

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

HELBER BARBOZA PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA
PLASMIDIAL PELA TÉCNICA DE *SALTING-OUT* UTILIZANDO SULFATO
DE AMÔNIO**

São Gabriel, 2016

HELBER BARBOZA PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA
PLASMIDIAL PELA TÉCNICA DE *SALTING-OUT* UTILIZANDO SULFATO
DE AMÔNIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como avaliação da disciplina Trabalho de
Conclusão de curso III obrigatória do curso de
Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo

São Gabriel, 2016

HELBER BARBOZA PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA
PLASMIDIAL PELA TÉCNICA DE *SALTING-OUT* UTILIZANDO SULFATO
DE AMÔNIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como avaliação da disciplina Trabalho de
Conclusão de curso III obrigatória do curso de
Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa

Área de concentração: Biologia Molecular

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 21/11/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Banca

Universidade Federal do Pampa- Unipampa

Prof. Dr. Helmoz Roseniaim Appelt

Banca

Universidade Federal do Pampa- Unipampa

Dedico exclusivamente a minha família, que foi uma fonte de energia para que eu seguisse meu caminho na ciência.

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer ao meu orientador Andrés Delgado Cañedo pela confiança em mim depositada, amizade e companheirismo durante todo o tempo.

Também gostaria de agradecer a todo o grupo de pesquisa GPEGE e APIPAMPA pelo apoio em horas difíceis, e também nas horas de comemorações.

Queria agradecer a algumas pessoas em especial a alguns colegas de laboratório, como o Luiz Filipe Tsarbopoulos de Resende pela paciência em ensinar a fazer PCR. Aos meus antigos orientadores Analía Del Vale Garnero e Ricardo José Gunski a qual tenho um imenso respeito e, levarei comigo seus conselhos para o resto da vida.

Gostaria de agradecer exclusivamente a minha família, pelo apoio, compreensão, e todo o amor que cada um merece de sua família durante essa graduação.

E principalmente a minha Vó, Brandina Castilhos Barboza que infelizmente não poderá assistir a essa defesa, mas é por ela que farei com que esta defesa seja de forma digna, assim como ela foi durante toda a sua vida.

RESUMO

O desenvolvimento de protocolos de entrega gênica, como os utilizados para terapia gênica, demanda a obtenção de grandes quantidades de DNA plasmidial (pDNA) com alto grau de pureza. Um dos principais obstáculos da produção de grandes quantidades de pDNA é a própria purificação. Embora existam protocolos de biologia molecular para purificação de pDNA, poucos estão adequados à produção em grande escala e são muito complexos. A técnica de *salting-out*, onde a precipitação de proteínas e outras biomoléculas é induzida pelo efeito cosmotrópico de alguns sais, pode ser um método simples, rápido e barato de purificação. Com base nesses argumentos, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de purificação de pDNA a partir da técnica de *salting-out* utilizando sulfato de amônio. A produção dos plasmídeos foi realizada em células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α e extraído pelo método padrão de lise alcalina. Posteriormente, foi testado o método de *salting-out* com sulfato de amônio nas concentrações de 1, 2 e 3 M. Simultaneamente, diferentes tempos de exposição ao sal foram testados (10, 20 e 30 minutos). Inicialmente, foram realizados testes de precipitação do DNA com álcool isopropílico na quantidade de 0,7 volumes e, também, precipitação com 2 volumes de álcool etílico para observação da eficiência de ambos perante a presença de sal na amostra. Na presença de álcool etílico tivemos precipitação do sal mesmo em baixas concentrações e na presença de álcool isopropílico aconteceu a formação de duas fases sem a precipitação do sal nem do pDNA. Desta forma, foi testado a diluição das soluções com água ultrapura de 1 M até 0,25 M e posterior precipitação em álcool isopropílico, analisando visualmente a formação ou não das duas fases, que não foi visível a partir da concentração de 0,5 M. Portanto, após o tratamento dos lisados com sulfato de amônio as amostras foram diluídas até a concentração salina de 0,5 M e precipitadas com álcool isopropílico, ressuspendidas em água ultrapura e analisadas em gel de agarose, espectrofotometria, HPLC e transferência gênica. Ao mesmo tempo, comparamos o método *salting-out* com kit de purificação comercial, visualizando a recuperação de pDNA obtido ao fim do processo e a pureza. Os resultados obtidos mostram a eficiência da técnica de *salting-out* utilizando sulfato de amônio e precipitação em álcool isopropílico. A concentração de sulfato de amônio 2 M apresentou os melhores resultados com remoção de RNA e padrão eletroforético esperado; Este pDNA apresenta relação 260nm/280nm e 260nm/230nm de acordo com o esperado para DNA puro, posteriormente confirmado por HPLC. Ao mesmo tempo, este DNA apresentou-se eficiente para

