

Brasília, D F  
Dezembro, 2003

### Autores

**Graziella S. Figueiredo**  
Biologia graduanda – UniCEUB,  
RHAECNPq.

**Ana Cláudia M. Reis**  
Biologia graduanda - FTB,  
RHAECNPq.

**Adauto Silva Castro**  
Assistente de Operações I,  
Embrapa Recursos Genéticos  
e Biotecnologia, Farmácia  
graduando - UnB;

**Tula Beck Bisol**  
Química, Assistente de  
Operações I, Embrapa  
Recursos Genéticos e  
Biotecnologia,

**Carlos Rodrigues  
Borges Neto**

Eng. Agr., Dr. Produção Vegetal  
– Técnico de Nível Superior  
III, Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

# Reação de Sequenciamento de DNA e Purificação - Protocolos Otimizados

## Introdução

Uma das etapas mais onerosas do serviço de seqüenciamento de DNA é a própria reação de seqüenciamento. Esta reação é similar a uma reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém, de forma diferente da reação de PCR, apenas um primer é utilizado para síntese das fitas, no deqüenciamento de DNA.

São adicionados na reação de seqüenciamento: um tampão "Save Money", (que é usado para manter o pH da solução e ajustar a concentração de  $MgCl_2$ , e como o próprio nome sugere, substitui parte dos Kits comerciais de seqüenciamento que tem alto custo no mercado aproximadamente US\$ 2.000,00 é o valor de um Kit para 1.000 reações. Os fragmentos de DNA a serem amplificados, um iniciador ("primer") sentido 5'-3' (forward) ou 3'-5' (reverse), e um kit contendo nucleotídeos livres (dntp's), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddntp's), e a enzima Taq polimerase.

Durante a reação, o "primer" liga-se à seqüência complementar e os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleotídeos livres não marcados, quanto a dos nucleotídeos marcados com fluorescência. Estes nucleotídeos são chamados de nucleotídeos de terminação, por que, cada vez que um nucleotídeo de terminação é incorporado, a leitura da fita molde é interrompida, gerando um fragmento de tamanho respectivo ao local onde o nucleotídeo de terminação foi incorporado. No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes e também há sobra de "primers", ddntps, alguns sais entre outros resquícios. A purificação do DNA amplificado visa eliminar tais resíduos aumentando a qualidade das seqüências produzidas. Tais fragmentos são submetidos à eletroforese, após a purificação, e lidos por um feixe de laser no seqüenciador automático de DNA.

Um dos fatores que torna o serviço de seqüenciamento em larga escala bastante oneroso é o preço dos reagentes. Atualmente, um dos kits de reação de seqüenciamento mais utilizado é o "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" com

8mL, que custa US\$ 2000,00.

Neste trabalho, foram avaliados dois aspectos: o efeito da redução da concentração do kit “Big Dye Terminator” na reação de seqüenciamento e o impacto final desta redução na qualidade das seqüências e na redução dos custos.

## Materiais e Métodos

Os trabalhos iniciais foram realizados utilizando-se 2uL de BigDye num volume total de reação de 10uL. Então, montou-se a reação em uma placa de PCR, nas seguintes proporções: 2uL de DNA, 3uL de água milliQ, 2uL de tampão Save Money, 1uL de primer 3,2 mM e 2uL de BigDye.

Posteriormente, testou-se uma diluição do BigDye, utilizando-se então 1uL por reação. As proporções utilizadas foram: 2uL de DNA, 3uL de água milliQ, 3uL de Save Money, 1uL de primer e 1uL de BigDye, totalizando um volume final de 10uL.

Após a reação em cadeia da polimerase, as placas (PCR – Optical 96 well reaction plate number N - 801 – 0560) são retiradas dos termocicladores, recebem isopropanol na concentração de 65%. São seladas com adesivo resistente a álcool (Adhesive PCR Film N – 21950), misturadas por inversão durante três vezes, a seguir permanecem ao abrigo da luz em temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente são centrifugadas por 45 minutos a 3400rpm. O excesso de isopropanol é descartado e as placas são invertidas em papel toalha. Acrescenta-se etanol 60% e centrifuga-se à mesma velocidade por 10 minutos. Descarta-se novamente o excesso de etanol e invertem-se as placas sobre o papel toalha, repetindo-se este processo por mais uma vez. Para secar, as

placas são submetidas a um “spin” até 300rpm com as placas invertidas sobre o papel toalha e posteriormente encaminha-se para estufa a 37° C durante 15 minutos. Após secas, as placas recebem 10mL de formamida e são encaminhadas para o termociclador para a reação desnaturação. Após essa etapa, as placas são encaminhadas para o Sequenciador Automático de DNA, modelo ABI 3700 Prism Analyzer.

