

Estudo de DNA em solução por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

Autor: Bernardo Juchem Becker

Orientadora: Cilaine Verônica Teixeira

Introdução e Justificativa

A vacinação é um método muito adequado para evitar os transtornos causados por doenças infecciosas. Na década de 50 iniciaram-se os primeiros estudos sobre vacinas de DNA¹. Porém, há apenas algumas décadas os primeiros trabalhos mostravam sua eficiência^{2,3}. Vários fatores são importantes para o êxito da vacina. Além da capacidade de imunização, a estrutura usada para o transporte do DNA deve ser estável até o momento em que este deve ser liberado no organismo, e não pode ser tóxica.

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a estrutura formada por DNA em solução aquosa não salina por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Servindo assim como referência à parte inicial de um projeto que estuda estruturas que podem ser utilizadas para a confecção de vacinas, a fim de produzir e caracterizar agregados formados por DNA com surfactantes.

DNA

O Ácido Desoxirribonucleico (DNA) tem um formato de hélice dupla e sua principal função é armazenar informação genética na forma de uma longa sequência de bases nitrogenadas. Os segmentos de DNA onde estão contidas as informações genéticas são chamados de genes. É através deles que podem ser confeccionadas proteínas para diversas funções biológicas diferentes.

Amostras

O DNA utilizado foi o DNA genômico puro de salmão. Na faculdade de Veterinária da UFRGS, as amostras foram preparadas tentando reproduzir o procedimento realizado por Castelletto et al. Diluiu-se o DNA em água ultrapura em concentração de 20 mg/mL. Em seguida sonicou-se (aplicação de ultrassom) a solução de DNA para quebrá-lo em mais moléculas de menor comprimento. A sonicação foi feita em ciclos seguidos de intervalos para a solução resfriar.

Em seguida foi realizada eletroforese para determinar o tamanho em pares de bases das moléculas de DNA em solução. O resultado atingido foi uma faixa de tamanho entre 100 e 700 pares de base (pb). Para tal comprimento o DNA seguramente se comportaria como linear e não apresentaria supertorção ou enrolamento. Por fim, da solução foram feitas alíquotas de concentrações 10 e 20 mg/mL.

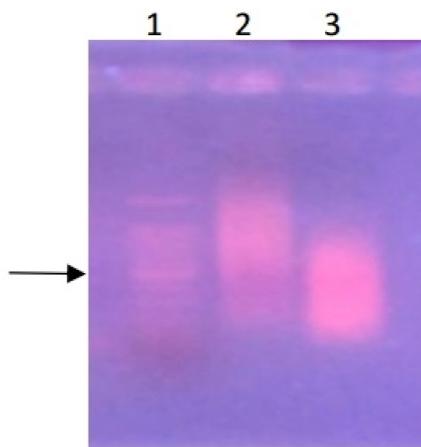


Figura 1:

DNA submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e observado sob luz UV. Coluna 1, marcador; coluna 2, DNA submetido a 25 ciclos de sonicação a 30 W; coluna 3, DNA submetido a 15 ciclos a 65 W e utilizado no experimento (100 a 700 pb). A seta indica o fragmento de 500 pb do marcador.

Referências:

- (1) Stansney, J., Cantarow, A., Paschkis, K.E., Cancer Res., 10, 775-782, 1950.
- (2) Shedlock, D.J., Weiner, D.B., J. Leukocyte Biol., 68, 793-806.
- (3) Kano, F.S., Vidotto, O., Vidotto, M.C., Semina: Ciências Agrárias, 28, 709-726, 2007.
- (4) Castelletto, V., Itri, R., Amaral, L.Q., Spada, G.P., Macromol. 28, 8395-8400, 1995.
- (5) Glatter, O., J. Appl. Crystallogr., 10, 415-421, 1977.

