

BIOLOGIA MOLECULAR

Como garantir a qualidade nos resultados - Parte 2

Equipamentos nos laboratórios de PCR

Para assegurar-se de que os eventos de pré e pós PCR permaneçam separados, cada área deve ter seus próprios equipamentos, incluindo pipetas, reagentes, ponteiras, racks, e assim por diante. Além disso, estes artigos não devem sair da área a que são atribuídos. Cada um deve ser destinado àquela área e usado naquela área somente. Os aventais do laboratório também devem ser exclusivos de cada laboratório. Como a pipetagem é a base da análise de PCR, cada local deve ter suas próprias pipetas dedicadas, as quais nunca devem ser trocadas entre as áreas de trabalho. Quando as pipetas e ponteiras de pré PCR não estão em uso, devem ser armazenadas em suportes próprios (pipetas) e gavetas (ponteiras) para mantê-las limpas. As reações devem ser preparadas usando um máster mix, e a amostra deve sempre ser adicionada por último, usando ponteiras com barreira para impedir que as pipetas se contaminem.

Atividades Pré PCR

A definição de pré PCR é: protocolos e equipamentos necessários para a extração do ácido nucleico e preparação da reação para amplificar as amostras. Durante os últimos 10 anos, houve muito progresso no desenvolvimento de dispositivos que executam estas atividades de maneira automatizada. Apesar disso, a maioria dos laboratórios de PCR ainda executam estas tarefas usando procedimentos manuais. Qual é o mínimo necessário para equipar um laboratório de PCR para a preparação da amostra, do reagente para PCR, e da reação de PCR? Como a maioria das etapas envolvem atividades de pipetagem de líquidos, estas atividades devem ser examinadas com mais cuidado, principalmente as pipetas e ponteiras. Como discutido previamente, as ponteiras com barreira devem sempre ser utilizadas. Como há um risco de criar aerossóis na extração das amostras de RNA e DNA, os jogos de pipetas utilizados para extração de amostras e preparação de reagentes devem ser separados. Por causa da eficácia da luz ultravioleta (UV) no controle do amplicon, o uso de UV

dentro da capela antes da preparação de reagentes de PCR é aconselhável.

Cuidados com o ambiente de trabalho

- **Ar condicionado:** Em laboratórios que detectam quantidades extremamente pequenas de ácidos nucleicos, o sistema de ar condicionado das salas pré e pós PCR deve ser totalmente independente. Cada área deve ter exaustão separada e os dutos de ar condicionado nunca devem se conectar. As portas das diferentes áreas devem sempre estar fechadas, evitando a passagem de ar para fora da área determinada.

- **Equipamento de proteção:** Para prevenir que os amplicons saiam da área de pós PCR, cada analista de laboratório deve possuir um avental exclusivo e separado para as áreas pré e pós PCR. Na área de pré PCR devem ser usado aventais descartáveis, acompanhados sempre de propés, toucas, óculos de proteção e luvas.

- **Descarte:** O descarte de reagentes, amostras e produtos de PCR deve sempre ser feito no lixo apropriado. Não é aconselhável deixar acumular lixo, uma vez que esta pode ser uma potencial fonte de contaminação.

Controle de contaminação

Como mencionado anteriormente, uma variedade de métodos podem ser usados para controlar a contaminação do amplicon de PCR. Estes métodos podem ser agrupados em duas categorias: (1) métodos que usam meios físicos para impedir a dispersão de amplicons de PCR e (2) métodos que exploram algum tipo de reação química para fazer com que os amplicons sejam incapazes de servirem como moldes para uma nova reação de PCR. Cada um destes métodos tem um lugar no laboratório de PCR, e a maioria dos laboratórios bem sucedidos de PCR usam uma série destes métodos para controlar a contaminação de maneira eficaz.

Métodos físicos

Nesta categoria estão incluídas as barreiras físicas. A mais popular é o uso de ponteiras com barreira para impedir a

formação de aerossóis.

Estes tipos de ponteiras impedem a introdução de aerossóis provenientes de uma amostra já pipetada na amostra seguinte que ainda será pipetada. O uso destas ponteiras é recomendado geralmente nas áreas de pré PCR do laboratório onde as amostras estão sendo processadas e os ácidos nucleicos (DNA e RNA) estão sendo isolados.

O uso destas ponteiras não é necessário no laboratório de pós PCR porque há já uma grande quantidade presente de amplicons. Neste caso, as pipetas devem sempre ser limpas com hipoclorito 1% seguido de álcool 70%.

Em conjunto com as ponteiras com barreiras pode-se utilizar uma capela ou fluxo laminar para facilitar a preparação de reagentes de PCR. Quando são preparados neste local isolado, há muito menos possibilidade de uma fonte externa de amplicon de PCR contaminar os reagentes que estão sendo manipulados para o PCR subsequente.



Métodos químicos

Várias abordagens utilizando reações químicas foram desenvolvidas durante os últimos 20 anos. Apesar disso, somente algumas têm real sucesso em tornar seu uso rotineiro no controle da contaminação de PCR

- Luz UV: Esta ferramenta pode ser usada no pré e no pós PCR. A base desta reação é que as pirimidinas (C e T) adjacentes de uma fita de DNA podem ligar-se umas às outras quando expostas a uma luz UV de 254 nm (Gordon e Haseltine 1982). A reação é muito rápida e pode ser eficaz para amplicons grandes; isto é, aqueles maiores que 700 bp. Os amplicons menores são mais difíceis de inativar porque existem poucas pirimidinas adjacentes. Há também a possibilidade de haver ligação de pirimidinas entre as fitas de DNA na inativação por luz UV. Uma vez que ligados, os dímeros de pirimidina não se desfazem e assim, a DNA polimerase não consegue caminhar pela fita de DNA, ou o DNA não pode desnaturar completamente, e a reação da síntese é parada imediatamente. A luz UV é usada mais freqüentemente na área pré PCR, dentro de uma pequena capela para a preparação de reagentes. Todas as pipetas, ponteiros e demais descartáveis usados na reação de PCR são colocados dentro da capela e iluminados por 15 minutos, antes que a reação de PCR seja montada.