## Resultados e Discussão

O seqüenciamento automático permite que amostras sejam seqüenciadas em larga escala. Em nosso Laboratório, são seqüenciadas 1.152 amostras diariamente, 5.760 amostras semanalmente. A purificação, embora indispensável para preservação dos capilares do Sequenciador Automático de DNA e para garantir a qualidade das seqüências produzidas, é um procedimento muito barato custando apenas 2% do valor total de uma placa seqüenciada.

Utilizando-se 2uL de BigDye por reação, os resultados obtidos foram: num total de 53.568 seqüências obtidas, 43.872 (81,90%) foram seqüências válidas (phred 20, mínimo de 250 bases). Utilizando-se 2uL por reação, é possível realizar 4.000 reações com um kit, a um custo de US\$ 0,50 por reação.

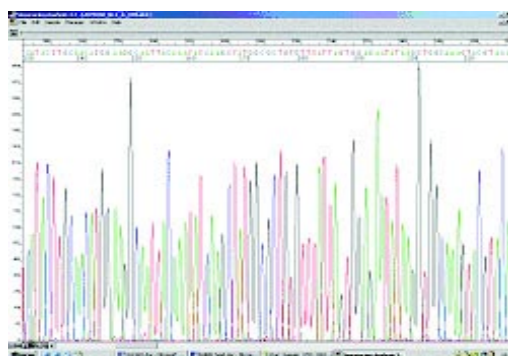
No teste com 1uL de BigDye por reação, os resultados foram: num total de 125.664 seqüências obtidas, 100.279 (79,80%) foram seqüências válidas (phred 20, mínimo de 250 bases). Utilizando-se 1uL por reação, a economia no gasto do BigDye foi de 50%, resultando um gasto de US\$ 0,25 por reação. Um kit passou a ser suficiente para 8.000 reações. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 1.

Comparando-se os resultados obtidos utilizando-se 1uL de BigDye com os resultados obtidos utilizando-se 2uL de BigDye, conclui-se que o gasto diminuiu em 50%, enquanto que a qualidade das seqüências válidas teve uma variação de apenas 2,1% , plenamente aceitável para o tipo de serviço executado.

As Figuras 1 e 2 mostram eletroferogramas de amostras seqüenciadas após reação utilizando 1uL e 2uL de BigDye respectivamente. Analisando-se os dois eletroferogramas, observa-se que a qualidade obtida nas duas amostras é muito semelhante, padrão que foi observado de forma geral nos testes realizados.



**Figura 1:** Eletroferograma obtido com utilização de 1uL do Kit BigDye Terminator.



**Figura 2:** Eletroferograma obtido com utilização de 2uL do Kit BigDye Terminator.

**Tabela 1:** Seqüências válidas produzidas e respectivas economia (em dólares norte-americanos) na utilização do Kit BigDye Terminator

	Seqüências Válidas (%)	Custo/reação (US\$)	Economia/reação (US\$)	Economia/placa (US\$)	Reações/kit BigDye
2uL	81,9	0,50	-	-	4000
1uL	79,8	0,25	0,25	24	8000

## Conclusão

Pode-se concluir que a diluição do BigDye de 2uL para 1uL é economicamente vantajosa para serviços de seqüenciamento de DNA em larga escala, por que gera uma economia de 50% no gasto de BigDye por reação, o que resulta em uma economia de US\$ 24,00 por placa formato 96 poços. Além disso, do ponto de vista dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a diferença entre a qualidade das seqüências utilizando-se ambos os volumes é desprezível.

## Bibliografia Recomendada

EMBRAPA. Plataforma de Sequenciamento de DNA. "Sequenciamento de DNA utilizando o Seqüenciador ABI Prism 3700". Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/composicao.html>; acesso em: 20/11/03.

FIOCRUZ. Pós Graduação em Ciências da Saúde. *Técnicas Básicas de Biologia Molecular*. Disponível em: < <http://www.cpqrr.fiocruz.br/ensino/> > acesso em: 23/11/03.

LABORATÓRIO GENESIS. *Sequenciamento de DNA*. Disponível em: < <http://educacao.genesisdbm.com.br/sequenciamento.shtml> > acesso em: 18/10/03.

NASCIMENTO, A. A.C. ;ESPERAFICO, E. M. ; LARSON, M. L. P. MONESI, N.; ROSSI, N.M.M.; RODRIGUES, V. *Tecnologia do DNA Recombinante*. Universidade de São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 84p. 1999.

PUCPR. *Manipulação do DNA Tecnologia do DNA Recombinante*. Disponível em: < <http://www.pucpr.br/educacao/academico/paginaspessoais/professores/mira/bbasica/manipdna.html> > acesso em: 5/11/03.

### Circular Técnica , 22

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -  
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2003): 150 unidades

### Comitê de publicações

**Presidente:** Luzemar Alves Duprat  
**Secretário-Executivo:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Membros:** Maurício Machaim Franco  
Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
Luciano Lourenço Nass

### Expediente

Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares Campos Carneiro  
**Supervisor editorial:** Maria José de Oliveira Duarte  
**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi  
**Editoração eletrônica:** Giscard Matos de Queiroz