

# SISTEMÁTICA DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA ESTUDOS VIA ESPECTROSCOPIA RAMAN

**Bianca Fogazza Palma<sup>1</sup>, Amanda Borges Ferrari<sup>2</sup>, Renata Andrade Bitar<sup>1</sup>, Maria Angélica Gargione Cardoso<sup>2</sup>, Airton A. Martin<sup>1</sup>, Herculano da Silva Martinho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LEVB - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, bianca\_palma@hotmail.com, rabc@univap.br, amartin@univap.br, hmartinho@univap.br

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia, amdFerrari@yahoo.com.br, magcard@univap.br

**Resumo-** O estudo do DNA possibilita entender as mudanças bioquímicas que acompanham as doenças, como o câncer, favorecendo assim o desenvolvimento de abordagens preventivas precoces e tratamentos individualizados e mais eficazes. A espectroscopia Raman pode ser uma importante ferramenta no estudo do DNA, pois possibilita verificar as vibrações moleculares do material genético, mas existe a necessidade de que o DNA extraído esteja extremamente purificado. Este trabalho visa estabelecer uma sistemática adequada para extração de DNA em concentrações adequadas para seu estudo por espectroscopia Raman.

**Palavras-chave:** DNA, Espectroscopia Raman, Câncer.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica.

## Introdução

Todos os estados patológicos são acompanhados por alterações bioquímicas que podem, a princípio, ser detectadas por técnicas de espectroscopia óptica tais como Raman, FTIR, fluorescência, etc. Dentre estas, a espectroscopia Raman se destaca por permitir análises sem a necessidade de preparo prévio das amostras, de modo minimamente invasivo e em tempo real (HANLON et al., 2000). A aplicação destas técnicas para o diagnóstico de doenças, o que se convencionou chamar de Biópsia Óptica, tem apresentado inúmeros avanços recentemente (NAUMANN, 2005), principalmente no estudo de neoplasias. Dentre os fatores que caracterizam o estado neoplásico, deve-se destacar o papel preponderante das alterações gênicas. Logo, é natural indagar-se sobre a contribuição destas alterações ao espectro Raman característico de um tecido. Para tanto, é fundamental o conhecimento do espectro isolado dos constituintes bioquímicos nucleares, DNA e RNA, para posterior comparação entre os estados normal e alterado.

Dentro deste contexto, apresentamos neste trabalho um estudo envolvendo a obtenção de uma metodologia de extração de DNA, a partir de tecidos humanos, que seja mais adequada para fins de uso em experimentos via espectroscopia Raman. Por mais adequada queremos significar uma metodologia que forneça maior rendimento, menor concentração de interferentes, e garantia de integridade da cadeia da biomolécula.

## Materiais e Métodos

Foram testadas três diferentes metodologias de extração e purificação de DNA, sendo estas amplamente conhecidas e utilizadas em pesquisas e protocolos de finalidade diagnóstica. Utilizou-se a extração por centrifugação (*Kit Dneasy Tissue* da Qiagen), por beads magnéticos (*ChargeSwitch gDNA Mini Tissue Kit* da Invitrogen) e o método Fenol-Clorofórmio (Fe-Cl) (SAMBROOK et al., 2001).

O DNA foi extraído de mama humano acometido por carcinoma ductal infiltrante sem tipo específico (CDI-NOS) de 3 diferentes pacientes. Os tecidos foram armazenados em tubos criogênicos Nalgene® em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento do experimento para a conservação de suas estruturas. Os três tecidos foram macerados conjuntamente para fornecer uma massa maior para os procedimentos de extração. Após a maceração, a amostra foi dividida em três partes iguais de 25 mg, sendo que cada parte foi utilizada para um procedimento de extração com o tempo de incubação de 3 horas.

A qualidade e a concentração das soluções de DNA extraídas foram avaliadas por meio de três técnicas: espectrofotometria de absorção no ultravioleta (EUV), eletroforese em gel de agarose a 1% (EGA) e espectroscopia Raman (ER).

