

Mestrado em Genética Molecular

***Ano lectivo de 2000/2001, edição 2000-2002
Biologia Molecular – Expressão génica (RT-PCR)***

Protocolo das sessões práticas

**Braga, 2000
Rui Pedro Soares de Oliveira**

Mestrado em Genética Molecular
Ano lectivo de 2000/2001, edição 2000-2002
Biologia Molecular – Expressão génica (RT-PCR)

Protocolo das sessões práticas

A técnica de RT-PCR combina a síntese de cDNA com a amplificação *in vitro* por PCR, possibilitando a clonagem de genes a partir dos respectivos mRNAs e análise de expressão genética. A síntese de DNA é feita com uma transcriptase reversa que actua em RNA total ou numa fracção enriquecida de RNA poliadenilado. A reacção de PCR é feita com uma polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA da reacção anterior. Para a actuação de cada uma destas enzimas, é necessária a presença de iniciadores de síntese (“primers”) cuja sequência vai condicionar a especificidade do fragmento amplificado. Na reacção da transcriptase reversa podem ser usados “primers” específicos para o gene em análise, oligo(dT) ou, então, oligonucleótidos de constituição aleatória. Independentemente do tipo de “primers” usados na primeira reacção, no PCR subsequente são sempre usados “primers” específicos para o gene em análise.

Dado o carácter exponencial da reacção de PCR, a sensibilidade desta técnica é consideravelmente maior do que outras técnicas de análise de expressão genética (“Northern” e ensaio de protecção de ribonucleases), requerendo quantidades menores de RNA para análise. Por outro lado, a contaminação do RNA por quantidades ínfimas de DNA genómico leva a falsos positivos ou à impossibilidade de distinção da amplificação obtida a partir de cDNA ou de DNA genómico. Adicionalmente, as duas reacções que constituem o RT-PCR, são reacções enzimáticas que dependem do emparelhamento de “primers”, sendo a sua eficiência fortemente dependente de condições ambientais como a temperatura, pH e força iónica. Por isso, deve-se fazer um cuidadoso planeamento das reacções, que deve passar pela selecção de um método apropriado de extracção e purificação de RNA, escolha correcta das enzimas a utilizar, “design” dos “primers”, temperatura de actuação da transcriptase reversa e programa de PCR.

As duas reacções podem ser executadas num só tubo (“one-step RT-PCR”) com mistura de todos os componentes necessários às duas reacções ou, então, em dois passos (“two-step RT-PCR”) em que as duas reacções são feitas em tubos separados, sendo o passo de PCR executado numa alíquota do cDNA obtido na primeira reacção. No primeiro caso há a vantagem do menor número de manipulações com menor probabilidade de contaminações pois o tubo não é aberto entre a síntese de cDNA e a amplificação e dum maior sensibilidade porque a amplificação é feita em todo o cDNA sintetizado. No RT-PCR em dois passos há maior possibilidade de manipulação das reacções para optimização e possibilidade de executar PCR multiplex com amplificação de mais de um amplicon.

Pelas suas características, o RT-PCR é aplicado para a clonagem de genes por homologia em que se emprega apenas um “primer” específico, sendo o outro constituinte do par um oligo(dT). Na detecção de vírus de RNA em amostras clínicas bem como no estudo de expressão genética em células provenientes de biopsias uma vez que constituem amostras com pouco material biológico. A combinação do RT-PCR com a tecnologia de PCR competitivo, possibilita a quantificação do número de moléculas molde iniciais que podem ser por exemplo vírus de RNA ou mRNAs específicos.

Para uma abordagem quantitativa com RT-PCR, há a considerar a possibilidade de ocorrência de diferenças de eficiência na actividade das enzimas usadas, transcriptase reversa e DNA polimerase. Quanto ao passo de síntese de cDNA, usa-se um padrão interno em vez de se recorrer à adição de DNA em quantidades determinadas para o passo de PCR. Deste modo, compensa-se a variabilidade inerente da transcriptase reversa dependente da amostra pois o padrão interno consiste em RNA da própria amostra, sendo sujeito às mesmas reacções nas mesmas condições do gene em análise. Estes padrões internos de RNA são mRNAs de genes (β -actina, gliceraldeído-3P-desidrogenase) cuja expressão é constante independentemente do tecido ou órgão, num organismo pluricelular, ou das condições de crescimento, em microrganismos. As subunidades ribossomais 18S e 28S de rRNA são também

usadas como padrões internos, partilhando a mesma característica fundamental, já referida, destes padrões.

Protocolo

Extracção de RNA

Seguir a adaptação para levedura do protocolo do *kit* de extracção de RNA “SV Total RNA Isolation System” da Promega.

Analisar o RNA obtido por espectrofotometria a 260nm e 280nm e por electroforese em gel de agarose com formaldeído.

Calcular o grau de pureza através da relação A_{260}/A_{280} , considerando o RNA puro se estiver compreendida entre 1,8 e 2,2. Calcular a concentração do RNA sabendo que 1Unid. de $A_{260} \Leftrightarrow 40\mu\text{g/ml}$ de RNA.

