

Preparo de DNA para reação de sequenciamento: comparação entre duas técnicas

Silvana Beres CASTRIGNANO¹, Fabiola Lorenzi DERGOVICS², Teresa Keico NAGASSE-SUGAHARA¹

¹Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

²Laboratório de Sequenciamento Genético - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

Após a amplificação de um segmento genômico por reação em cadeia pela polimerase (PCR), há necessidade de purificação do produto caso este DNA siga para reação de sequenciamento, e principalmente, clonagem. Essa purificação tem como objetivo a remoção de oligonucleotídeos não utilizados — *primers*, *primer-dimers* —, excesso de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e DNA polimerase, pois poderiam afetar as reações mencionadas¹.

A purificação do DNA pode ser feita de maneiras diversas, como:

1. utilizando em etapas sequenciais proteinase K, solução de fenol:clorofórmio (1:1, v/v), clorofórmio, solução de acetato de amônio e etanol, e etanol a 70%;
2. utilizando cromatografia, através de *kits* comerciais que purificam os ácidos nucleicos usando as propriedades da sílica;
3. ultrafiltração, utilizando membrana porosa anisotrópica, hidrofílica e não-absorvente, na qual macromoléculas maiores do que os poros da membrana são retidos;
4. separação magnética, através da ligação reversível do DNA com superfícies sólidas magnéticas^{1,2}.

O primeiro método é demorado e trabalhoso e os outros dependem de *kits* ou colunas comerciais^{1,2}.

Na rotina de laboratórios de saúde pública, a purificação antes da reação de sequenciamento, a partir de banda única visualizada em gel de agarose, é geralmente realizada a partir do volume resultante da reação de PCR por meio de *kits* comerciais, que atendem às necessidades de rapidez e facilidade.

Aventando a eventual indisponibilidade destes *kits* comerciais, aqui foi avaliado se a simples precipitação do DNA interferiria na reação de sequenciamento deste produto a ponto de impedir a análise da sequência obtida em sequenciador automático. Neste estudo, o resultado da reação de sequenciamento de duas amostras (U6 e U9) cujo DNA foi precipitado por meio de acetato de sódio e etanol foi comparado com o obtido nestas mesmas amostras purificadas através de *kit* comercial que se vale das propriedades da sílica. As duas amostras de DNA amplificado tinham banda única visível no gel de agarose, com mesmo número de pares de base nucleotídicas (pb) e diferente massa.

Os produtos de amplificação utilizados, de 419 pb, resultaram de duas amplificações sequenciais, a segunda feita em quadruplicata, e do produto obtido foi feito um *pool*. Após a verificação do produto de cada um dos *pools* em gel de agarose (Fig. 1A), o volume foi acertado para 200 µl e dividido em duas alíquotas iguais. Uma das alíquotas de cada amostra (U6/*Kit* e U9/*Kit*) foi purificada com *kit* High Pure PCR Product Purification (Roche) seguindo as instruções do fabricante³. A outra alíquota de cada amostra (U6/Et e U9/Et) foi purificada conforme protocolo publicado¹ com algumas modificações, como segue: a 100 µl do produto foram acrescentados 10 µl de acetato de sódio (3M, pH5,2) e em seguida 250 µl de etanol absoluto gelado (proporção 25:1 de [etanol absoluto]:[acetato de sódio 3M]). Seguiu-se incubação por 15 min/temperatura ambiente e centrifugação por 20 min/18400 g/4 °C. O sobrenadante foi retirado e a seguir foram adicionados 300 µl de etanol 70 % gelado. Procedeu-se a nova centrifugação por 10

min/18400 g/4 °C. Após remoção do sobrenadante, o *pellet* foi seco por aproximadamente 5 min/60 °C e em seguida foi ressuspensão em 50 µl de água ultrapura livre de DNases e RNases. Após análise do produto em gel de agarose (Fig. 1B), foram feitas reações de sequenciamento das amostras com *primers* senso e antissenso e *kit* BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing⁴, com volume final de 10 µl. Procurou-se deixar as quatro reações das amostras U6 com quantidades semelhantes de DNA entre si, estimadas em 20 ng de DNA em comparação com o padrão de massa (Fig. 1B), e as quatro reações das amostras U9 com quantidades semelhantes de DNA entre si, estimadas em 9 ng de DNA. A precipitação pós-sequenciamento foi feita de forma igual para todos os produtos, utilizando acetato de sódio e etanol, mantendo as mesmas razões descritas acima. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied

Biosystems).

Comparando-se visualmente as bandas de DNA de U6 foi possível perceber que U6/Et parece ter maior massa na banda de 419 pb quando comparado a U6/*Kit* (Fig. 1B). No caso da amostra U9 não parece haver diferença em relação à massa de DNA das duas bandas de 419 pb, mas é perceptível que a banda abaixo de 100 pb, provavelmente de *primer-dimers*, que era visível na Fig. 1A, permanece de forma nítida em U9/Et, mas não em U9/*Kit* (Fig. 1B). Também pode ser notado que antes da purificação/precipitação havia um arrasto próximo às bandas de 419 pb (Fig. 1A), e após a precipitação e purificação outras bandas espúrias bem fracas ficaram visíveis (Fig. 1B). Este fato provavelmente deve-se não à purificação ou à precipitação, mas sim à maior precisão na separação das bandas no segundo gel devido à espessura do pente usado para fazer os poços (1,5 mm e 0,8 mm na preparação do gel da Fig. 1A e 1B respectivamente). A