experimentos de transferência gênica gerando dados compatíveis com aqueles obtidos mediante o uso de colunas cromatográficas comerciais para sua purificação. Assim os dados aqui apresentados sugerem que o método é eficiente, possibilitando a obtenção de pDNA com alto grau de pureza e com baixo custo.

Palavras-chave: DNA Plasmidial. Purificação. Salting-out. Álcool Isopropílico. Sulfato de Amônio.

ABSTRACT

Development of gene transfer protocols demand high quantities of pure plasmidial DNA (pDNA). One of the purification pitfalls is the complexity of the purification protocols. The salting-out techniques allow to precipitate proteins and another biomolecules through a salt cosmotropic effect. This method can be a simple, fast and low cost system of purification. In this work we aim the establishment of a protocol for pDNA purification through ammonium sulphate treatment. Plasmids were initially produced in *Escherichia coli* (DH5 α strain) and extracted by alkaline lysis. Later, was tested the salting-out method by treating samples with 1, 2 or 3 M ammonium sulphate. At same time, we exposed samples during different times (10, 20 e 30 minutes). Initially, to observe the behavior of the ammonium sulphate solution in the alcohol pDNA precipitation protocol, we tested 0.7 volume of isopropyl alcohol and, also, in 2 volumes of ethyl alcohol. Ethyl alcohol induce the salt precipitation, either in low concentrations. On the other hand, isopropyl alcohol formed a two phase system, without inducing salt precipitation. After, we tested the effect of isopropyl alcohol in ammonium sulphate solution from 0,25 M to 1 M; two phase system was not observed in ammonium sulfate concentrations lower than 0,5 M. Thus, we decides to treat the samples with ammonium sulphate, diluting its concentration to 0,5 M before the precipitation in isopropyl alcohol. pDNA samples were analyzed in agarose gel, spectrophotometrically, by HPLC and in gene transfer protocols. At same time, we compared the salting-out method against a commercial purification kit, analyzing the pDNA yield and purity. The better results were obtained by treating samples with 2 M ammonium sulphate. In this concentration, the product showed low RNA concentration and expected electrophoretic pattern. The obtained pDNA presented 260nm/280nm and 260nm/230nm ratios inside the ranges expected for pure DNA, we thereafter confirmed this purity by HPLC. The pDNA purified were able to transform HEK cell line, showing higher transfection efficiency than that purified by commercial kit. Taken together, our results suggest that our method could be an alternative to produce pure and low cost plasmidial DNA to be used in downstream protocols.

Keywords: Plasmid DNA. Purification. Salting-out. Isopropyl Alcohol. Ammonium Sulfate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Fluxograma do protocolo de purificação de pDNA por *salting-out* com sulfato de amônio. Na cor (vermelho) é demonstrado os passos subsequentes utilizado por Freitas e colaboradores após a precipitação com sulfato de amônio. Já em (azul) é demonstrado o método adaptado que foi realizado nesse trabalho, substituindo a cromatografia e a dessaltação por precipitação em álcool 17
- Figura 2- Imagem representativa do mapa gênico do plasmídeo pCR-BicolorRSV..... 18
- Figura 3- Imagem de gel de agarose 0,8%, para análise de pDNA expostos a diferentes concentrações de sulfato de amônio em diferentes tempo. Amostra 1: lisado bruto; amostras 2 ,3 e 4 produtos purificado com Sulfato de amônio 1 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente); amostras 5, 6 e 7 produtos purificado com Sulfato de amônio 2 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente); amostras 8, 9 e 10 produtos purificado com Sulfato de amônio 3 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente). As siglas OC (Open Circular) corresponde ao pDNA na conformação circular aberto e a sigla SC (Supercoiled Circular) corresponde a conformação circular superhelicoidizado 25
- Figura 4- Análises por HPLC de diferentes fases e métodos de purificação de plasmídeo. São mostrados gráficos representativos de A-lisado bruto; B- lisado bruto precipitado com álcool isopropílico; C-produto purificado pelo método de *salting-out* precipitado com álcool isopropílico; D- produto purificado com sistema comercial de cromatografia em coluna. A linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 260 nm e a linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 280 nm..... 27
- Figura 5- Em **A** mostra as células da linhagem HEK lipofectadas com plasmídeos purificados pelo método *salting-out*, e em **B** as células da linhagem HEK lipofectadas com os plasmídeos purificados pelo kit Midiprep Promega. Visualmente é possível observar a maior intensidade de expressão do gene EGFP em células lipofectadas com plasmídeos purificados por *salting-out* 28
- Figura 6- A análise de citometria realizada em células transformadas com o plasmídeo pCR-BicolorRSV, purificado por diferentes métodos e comparando a eficiência da lipofecção e a eficiência do plasmídeo em expressar o gene EGFP 29

