
Enzimas em biologia molecular. I. Polimerase phi29

Silvana Beres CASTRIGNANO

Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

Existem inúmeras enzimas disponíveis para serem usadas em biologia molecular. O conhecimento do modo de ação de cada uma delas é importante para entendimento de seu uso na prática laboratorial, compreensão de artigos científicos, desenvolvimento de projetos de pesquisa e resolução de impasses que surjam durante experimentos científicos.

Uma das enzimas desse arsenal é a polimerase phi29, objeto deste primeiro artigo. Serão apontadas as características funcionais, aplicações e apresentação no mercado.

A enzima phi29 é uma DNA polimerase codificada pelo bacteriófago phi29 que infecta o *Bacillus subtilis*. *In vivo*, ela é responsável pela síntese do genoma completo do referido bacteriófago¹.

Algumas das características da phi29 são muito interessantes para uso *in vitro*²:

- atividade de DNA polimerase, isto é, incorpora nucleotídeos na direção 5'-para-3', complementar à fita molde, após o anelamento de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*);
- atividade de exonuclease 3'-para-5', ou seja, atividade de revisão (em inglês, *proofreading*), que confere baixa taxa de erro ao DNA amplificado, aproximadamente 10^{-5} a 10^{-6} por nucleotídeo incorporado em cada ciclo;
- não há necessidade de ciclagem da temperatura, ou seja, a amplificação é uma reação isotérmica, e a temperatura ótima é de 30 °C;

- a enzima tem meia-vida longa, que permite reações com duração de muitas horas, podendo levar a produtos com comprimento estimado de 900 kb em 10 horas;
- ser capaz de deslocar as fitas de DNA ao encontrar fita dupla durante a polimerização de DNA, o que leva à possibilidade do uso de múltiplos *primers* para o mesmo molde, conhecida como amplificação de deslocamentos múltiplos (em inglês, *multiple displacement amplification*, MDA) e à atividade de amplificação por círculo rolante (em inglês, *rolling-circle amplification*, RCA), que será descrita a seguir.

Quando a molécula-molde a ser amplificada por phi29 é um DNA linear, a síntese vai até o fim da fita. Quando o molde é um DNA circular, ao alcançar o sítio de ligação do *primer* novamente, a polimerase phi29 desloca a fita recém-sintetizada e continua a síntese de DNA. Isso ocorre por várias vezes, e é conhecida como amplificação por círculo rolante². Quanto menor a extensão do DNA circular, maior o número de cópias possíveis de serem formadas².

A enzima pode ser utilizada com *primers* específicos ou com *primers* randômicos. Devido à atividade de exonuclease 3'-para-5', que pode causar a degradação do DNA, os *primers* devem ser preferencialmente ligados a tiossulfato na extremidade 3' para aumentar a estabilidade².

Na amplificação por círculo rolante, a fita de DNA deslocada também pode ser alvo da phi29 se houver *primers* que se anelem a ela. Neste caso,

os produtos de amplificação serão DNA de fita dupla. Para analisar esse amplificado longo e com sequências repetidas (concatêmeros), geralmente se utiliza enzima de restrição antes da eletroforese em gel de agarose².

A enzima phi29 DNA polimerase tem sido bastante utilizada nos últimos anos na amplificação de genomas de vírus conhecidos e de possíveis novos membros de famílias virais²⁻⁴, em estudos de metagenômica^{5,6} e na análise de transcriptomas a partir de células⁷. Os resultados sugerem maior sucesso de amplificação em genomas circulares ou circularizados^{2,5,7,8}.

No mercado, a enzima phi29 DNA polimerase é comercializada por diversas empresas (p. ex., Applied Biological Materials Inc., Biogen Praha, Biotechrabbit, Lucigen, Molecular Cloning Laboratories, New England BioLabs, Thermo Scientific) e também é possível a aquisição de *kits* que contêm, além dela, outros insumos como tampões de lise, *primers* randômicos, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), ditiotreitol (p. ex., *kits* Illustra GenomiPhi ou Illustra TempliPhi da GE Healthcare; *kits* REPLI-g da Qiagen).

Pretende-se com esta breve apresentação chamar a atenção para as possibilidades de uso da enzima phi29 dentro de um laboratório de biologia molecular, e recomenda-se o aprofundamento do conhecimento sobre ela antes de sua utilização.

REFERÊNCIAS

1. Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem.* 1989; 264(15):8935-40.
2. Johne R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* 2009; 17(5):205-11.
3. Cheung AK, Ng TF, Lager KM, Bayles DO, Alt DP, Delwart EL, Pogranichniy RM, Kehrli ME Jr. A divergent clade of circular single-stranded DNA viruses from pig feces. *Arch Virol.* 2013; 158(10):2157-62.
4. Dela Cruz FN Jr, Giannitti F, Li L, Woods LW, Del Valle L, Delwart E, Pesavento PA. Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, western United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(1): 77-84.
5. Kim KH, Chang HW, Nam YD, Roh SW, Kim MS, Sung Y, Jeon CO, Oh HM, Bae JW. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(19):5975-85.
6. Whon TW, Kim MS, Roh SW, Shin NR, Lee HW, Bae JW. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. *J Virol.* 2012; 86(15):8221-31.
7. Kang Y, McMillan I, Norris MH, Hoang TT. Single prokaryotic cell isolation and total transcript amplification protocol for transcriptomic analysis. *Nat Protoc.* 2015; 10(7):974-84.
8. Sujayanont P, Chininmanu K, Tassaneetrithep B, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Suriyaphol P. Comparison of phi29-based whole genome amplification and whole transcriptome amplification in dengue virus. *J Virol Methods.* 2014; 195:141-7.