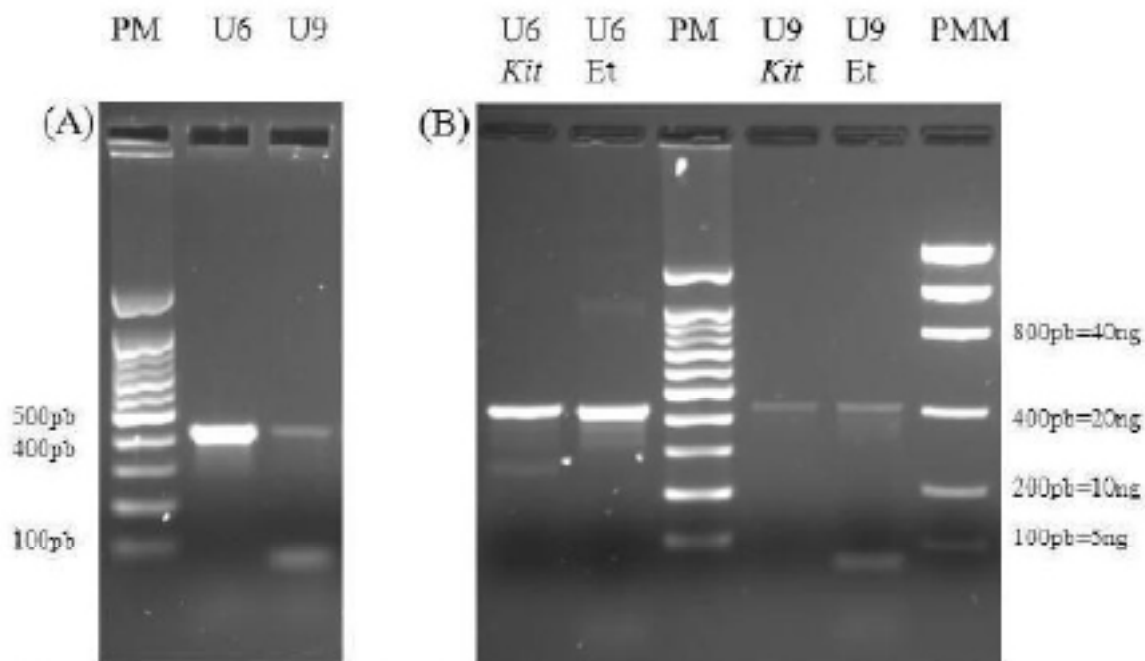


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (1,3 %, 80 V) das amostras U6 e U9.

- (A) Amostra após a amplificação por PCR e antes da purificação/precipitação; volume de amostra/poço: 8 µl. Cuba de eletroforese Wide Mini-Sub Cell GT (BioRad);
 (B) Amostras depois da purificação ou precipitação; ; volume de amostra/poço: 3 µl. Cuba de eletroforese Horizon 58 (Life Technologies).
 PM = padrão de peso molecular (100 pb DNA Marker, Bioron);
 PMM = padrão de peso molecular e massa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen);
 Et = precipitado com etanol;
 Kit = purificada com Kit High Pure PCR Product Purification (Roche).

análise do sequenciamento, utilizando parâmetros de qualidade dos cromatogramas pelo programa SeqMan do pacote Lasergene (DNASTAR Inc.), mostrou que as amostras U6, sequenciadas com o *primer* senso e o antissenso tiveram qualidade semelhante; no entanto, ficou visível no cromatograma linha de base suja das sequências advindas das amostras precipitadas, o que não aconteceu com as amostras purificadas. Aparando os cromatogramas com alto rigor de qualidade (SeqMan), foi possível construir uma sequência contígua (contig) de 406 e 398 nucleotídeos (nt) para as amostras U6/*Kit* e U6/*Et* respectivamente. Quando foram aparadas as sequências U9 exigindo alto rigor de qualidade, o programa SeqMan manteve as sequências U9/*Kit* e gerou a partir delas um contig de 399 nt, mas eliminou todas as sequências de U9/*Et*. Com a diminuição do rigor de corte por qualidade do cromatograma nas sequências U9/*Et*, o programa SeqMan mostrou que as duas sequências U9/*Et* cobriram 383 dos 399 nt do contig gerado pela amostra U9/*Kit*, com somente 3 nt de diferença entre elas. A inspeção visual do cromatograma das sequências U9/*Et* mostra picos mais baixos em relação a U9/*Kit*, dado que está de acordo com os sinais dos nucleotídeos dessas sequências avaliados pelo programa EditSeq do pacote Lasergene.

Conclui-se que, na falta de *kit* de purificação de DNA, os resultados encontrados sugerem que a precipitação do DNA possa ser usada antes de reação de sequenciamento, principalmente se houver disponibilidade de quantidade alta de massa de DNA.

REFERÊNCIAS

1. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning - a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
2. Dhaliwal A. DNA extraction and purification. *Mater Methods*. 2013; 3:191. [acesso em: 2015 fevereiro 17]. Disponível em: [<http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.191>].
3. Roche. High Pure PCR Product Purification. Instructions for use. Versão 16, dezembro de 2010. [acesso em: 2015 fevereiro 17]. Disponível em: [<http://lifescience.roche.com/shop/Instructions4Use?catalogNumber=11732676001>].
4. Applied Biosystems. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Protocol. Rev. B, junho de 2010. [acesso em: 2015 fevereiro 17]. Disponível em: [<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4337455>].