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Testes de precipitação de pDNA com Álcool etílico e Álcool isopropílico..... | 24 |
| Tabela 2- Análise da quantidade de pDNA obtido nos dois métodos | 26 |

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA- Ácido Desoxirribonucléico
Ca²⁺- Íon de cálcio
CO²- Dióxido de Carbono
FL1-A- Fluorescência com base na área
FSC-A- Foward Scatter Area
FSC-H- Foward Scatter Height
g- Força da Gravidade
GFP- Proteína Verde Fluorescente
HA- Hidroxiapatita
HEK- Rim de Embrião Humano
HIC- Cromatografia de Interação Hidrofóbica
HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LB- Luria-Bertani
M- Molar
min- Minutos
Mg²⁺- Íon de magnésio
mL- Mililitro
μl- Microlitro
NH₄⁺- Íon de amônia
nm- Nanômetro
OC- Open Circular
OD- Densidade Óptica
pDNA- DNA plasmidial
pH- Potencial Hidrogeniônico
RNA- Ácido Ribonucléico
RPM- Rotações por minuto
SC- Circular Supercoiled
SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
SSC-A- Side Scatter Area
SSC-H- Side Scatter Height

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| | 2.1 Objetivo Geral | 16 |
| | 2.2 Objetivos Específicos..... | 16 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| | 3.1 Cultura celular para obtenção dos plasmídeos | 17 |
| | 3.2 Lise Alcalina..... | 18 |
| | 3.3 Precipitação com Sulfato Amônio..... | 19 |
| | 3.4 Precipitação do pDNA purificado com Álcool Etílico e Álcool Isopropílico | 19 |
| | 3.5 Método de dessaltação das amostras..... | 19 |
| | 3.6 Eletroforese em gel de agarose..... | 19 |
| | 3.7 Análise de expressão dos produtos purificados através da transformação por Eletroporação..... | 20 |
| | 3.8 Citometria de Fluxo em células eucariotas da linhagem HEK..... | 21 |
| | 3.9 Análise de rendimento de pDNA utilizando o protocolo <i>salting-out</i> e o kit de purificação por coluna (Midiprep Promega)..... | 21 |
| | 4.10 Análises dos produtos purificados por coluna de extração e por <i>salting-out</i> utilizando HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)..... | 21 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 23 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 31 |
| 6 | REFERÊNCIAS..... | 32 |

1 INTRODUÇÃO

A terapia gênica tem sido anunciada como uma alternativa em procedimentos clínicos. Em teoria, está técnica ser capaz de tratar doenças monogênicas, como a fibrose cística, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, o câncer e outras doenças em um futuro próximo (Gomes et al., 2009). Ela consiste basicamente na introdução de genes funcionais em células alvo humanas, bem como um modo de prevenir, tratar ou curar defeitos genéticos. Ao mesmo tempo, pode-se gerar vacinas a partir de genes de um agente patogênico para fornecer imunidade contra doenças letais (Prazeres et al., 1999).

