (Uniscience) ou Brometo de Etídio. Os protocolos de extração de DNA humano e reação em cadeia da polimerase (PCR), executadas em passos anteriores à eletroforese, podem ser acessados no site do projeto Imagine³. Em resumo, foram usados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar dois diferentes marcadores do genoma humano, AT3-I/D (rs3138521) e PV92-Alu (rs3138523), cada um deles apresentando dois alelos. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (CAAE: 87772818.2.0000.0121). Os voluntários para doação do material biológico utilizado (células da mucosa bucal) consistiram em discentes e docentes da UFSC que assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Resultados e Discussão

Nas figuras a seguir, utilizaremos a seguinte denominação para identificação dos três diferentes genótipos referentes a cada um dos dois marcadores (AT3-I/D e PV92-Alu): “11” para a presença dos dois alelos de menor peso molecular; “22” para a presença dos dois alelos de maior peso molecular; e “12” para a presença de um alelo de maior e outro de menor peso molecular. O marcador AT3-I/D apresenta o alelo 1 de 496 pb e o alelo 2 de 572 pb. Já o marcador PV92-Alu apresenta o alelo 1 com: ~150 pb e 2 com: ~450 pb.

Ao longo das execuções do protocolo em aulas práticas, percebeu-se que a altura das bandas no gel estavam sofrendo interferência durante a corrida, pois as mesmas não eram encontradas nas posições esperadas em função do seu tamanho conhecido em pares de base, quando comparadas à referência de peso molecular ou *Ladder*. Nossa hipótese foi a de que o corante intercalante de DNA estava interferindo na velocidade de migração das bandas. Por esse motivo, testes foram feitos para comparar a altura de amostras geneticamente idênticas, utilizando o corante *Safer* (Kasvi) e o corante clássico Brometo de Etídio, usado aqui como controle positivo.

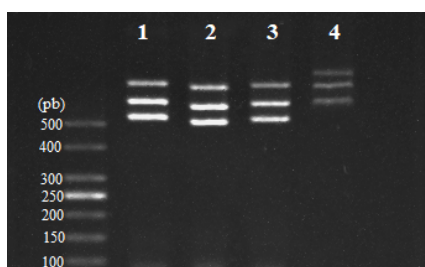
Figura 1 – Teste com dois diferentes corantes: *Safer* (Kasvi) e Brometo de Etídio



Marcadores genéticos utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu. Corantes utilizados: (A) *Safer* (Kasvi) e (B) Brometo de Etídio.

Ao observar a Figura 1, é possível perceber que o corante *Safer* (Kasvi), em algumas ocasiões, foi capaz de alterar a altura das bandas de amostras geneticamente idênticas, o que não aconteceu com o controle positivo (B) Após entrar em contato com a fabricante Kasvi, mostrando os dados obtidos na figura 1, obtivemos a resposta de que estaríamos utilizando quantidades erradas desse corante quando adicionado ao marcador de peso molecular e que isso alteraria a posição correta das bandas de referência. Sendo assim, decidiu-se testar diferentes volumes de produto de PCR e de corante (figura 2). Quatro diferentes proporções de produto PCR : água : corante foram testadas, sendo elas: (1) 5:0:1; (2) 10:0:1; (3) 5:5:1 e (4) 1:9:1. Os valores representam os volumes em microlitros de cada componente da mistura. A amostra de DNA utilizada, produto de PCR de genótipo 12 (AT3-I/D), foi dosada e apresentava 251 ng/µL, portanto, bem mais do que o mínimo indicado pelo fabricante.

Figura 2 – Teste com diferentes volumes e diluições de produto da PCR com corante *Safer* (Kasvi) com marcador AT3-I/D (genótipo 12)

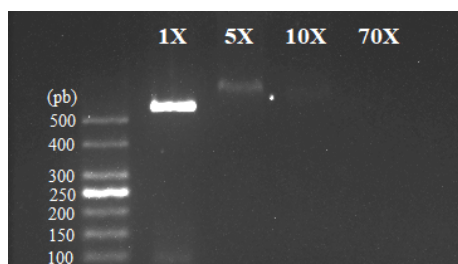


Marcador genético utilizado: AT3-I/D, genótipo 12. Diferentes proporções de produto PCR, água e corante *Safer* (Kasvi) onde (1) 5:0:1; (2) 10:0:1; (3) 5:5:1 (4) 1:9:1. Dosagem da amostra: 251 ng/ μ L.

Apesar de a amostra 1 corresponder exatamente às proporções de DNA/corante indicadas pelo fabricante (isto é, 5 partes de DNA para uma parte de corante), observa-se que ela se apresentou acima dos tamanhos esperados de 496 e 572 pb (além da banda inespecífica mais alta, que deve ser desconsiderada). Já a amostra 2, contendo o dobro de produto PCR em relação ao recomendado, para 1 μ L de corante, apresentou uma altura correta de seus fragmentos. Na amostra 3, o produto de PCR foi diluído e apresentou um desvio das bandas para cima, em relação ao esperado, assim como ocorreu na amostra 1. Em relação à amostra 4, com o produto PCR diluído 10 vezes, é possível perceber um grande desvio para cima na altura dos fragmentos. A partir desses resultados, foi possível concluir que variações na proporção de DNA/corante *Safer* (Kasvi) alteram a velocidade de migração dos fragmentos e que mesmo a proporção recomendada pelo fabricante produz resultados não confiáveis.

Em seguida, diluições de 1, 5, 10 e 70 vezes de produto de PCR foram feitas, a partir de uma amostra previamente dosada com 276 ng/ μ L, para avaliar se a quantidade mínima de DNA recomendada pelo fabricante (20 ng de DNA em 5 μ L de amostra) seria de fato suficiente para a correta genotipagem.