Metodologia Experimental

No procedimento de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) utilizou-se o equipamento Nano-inXider (Xenocs), do Centro de Nanociência e Nanotecnologia da UFRGS. Como o equipamento opera em uma câmara de vácuo, as amostras preparadas foram postas em capilares finos de vidro e seladas com cera quente para evitar vazamentos. O aparelho funciona incidindo um potente feixe de raios X na amostra. O espalhamento do feixe causado pela amostra é então registrado por um detector.

A partir do registro da posição e contagem de fótons realizados pelo detector são gerados gráficos das curvas de espalhamento. Sobre estas curvas ainda são aplicadas correções de transmissão, normalização do tempo de exposição e contribuição do solvente.

Técnica de SAXS

Técnica para estudo de estruturas de tamanho coloidal. Difração é produzida pela interferência de ondas espalhadas pelo objeto em seu caminho. No caso de raios X, como a energia dos fótons é grande comparada à energia de ligação entre o átomo e os elétrons, pode-se considerar os elétrons como livres. Então, cada um deles será a fonte de uma nova onda espalhada.

Amplitude $F(\mathbf{q})$ da onda espalhada na direção de \mathbf{q} (vetor de transferência de momento) é a transformada de Fourier da função de distribuição de densidade de elétrons $\rho(\mathbf{r})$ do objeto alvo e 2θ é o ângulo de espalhamento.

$$F(\mathbf{q}) = \int \rho(\mathbf{r}) e^{-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} d\mathbf{v} \quad q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$$

A intensidade $I(\mathbf{q})$ é calculada pelo complexo conjugado da amplitude:

$$I(\mathbf{q}) = FF^*$$

A partir da intensidade $I(\mathbf{q})$ é possível calcular a função distribuição de distâncias $p(r)$ através do método da transformada de Fourier desenvolvido por O. Glatter⁵.

$$p(r) = 1/(2\pi^2) \int_0^\infty I(q) q r \sin(qr) dq$$

Através da aproximação de Guinier pode-se obter o raio de giração R de partículas de formato cilíndrico:

$$q I(q) \propto e^{-q^2 R^2/3}$$

Resultados

Através de um tratamento de dados prévio sobre o espalhamento das amostras de DNA a queda de intensidade a baixos valores de q indica contribuição do fator de estrutura com o aumento de concentração (figura 2).

As curvas para 10 mg/ml e 20 mg/ml de DNA são comparáveis às obtidas por Castelletto et al. para DNA fragmentado com aproximadamente 120 bp. Castelletto et al. obtiveram um raio de giração para a seção transversal de 10,8 Å, e na análise deste trabalho obteve-se 7 Å (figura 3), com bp variando entre 100 e 700. Deve-se investigar ainda se o raio de giração depende do comprimento da cadeia.

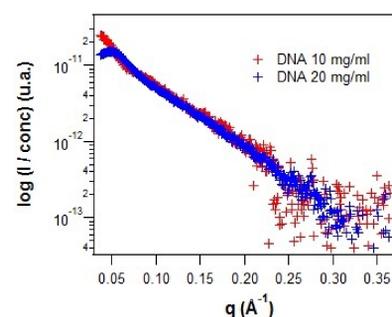


Figura 2:

Gráfico de intensidade relativa detectada versus vetor de transferência de momento. Para baixos valores de q nota-se contribuição do fator de estrutura com o aumento de concentração.

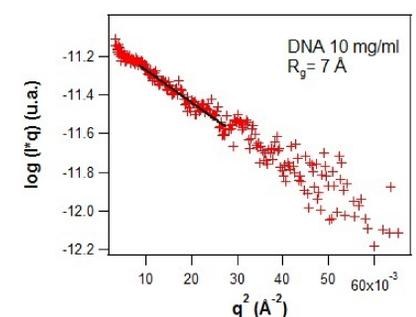


Figura 3:

Gráfico de Guinier. Através da inclinação da reta esboçada é obtido o raio de giração R para concentração 10 mg/ml.

Agradecimentos:

- Ana Paula Ravazzolo (1) e Leonardo Pessoa da Silva (2)
(1) Faculdade de Veterinária - UFRGS
(2) Instituto de Física - UFRGS