A EUV pode ser utilizada para caracterização qualitativa e quantitativa de biomoléculas, em particular, de ácidos nucleicos. Estes possuem uma banda de absorção muito intensa e característica em 260 nm (LEHNINGER et al., 2004). Para tanto foi utilizado o espectrômetro

NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) que é capaz de medir volumes pequenos como 2 µL de solução, sem a necessidade de cubetas ou outros porta-amostras, e fornecer a concentração da amostra, bem como sua pureza.

A razão entre 260/280 nm é utilizada para estimar a pureza das amostras de DNA e também de RNA. Uma amostra de DNA considerada pura apresenta razão entre 1.8 e 2.0. Se esta razão for menor do que estes valores possivelmente há contaminação com proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em 280 nm. (LEHNINGER et al., 2004).

Para a EGA foram aliqüotadas 5 µL e 1 µL, respectivamente das amostras de DNA extraído. Adicionou-se para cada amostra 1 µL de 10X Blue Juice (Invitrogen™), para acompanhamento da corrida das amostras no gel. O gel de agarose a 1% foi adicionado de brometo de etídio (Amresco) e a corrida foi feita em tampão TBE (Invitrogen™) a 150 Volts por 45 minutos. A imagem digital foi capturada sob luz ultravioleta, em um transluminador da Bio-Imaging Systems.

As medidas de ER foram realizadas no espectrômetro FT-Raman modelo RFS-100, onde foram testados dois tipos diferentes de porta-amostra: tubo capilar para micro-hematócrito sem heparina (Mícron Glassâ) e célula de longo caminho óptico (Bruker). A célula tem a propriedade de amplificar o sinal Raman de líquidos cerca de 10 vezes. Todas as medidas apresentadas foram feitas com 2000 scans e 250 mW de potência do laser na amostra.

## Resultados

Na Figura 1 são apresentadas as curvas EUV para DNA extraído com os métodos de extração Qiagen, Invitrogen e Fe-Cl. O sinal da solução proveniente do método Fe-Cl foi consideravelmente (da ordem de 2000 vezes) mais intenso do que os outros, o que pode indicar alta concentração de DNA e/ou contaminantes.

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações obtidas para todos os métodos de extração. Pode-se observar que o método Qiagen forneceu a solução mais diluída com 15,61 ng/µL. Porém, o DNA extraído por este método apresentou a maior pureza, com a razão 260/280 sendo 2,08. O método Invitrogen forneceu solução com 42,24 ng/µL e razão 260/280 igual a 1,84 enquanto que o método Fe-Cl forneceu a concentração mais alta de 166,50 ng/µL, porém com razão 260/280 igual a 1,91.

A Figura 2 apresenta uma comparação entre os espectros de absorção para os meios de eluição prescritos nos vários protocolos de extração e também para o padrão de 1kb ladder.

A Figura 3 mostra a EGA do produto da extração de DNA a partir de diferentes metodologias, todos com 3 horas de incubação.

Para a caracterização das amostras de DNA por ER, foi necessário primeiramente estabelecer qual o nível do sinal dos porta-amostras e dos solventes de eluição.

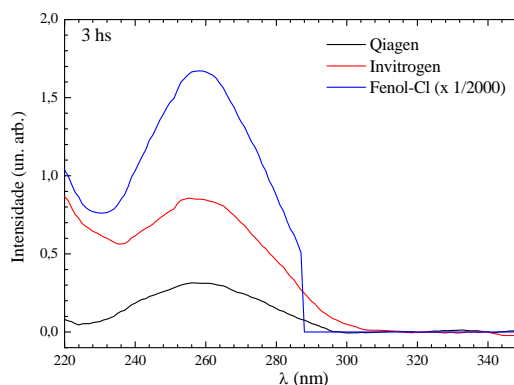


Figura 1. Curvas de absorção no UV para DNA extraído com os métodos de extração Qiagen, Invitrogen e Fe-Cl com tempo de digestão de 3 hs.

Tabela 1- Concentrações obtidas com o Nanodrop para as soluções de DNA extraído e razão 260/280.