O transporte de genes terapêuticos para o núcleo de células alvo pode ser efetuada por qualquer dois tipos de vetores viral ou não viral. Embora a utilização de organismos geneticamente modificados como os retrovírus, adenovírus e outros sistemas virais presentes podem apresentar alguns problemas e levanta preocupação de segurança. As formulações de genes inseridos em plasmídeos são consideradas mais seguras e podem ser utilizadas como um produto farmacêutico, por exemplo por injeção em vias intramusculares (Prazeres et al., 1999).

Nestes procedimentos, existe a necessidade da obtenção de plasmídeos purificados em alta grau de pureza e em larga escala (Trindade et al., 2005). Uma dose típica (tal como utilizado para tratamentos de pacientes com melanoma), é de 0,3 mg, mas tratamentos completos poderiam exigir quantidades acima das miligramas de pDNA (Prazeres et al., 1999). Os protocolos de purificação de produtos biofarmacêuticos em larga escala que hoje estão disponíveis são processos extremamente complexos e com muitas etapas. Células em grandes quantidades são produzidas em grandes tanques com biorreatores, o que necessita de aparelhos adaptados para etapas subsequentes de purificação, como centrífugas e membranas de filtração. Isso pode prejudicar a purificação do produto final, já que aparelhos necessitam ser adaptados para a purificação de produtos biofarmacêuticos em larga escala, principalmente em relação a pDNA, já que a maioria dos protocolos de purificação em escala industrial, são para produção de proteínas (Jungbauer A., 2013).

Existem vários métodos para purificação de pDNA. Um dos primeiros métodos utilizados, muito antes da utilização de colunas de purificação, é o método que utiliza fenol/clorofórmio. O princípio dessa separação é pela diferença de solubilidade de ácidos nucleicos, proteínas e

lipídios nesses solventes orgânicos, de forma que, após a realização dessa separação, se obtém uma fase aquosa, em que se encontra o ácido nucléico. O fenol-clorofórmio utilizado após o rompimento da membrana celular auxilia a desnaturação das proteínas, que são removidas pelas subseqüentes centrifugações e lavagens (Mesquita et al., 2001).

O fato de os solventes orgânicos usados (fenol e clorofórmio) serem reagentes extremamente tóxicos traz problemas em sua manipulação. Além disso, o método necessita de um grande número de fase no processo laboratorial. Esse fato levou os pesquisadores a buscar alternativas para extração de DNA (Rivero et al., 2006).

Para facilitar os métodos de extração e purificação de DNA, que até então eram métodos que exigiam muitos passos até chegar ao produto final totalmente purificado, foram desenvolvidas colunas de sílica para a purificação de DNA por cromatografia. Os sistemas comerciais de purificação por colunas de sílica facilitam a operação de purificação, oferecendo um produto final com bom padrão de qualidade. Contudo, o produto final não tem uma purificação em nível farmacêutico. Segundo dados de (Poh, JJ; Gan, SKE., 2014), a quantidade de reagentes utilizados neste método de coluna especificamente, pode prejudicar o produto final.

A cromatografia está no cerne da purificação em larga escala de pDNA e é um processo analítico utilizado para monitoramento de processos em desenvolvimento e controle de qualidade. Diferentes tipos de cromatografias são utilizadas, como filtração em gel, fase iônica, fase reversa, cromatografia de afinidade, entre outras (Prazeres et al., 1998)

Um dos grandes desafios da purificação de pDNA é a eliminação total ou parcial de RNA presente na amostra uma vez que estes competem com o DNA pelo sistema de purificação por ser um ácido nucleico. Existem diferentes tipos de eliminação de RNA que são utilizado, onde quase todos os passos necessitam da análise cromatográfica. Um dos tipos de eliminação de RNA é de forma enzimática utilizando a enzima RNase, mas a utilização de proteína de origem animal na produção de reagentes terapêuticos pode ser um problema na pureza final do produto. Uma RNase recombinante seria uma alternativa para facilitar a retirada de RNA da amostra, deixando-a com alta pureza, mas de qualquer forma o custo elevaria o preço final do método (Aberin and Franklin ., 2002).