- Uracil-DNA-glicosilase: Esta enzima (conhecida também como UDG) é muito eficaz em destruir amplicons de PCR quando usada na preparação da reação de PCR (Longo et al. 1990; Thornton et al. 1992). Seu mecanismo de ação funciona da seguinte forma: na etapa de pré PCR, o dTTP é substituído com dUTP, e a UDG é incluída no mix da reação. Todos componentes restantes da reação permanecem os mesmos. Durante a PCR, a DNA polimerase substitui o dU por dT na fita que está sendo sintetizada. No produto final há agora dU em vez de dT na fita nova de DNA. Depois do término da reação de PCR, a amostra amplificada é exposta à enzima UDG. Se a UDG encontrar DNA que contém U, os Us são clivados, deixando a fita de DNA com falhas. Uma fita de DNA com falhas torna-se impossível de ser amplificada novamente e, portanto de ser uma fonte potencial de contaminação. A utilização da UDG varia de acordo com o DNA a ser amplificado, o tipo de reação utilizada, etc.

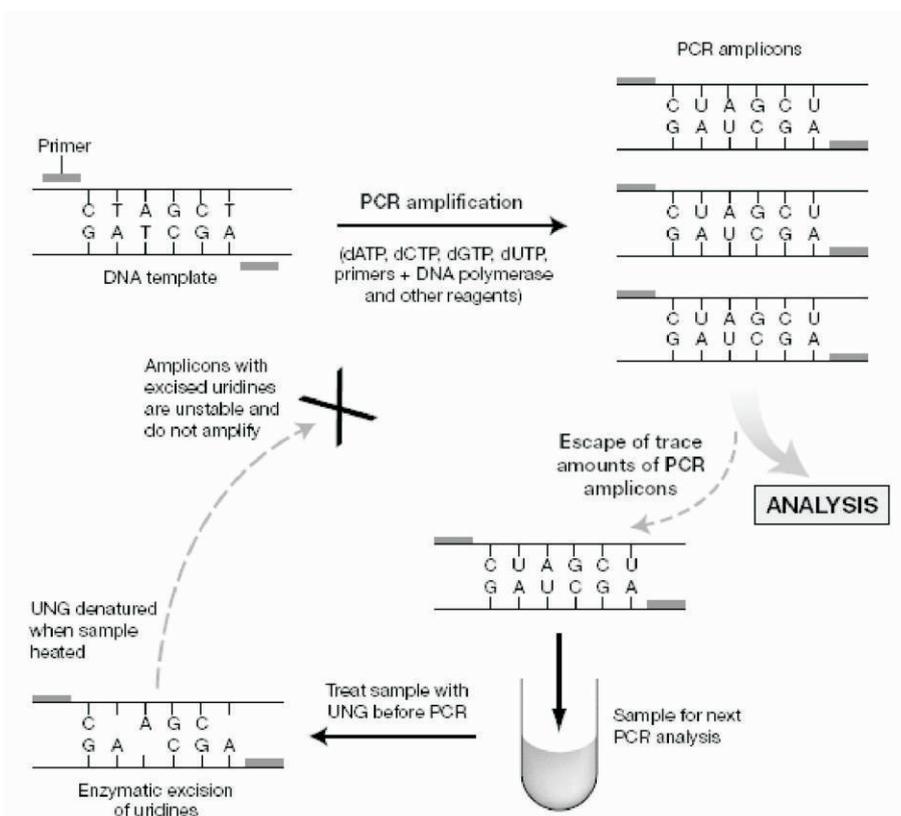


Figura 1: Uso da UDG na reação de PCR para prevenir contaminação

REFERÊNCIAS

- Gordon L.K. and Haseltine W.A. 1982. Quantitation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in double- and single-stranded DNA fragments of defined sequence. *Radiat. Res.* 89: 99–112.
- Kwok S. and Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR (erratum Nature [1989] 339: 490). *Nature* 339: 237–238.
- Lo Y.M., Mehal W.Z., and Fleming K.A. 1988. False-positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet* 2: 679.
- Longo M.C., Berninger M.S., and Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125–128.
- Mullis K.B. 1987. Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Patent #4,683,202.
- Mullis K.B., Erlich H.A., Arnheim N., Horn G.T., Saiki R.K., and Scharf S.J. 1987. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent #4,683,195.
- Newton C.R. 1995. Setting up a PCR laboratory. In *PCR: Essential data*. (ed. C.R. Newton), p. 216. Wiley, New York.
- Pellett P.E., Spira T.J., Bagasra O., Boshoff C., Corey L., de Lellis L., Huang M.L., Lin J.C., Matthews S., Monini P., Rimessi P., Sosa C., Wood C., and Stewart J.A. 1999. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 8 DNA in semen. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1298–1301.
- Scherzinger C.A., Ladd C., Bourke M.T., Adamowicz M.S., Johannes P.M., Scherzinger R., Beesley T., and Lee H.C. 1999. A systematic analysis of PCR contamination. *J. Forensic Sci.* 44: 1042–1045.
- Thornton C.G., Hartley J.L., and Rashtchian A. 1992. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: Characterization of residual UDG activity following thermal cycling. *BioTechniques* 13: 180–184.