Método	Concentração (ng/µL)	Razão (260/280)
Qiagen	15,61	2,08
Invitrogen	42,24	1,84
Fenol	166,50	1,91

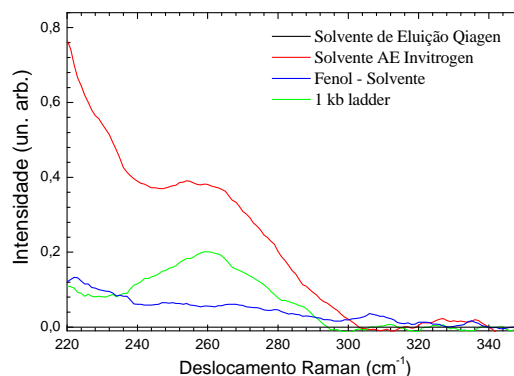


Figura 2- Comparação entre os espectros de absorção no UV para os diferentes meios de eluição do DNA.

Na Figura 4 são apresentados os espectros comparativos entre o sinal do capilar e a célula de longo caminho óptico com janela de Quartzo e com a janela de CaF<sub>2</sub>. As bandas finas em 1550 cm<sup>-1</sup> e 2350 cm<sup>-1</sup> observadas na célula de longo caminho óptico são bandas do ar.

Na Figura 5 apresenta-se uma comparação entre os espectros Raman dos líquidos de eluição preconizados pelos protocolos Fe-Cl, Qiagen e Invitrogen. Percebe-se que todos estes

apresentam um conjunto de bandas que se estende por todo o espectro até  $3500\text{ cm}^{-1}$ .

Na Figura 6 é apresentado outro gráfico comparativo, no intuito de testar o poder de amplificação da célula de longo caminho óptico. Foram comparados os sinais de amostra de DNA extraída pelo método de Qiagen eluída em água quando medidos no capilar e na célula. No gráfico o espectro obtido com o capilar está amplificado 10 vezes.

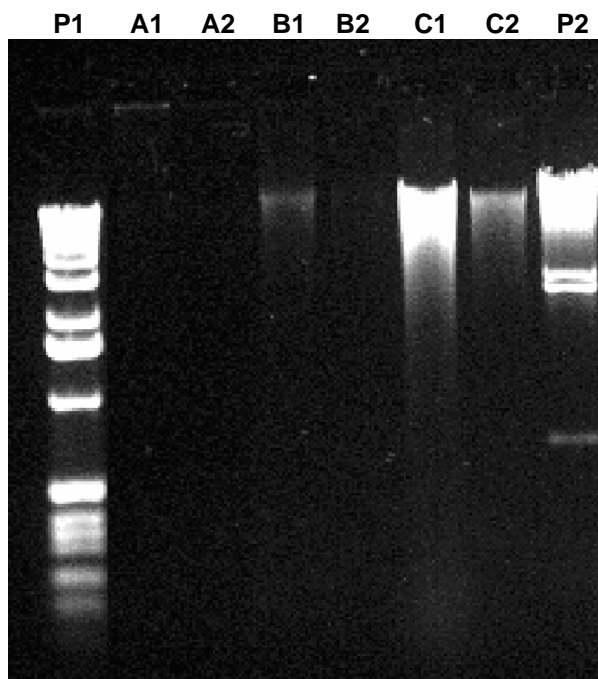


Figura 3- EGA com brometo de etídio do produto da extração de DNA de tecido tumoral de mama. P1:  $2\ \mu\text{L}$  do Padrão 1Kb DNA Ladder; A1:  $5\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Qiagen; A2:  $1\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Qiagen; B1:  $5\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Invitrogen; B2:  $1\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Invitrogen; C1:  $5\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Fe-Cl; C2:  $1\ \mu\text{L}$  da amostra extraída pelo método Fe-Cl e P2:  $2\ \mu\text{L}$  da amostra padrão I Hind III Fragments.