Uma maneira eficiente de eliminação de RNA da amostra é a partir de cromatografia de exclusão por tamanho. É um tipo de cromatografia que geralmente é chamada de

cromatografia de filtração em gel. Neste método as moléculas menores penetram nos poros das beads que contém dentro do gel e demoram maior tempo para eluir do que moléculas menores. Portanto, sabendo que moléculas de RNA são bem menores que moléculas de pDNA, é possível separar a partir deste método de uma forma bastante eficiente, através da exclusão molecular por tamanho. Já utilizando a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) o pDNA, neste caso, representa a parte de moléculas excluídas no processo, que eluem primeiro, ao passo que todos os RNA, proteínas, e outras pequenas moléculas, com o auxílio da utilização de colunas hidrofóbicas, sejam retardadas, ou seja, levando um maior tempo para sua eluição, pela característica hidrofóbica destas biomoléculas (Stadler J; Lemmens R; Nyhammar T., 2004).

O uso de hidroxiapatita (HA) é outro tipo de cromatografia que é reportado para remoção de RNA. É uma técnica muito eficiente para purificação de ácidos nucleicos. Em contrapartida, o acetato de potássio, utilizado como tampão para neutralização na lise alcalina, precisa ser removido, porque a interação do íon acetato com a coluna de hidroxiapatita pode causar uma dissolução do meio (Aberin and Franklin ., 2002).

Tem-se, também, a precipitação seletiva usando íons Ca^{2+} , NH_4^+ , Mg^{2+} ou polietileno glicol (PEG) (Horn NA., 1995), (Ferreira, GNM; Cabral, JMS; Prazeres, DMF., 1999). Dependendo da composição da amostra, tanto qualitativa quanto quantitativamente, este polímero (PEG) envolve o risco de co-precipitação de DNA e precisa ser removido antes de passos cromatográficos subsequentes. Contudo, todos os processos citados necessitam de processos de altos investimentos, fazendo com que muitas vezes inviabilizem o processo pelo alto custo, principalmente para laboratórios com falta de fomento financeiro, fazendo com que novas técnicas sejam testadas para obter produtos de grande quantidade e qualidade em baixo custo, como pode ser o caso do *salting-out*.

A técnica de *salting-out* consiste na precipitação de várias moléculas orgânicas induzida por um sal e é um método simples, rápido e barato de purificação, bastante utilizados para purificação de proteínas (Mirica et al., 2012).

A técnica de *salting-out* também foi utilizada por alguns pesquisadores para purificação de DNA genômico. Na técnica de *salting-out*, pode-se utilizar diferentes sais para purificação de DNA. No trabalho publicado por (Miller et al., 1988), foi utilizado NaCl para purificação de DNA de células sanguíneas. Esta técnica é muito interessante, não só por ser extremamente eficiente na purificação de DNA, mas também pela quantidade de DNA que pode ser

recuperado em comparação com kits comerciais de extração e purificação de DNA. Em um trabalho publicado por (Poh, JJ; Gan, SKE., 2014) foi testado a purificação de DNA por *salting-out* e por kits comerciais de extração e purificação de DNA. Como resultado, foi recuperado uma quantidade de DNA muito maior utilizando o *salting-out*. Contudo a técnica foi aplicada para purificação de DNA genômico, e não plasmidial.

A técnica de *salting-out* também mostrou-se uma boa alternativa para a purificação de pDNA a partir da precipitação com álcool isopropílico do lisado bruto, obtido a partir de lise alcalina, e purificação deste lisado com sulfato de amônio. Os resultados foram significativos com a utilização de sulfato de amônio 2.5M e 0,7 v/v de álcool isopropílico. Contudo, neste mesmo trabalho é possível observar bons resultados a partir de 1.6 M de sulfato de amônio (Freitas SS; Cabral JMS; Prazeres DMF., 2006).

Embora o trabalho de Freitas e colaboradores tenham apresentados dados interessantes, o procedimento por eles adotado depende do uso de um sistema cromatográfico e membranas de dessaltação de DNA, o que encarece a técnica e não permite a popularização da mesma. Neste trabalho, otimizamos um protocolo para extração de pDNA barato, rápido e com alta pureza baseado na técnica de *salting-out* com sulfato de amônio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo para purificação de DNA plasmidial em larga escala laboratorial a partir da técnica de *salting-out* com sulfato de amônio