Electroforese de RNA em gel de agarose com formaldeído

Manipular com as mesmas precauções tomadas para o isolamento do RNA para evitar contaminações com Rnases. Usar material e soluções de electroforese previamente descontaminados de acordo com os procedimentos habituais.

1. Misturar 0,5g de agarose com 36ml de água ultra-pura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e fundir em microondas.
2. Deixar arrefecer até $\sim 60^\circ\text{C}$ e adicionar 5ml de MOPS 10x e 9ml de formaldeído

O formaldeído é tóxico, podendo ser absorvido pela pele e por inalação de vapores: usar luvas e manipular numa zona ventilada

3. Após homogeneização, verter para o tabuleiro de electroforese com o pente e deixar arrefecer.
4. Para cada amostra, misturar num microtubo de 1,5ml (preparar em paralelo uma amostra de padrão de pesos moleculares de RNA):

Componente	Quantidade
MOPS 10x	1,7 μl
Formaldeído	3 μl
Formamida	8,3 μl
RNA	5 μl
Brometo de etídeo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,7 μl

A formamida é teratogénica: manipular com luvas. O brometo de etídeo é mutagénico e é considerado potencial carcinogénico. Trabalhar com o máximo de cuidado com luvas.

5. Desnaturar o RNA a 68°C durante 10min e colocar em gelo.
6. Adicionar 3,3 μl de tampão de amostra com formaldeído.
7. Colocar o gel solidificado na tina de electroforese, adicionar o tampão MOPS 1x até $\sim 1\text{mm}$ acima do gel e aplicar as amostras.

8. Ligar a corrente eléctrica para uma intensidade de campo eléctrico de 5V/cm.
9. Após migração do corante de cerca de 3/4 do comprimento do gel, desligar a corrente eléctrica, observar o gel sob radiação ultravioleta e fotografar.

A luz ultravioleta é nociva para os olhos e pele exposta. Deve-se sempre usar óculos protectores e evitar expôr a pele à radiação directa.

MOPS 10x [ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico]

MOPS 0,4M, pH7,0
 Acetato de sódio 0,1M
 EDTA 0,01M

Tampão de amostra com formaldeído

EDTA 1mM, pH8,0
 Azul de bromofenol 0,25%(p/v)
 Xileno de cianol 0,25%(p/v)
 Glicerol 50%(p/v)

Síntese de cDNA

1. Num tubo de 500µl fazer a seguinte mistura:

Componente	Quantidade
Hexanucleótidos aleatórios	1µl
RNA	100ng
DEPC-H ₂ O	q.b.p. 10µl

2. Incubar a 65°C durante 5min e, posteriormente, colocar no gelo.
3. Preparar a mistura de reacção de acordo com o número de reacções a fazer e agitar suavemente em vortex:

Componente	Quantidade / 1 reacção
5x cDNA Synthesis Buffer*	4µl
DTT 0,1M	1µl
DEPC-H ₂ O	1µl
dNTP Mix 10mM	2µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1µl
ThermoScript RT (15 U/µl)	1µl

*agitar 5s em vortex antes de utilizar

4. Pipetar 10µl da mistura de reacção para cada tubo de reacção em gelo e misturar com pipetagens sucessivas.
5. Transferir os tubos para o aparelho de PCR pré-aquecido à temperatura apropriada para a síntese de cDNA e incubar com o seguinte programa: 25°C, 10min → 50°C, 50min → 85°C, 5min.
6. Adicionar 1µl de RNase H e incubar a 37°C durante 20min.
7. Guardar o cDNA a -20°C.

PCR

1. Num microtubo de 1,5ml em gelo, preparar a seguinte mistura de reacção de PCR (“master mix”):

Componente	Quantidade / 1 reacção
Tampão de PCR (s/ Mg) 10x	5µl
MgCl ₂ 50mM	1,5µl
dNTP Mix 10mM	1µl
Primer 1 10µM	1µl
Primer 2 10µM	1µl
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,4µl
Água ultra-pura	34,1µl

Adaptar as quantidades para o número de reacções a executar, adicionando um excesso de 10% para precaver erros de pipetagem. Misturar com a micropipeta, pipetando várias vezes suavemente.

2. Num microtubo de 0,2ml misturar, em gelo:

Componente	Quantidade
Padrão interno (2primer pair/8competimer)	4µl
cDNA	2µl

3. Transferir 44µl da “master mix” para o microtubo de 0,2µl e misturar pipetando várias vezes com a micropipeta suavemente.
4. Ligar o aparelho de PCR e iniciar o programa de amplificação. Transferir os microtubos preparados em 3 para o bloco de aquecimento do aparelho somente quando a temperatura estiver a 94°C. Fechar a tampa e ajustá-la para contactar com a tampa dos microtubos.
5. Programa de PCR:



6. Analisar 10µl da mistura de PCR por electroforese em gel de agarose 1,5%.