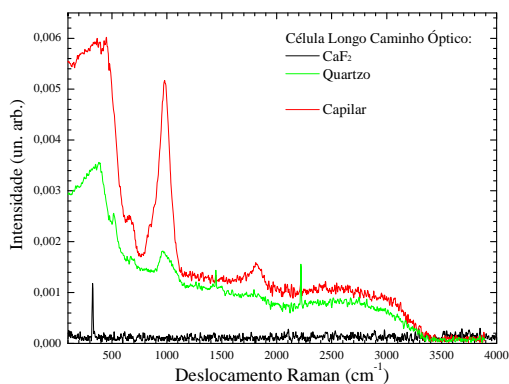


Figura 4- Comparação entre os espectros Raman do capilar de hematócrito e célula de longo caminho óptico com janela de Quartzo e janela de  $\text{CaF}_2$ .

A Figura 7 mostra o espectro Raman do DNA extraído pelo método Qiagen e eluído em água quando medido na célula de longo caminho óptico. Os modos assinalados com asterisco são as vibrações da janela de quartzo da célula. Os outros modos assinalados são as vibrações das ligações O-P-O do DNA, bem como das bases citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A) e água. (Twardowski, 1994) As bandas em  $2850$ ,  $2920$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  não puderam ser identificadas.

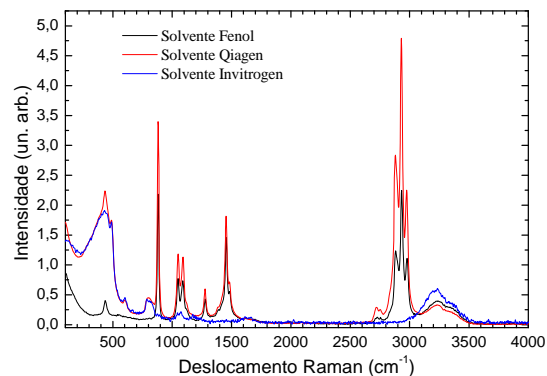


Figura 5- Comparação entre espectro Raman dos solventes de eluição usados nos métodos de extração por fenol-clorofórmio, por centrifugação e por magnetização.

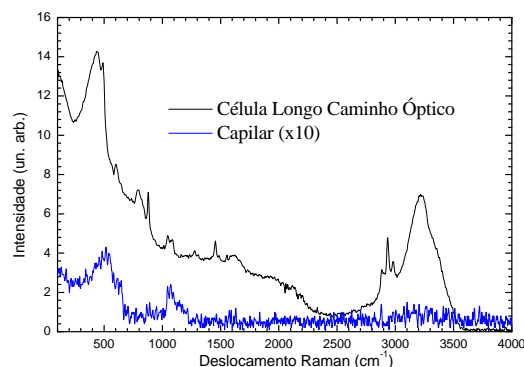


Figura 6- Comparação entre espectros Raman do DNA extraído pelo método de centrifugação utilizando-se o capilar e a célula de longo caminho óptico.

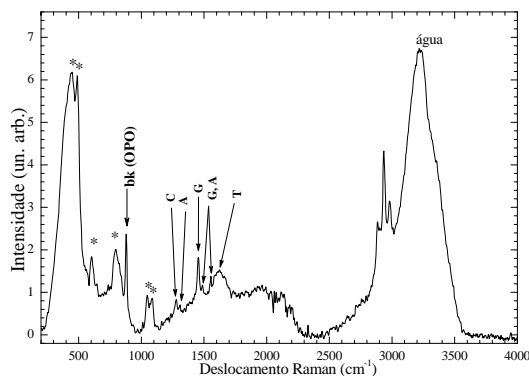


Figura 7- Espectro Raman do DNA de mama acometida por CDI-NOS extraído pelo método Qiagen.

## Discussão

Quando se verificam as razões entre as bandas 260/280 (Tabela 1) observa-se que os produtos de extração das três diferentes metodologias apresentaram valores aceitáveis. Mas os valores de concentração para os métodos por Invitrogen e Fe-Cl foram bem maiores do que para o Qiagen. Uma possível explicação pode estar relacionada aos reagentes dos meios de eluição final do DNA que podem conter elementos fortemente absorvedores no UV.