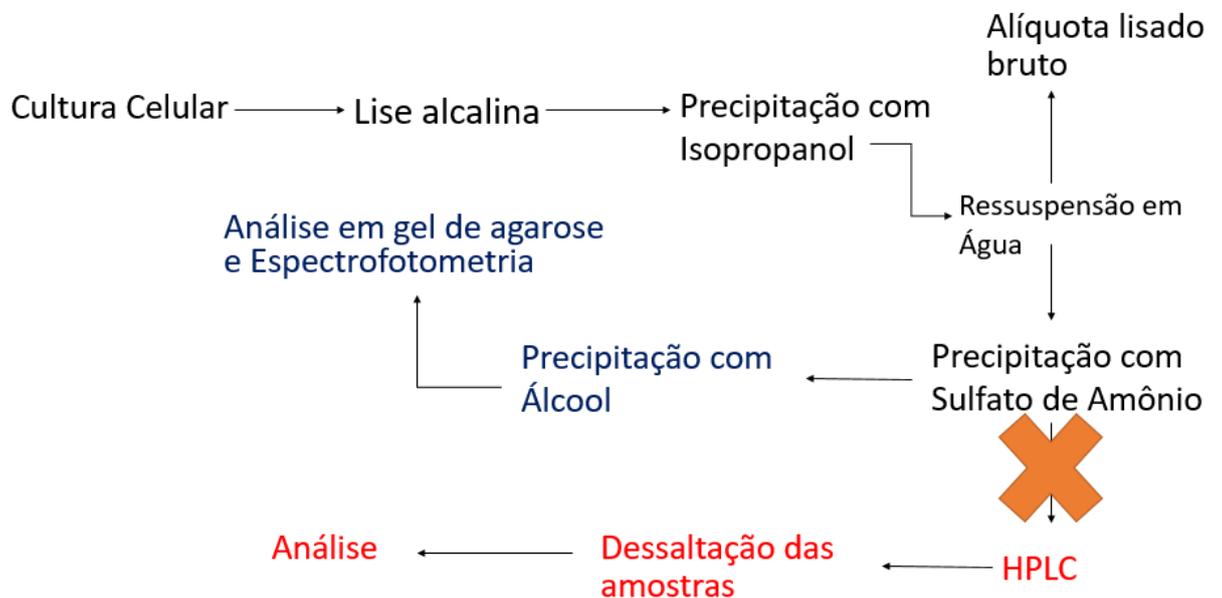
2.2 Objetivos Específicos

- Testar a ação do álcool isopropílico e álcool etílico na precipitação do DNA exposto ao sulfato de amônio;
- Analisar a pureza dos plasmídeos obtidos;
- Realizar testes de expressão dos produtos purificados;
- Análise e comparação dos pDNA purificados por colunas de extração e por *salting-out* utilizando HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).
- Análise de rendimento de pDNA purificados por colunas de extração e por *salting-out*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma mostrado na figura 1, apresenta o método da literatura proposto por Freitas e colaboradores e o nosso método desenvolvido neste trabalho.

Figura 1: Fluxograma do protocolo de purificação de pDNA por *salting-out* com sulfato de amônio. Na cor (vermelho) é demonstrado os passos subsequentes utilizado por Freitas e colaboradores após a precipitação com sulfato de amônio. Já em (azul) é demonstrado o método adaptado que foi realizado nesse trabalho, substituindo a cromatografia e a dessaltação por precipitação em álcool.