Figura 3 – Teste de corante *Safer* (Kasvi) com diferentes concentrações de produto PCR com marcador AT3-I/D (genótipo 11)



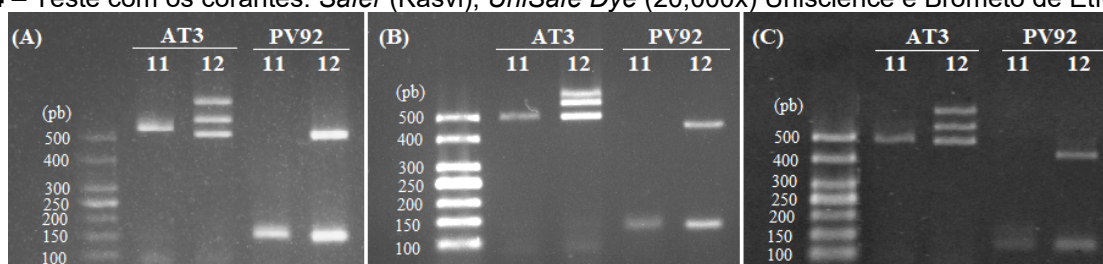
Marcador genético utilizado: AT3-I/D. Diluições: (1X) = 276 ng/ μ L; 5X = 55,2 ng/ μ L; 10X = 27,6 ng/ μ L; 70X = 4 ng/ μ L. Quantidade de corante utilizada: 1 μ L de *Safer* (Kasvi) para 5 μ L de produto PCR.

Na figura 3, é possível ver que as amostras com diluições de 1X e 5X, que deveriam estar próximas à posição de 500 pb, apareceram a aproximadamente 600 e 700 pb, respectivamente. É importante observar que, essas duas amostras respeitaram o limite mínimo de DNA estabelecido pelo fabricante. Já as diluições de 10X e 70X, que também respeitam esse limite mínimo (sendo que a de 70X corresponde exatamente a ele), mostram que o protocolo proposto pelo fabricante do corante *Safer* (Kasvi) não produz resultados confiáveis.

Com as figuras 2 e 3 analisadas conjuntamente, é possível concluir que, conforme aumentamos a proporção de corante para uma igual ou menor quantidade de produto PCR, há um retardo na migração dos fragmentos.

Por esse motivo, procuramos outra opção de corante que propiciasse rapidez na execução sem o uso de substâncias nocivas.

O corante *UniSafe Dye* (20.000x) da marca Uniscience, que propõe a coloração pré-corrída dos próprios géis de agarose (UNISCIENCE, 2015), foi testado. Na figura 4, os resultados de três diferentes corantes são mostrados: (A) *Safer* (Kasvi), (B) *UniSafe Dye* (20,000x) Uniscience e (C) Brometo de Etídio, como controle positivo. No gel com *Unisafe*, utilizou-se, conforme recomendações do fabricante, 5 μ L de corante para cada 100 mL de gel de agarose.

Figura 4 – Teste com os corantes: *Safer* (Kasvi), *UniSafe Dye* (20,000x) Uniscience e Brometo de Etídio

Marcadores genéticos utilizados: AT3-I/D e PV92-Alu. (A) *Safer* (Kasvi); (B) *UniSafe Dye* (20.000x) Uniscience; (C) Brometo de Etídio.

É possível perceber que o corante *Unisafe Dye* (Uniscience) mostrou-se um bom substituto ao corante anteriormente utilizado em nosso protocolo. Ele apresentou um brilho de qualidade superior, não interferindo na migração dos fragmentos e, portanto, não gerando distorção nas alturas das bandas de DNA.

Conclusões

Ao observar que o corante *Safer* (Kasvi) altera a altura de bandas no gel de agarose, muitas vezes de amostras geneticamente idênticas, interferindo na fidelidade da genotipagem, buscou-se uma nova alternativa de corante intercalante de DNA. Como o novo corante, *Unisafe Dye*, que apresenta uma metodologia adequada ao perfil de protocolos do projeto Imagine, apresentou um brilho de qualidade, não interferindo na corrida dos fragmentos e portanto, não gerando distorção nas alturas das bandas, decidiu-se fazer a substituição do corante *Safer* (Kasvi) pelo corante da marca *UniSafe Dye* (20.000x) Uniscience. Com os resultados aqui obtidos, a imediata modificação e atualização dos protocolos será feita, para que eles estejam disponíveis à aplicação direta em comunidades e em sala de aula, bem como no site do Projeto Imagine, para que assim sejam amplamente utilizados para fins de ensino e divulgação científica.

Referências bibliográficas

- ALBERTS, B. et al. Analisando células, moléculas e sistemas. In: **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 463–483.
- MUNIZ, Y. C. N. **Marcadores Genéticos de Ancestralidade em Comunidades Fundadas por Açorianos na Ilha de Santa Catarina**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 30 maio 2008.
- PEREZ-PONS, J. A.; QUEROL, E. A Laboratory Class Experiment Illustrating Basic Principles of DNA Cloning and Molecular Biology Techniques. **Biochemical Education**, v. 24, n. 1, p. 54–56, 1996.
- PROJETO IMAGINE. **Módulo DNA, Diversidade e Hereditariedade**. Disponível em: <<http://projetoimagine.ufsc.br/files/2014/01/REAs-DNA-Final-hiperlinks-PT-VERSÃO-2.0.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2019.
- RAMOS, A.; RAZZERA, G. Funding plea for rural lab outreach. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 198, 2014.
- UNISCIENCE. **UniSafe Dye (20.000x) - Solução para coloração de ácidos nucleicos**®. Disponível em: <http://uniscience.com.br/uploads/arquivos/UniSafe_Dye_UNI_R01031.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2019.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. Técnicas de Biologia Molecular. In: **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.