Para verificar essa possibilidade, foi realizada uma comparação entre os espectros de absorção para os meios de eluição da Qiagen, Invitrogen, Fe-Cl e também do padrão de 1kb ladder (Figuras 1 e 2). Foi possível verificar que, com exceção do solvente da Qiagen, todos os outros apresentam bandas de absorção próximas a região onde o DNA absorve, próximos de 260 nm. Isso pode ser comprovado comparando-se com o espectro do 1 kb ladder.

O EGA (Figura 3) indicou que o DNA extraído pelo método Qiagen apresentou uma única banda, que se traduz em uma amostra pura e com a molécula não fragmentada. Por outro lado, as extrações com as outras duas metodologias apresentaram uma banda mais larga, implicando em possível fragmentação do DNA.

O sinal dos porta-amostras constitui-se um importante parâmetro a ser analisado, devido a baixa intensidade do sinal Raman das amostras de DNA. Os porta-amostras, com exceção da janela de CaF<sub>2</sub>, apresentam bandas do quartzo entre 100 – 1000 cm<sup>-1</sup> e 1800 cm<sup>-1</sup> (Figura 5). Estas bandas correspondem a modos de vibração Si-OH, Si-H e modos de defeito do material vítreo (MCMILLAN et al., 1986). Apesar de presente em ambos os casos, essas são relativamente menos intensas para a célula de longo caminho óptico (Figura 6). Entretanto, a célula de longo caminho óptico com a janela de CaF<sub>2</sub> apresenta apenas uma banda na região de 322 e 280 cm<sup>-1</sup> (PONADER et al., 2005).

A eluição direta nos solventes preconizados pelos protocolos de extração inviabilizaria a observação das bandas do DNA, visto que estas são menos intensas, como pode ser concluído ao analisar a Figura 5. A partir disso, conclui-se que deveria ser necessário ressuspender as amostras extraídas para nova eluição em água milli-Q. Este líquido só possui uma banda Raman em torno de 2800 cm<sup>-1</sup> (Figura 7).

Percebe-se claramente um fator de amplificação da ordem de 15-20 vezes quando se utiliza a célula de longo caminho óptico, como pode ser notado na Figura 6, o que justifica plenamente o seu uso.

## Conclusão

Nossos estudos indicaram que é possível a obtenção de DNA extraído de tecidos de mama humana em concentrações adequadas para obtenção de espectro Raman. Verificamos que o método Qiagen permite a obtenção de DNA com nível de pureza e integridade estrutural adequados, porém em baixa concentração.

A utilização de água como solvente de eluição se faz necessária, pois ao contrário dos solventes de eluição usuais preconizados pelos protocolos testados, a água milli-Q possui apenas uma banda Raman em torno de 2800 cm<sup>-1</sup>.

Há um longo trabalho a ser feito no aperfeiçoamento do protocolo de extração tanto pelo método Qiagen como nos outros, para obter amostras mais concentradas e purificadas que minimizem o tempo de aquisição, que neste experimento foram da ordem de 60 minutos.

## Referências

- HANLON, E. B. Prospects for *in vivo* Raman Spectroscopy. **Phys. Med. Biol.** 45, 1, 2000.
- LEHNINGER, L. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman & Co, 4 ed., pp. 1100, 2004.
- MCMILLAN, P. F. Hydroxyl sites in SiO<sub>2</sub> glass: A note on infrared and Raman spectra. **Am. Mineralogist** 71, 772, 1986.
- NAUMANN, D. FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research. **Appl. Spec. Rev.** 36, 239, 2001.
- PONADER C. W. Structural Studies of (Ca,Sr) F<sub>2</sub> Single Crystals with Raman and NMR Spectroscopies. **J. Am. Ceram. Soc.**, 88, 9, 2447–2450, 2005.
- SAMBROOK, J. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- TWARDOWSKI, J. Proteins, Chap. 4 in Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry, Polish Scientific Publishers Warsaw, 1994.