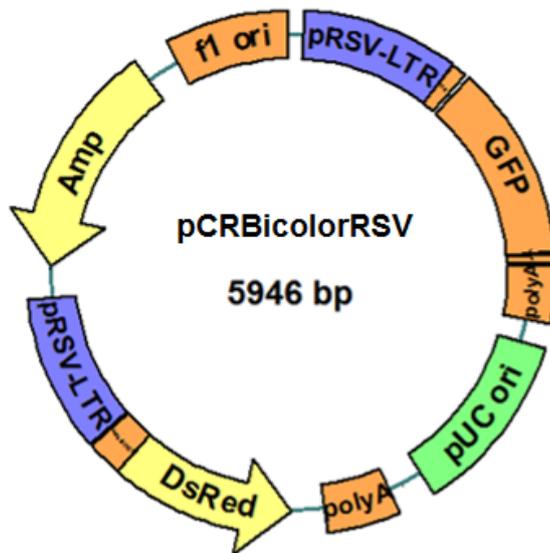
Fonte: O Autor

3.1 Cultura Celular para obtenção dos plasmídeos

Neste trabalho foi utilizado o plasmídeo pCR-BicolorRSV construído pelo nosso grupo e representado na figura 2. Este plasmídeo tem a característica de possuir dois cassetes de expressão de genes repórteres. Um deles expressa a proteína Ds-Red e o outro a proteína GFP, ambos controlados por um promotor do vírus do Sarcoma de Ross (RSV) (Vargas et al., 2012). Os plasmídeos foram eletroporados em células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α utilizando o eletroporador BioRad Gene Pulser Xcell, em cubetas de 0,2 cm, com voltagem de 2,5 kV em meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl) e, posteriormente, plaqueadas em meio LB sólido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1.8 % de Ágar) suplementado com

ampicilina na concentração de 100mg/ml na proporção de 1/1000 μ L e incubado em estufa a 37 °C durante, pelo menos, 12 horas.

Figura 2: Imagem representativa do mapa gênico do plasmídeo pCR-BicolorRSV.



Fonte: O Autor

3.2 Lise Alcalina

Após o crescimento bacteriano em placas, foi selecionada uma colônia bacteriana e, colocada em meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl) com antibiótico na quantidade de 300 mL, e incubada a 37 °C *overnight* com agitação (250 RPM).

Procedeu-se à lise alcalina por procedimento padrão (Maniatis, T; Fritsch, EF; Sambrook, J., 1982) Os 300 mL de meio com bactérias foram transferidos para tubos plásticos de 50 mL e centrifugado a 8.000 g por 10 min para obtenção do *pellet* bacteriano. Após obtenção do *pellet*, o mesmo foi ressuscitado em tampão P1 (tampão de ressuspensão 50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, pH 8,0) na quantidade de 15 % do volume inicial da cultura bacteriana, seguido foi adicionado tampão P2 (tampão de lise 200 mM NaOH, 1% SDS), no mesmo volume usado para o tampão P1, os líquidos foram misturados por inversão branda 5 vezes e mantidos a temperatura ambiente por até 5 minutos. Por último, foi adicionado o tampão P3 (tampão de neutralização 3,0 M Acetato de Sódio, pH 5,5), também no mesmo volume que P1 e misturado por inversão entre 5 e 10 vezes. Finalmente, os produtos foram centrifugados a 8.000 g por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de plástico de 50 mL e posteriormente adicionado álcool isopropílico na quantidade de 0,7 volumes para precipitação do DNA. O álcool isopropílico foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em água ultrapura.

3.3 Precipitação com Sulfato de Amônio

Como citado anteriormente, este trabalho tem como objetivo a purificação de pDNA gerados por lise alcalina através da técnica de *salting-out* utilizando sulfato de amônio, segundo descrito inicialmente por Freitas e colaboradores. O sulfato de amônio foi testado nas concentrações de 1, 2 e 3 M em diferentes tempos de exposição (10, 20 e 30 minutos) em gelo. Após a precipitação com o sulfato de amônio, procedeu-se à centrifugação a 20.000 g por 20 min a 4 °C, para a precipitação de impurezas como proteínas, endotoxinas e RNA, deixando o plasmídeo no sobrenadante.

3.4 Precipitação do pDNA purificado com Álcool Etilico e Álcool Isopropílico

Devido ao fato que soluções com altas concentrações de sulfato de amônio formam um sistema de duas fases na presença de álcool isopropílico, foi testada a concentração máxima deste sal sem formação do sistema de duas fases. Além dos testes com o álcool isopropílico, foi testado a precipitação do pDNA com álcool etílico para observar qual álcool tem a melhor eficiência na precipitação frente a uma solução altamente concentrada de sulfato de amônio.

3.5 Método de dessaltação das amostras

Para precipitar o pDNA contido na solução de alta concentração salina foi necessário a retirada ou diminuição da concentração de sulfato de amônio até o ponto em que foi possível precipitar o DNA sem precipitar o sal presente na amostra. No presente trabalho, foi testado a diluição da solução com água ultrapura, seguida da diluição da solução contendo o pDNA foi precipitada em 0,7 volume de álcool isopropílico e centrifugada a 20.000 g por 25 min. O *pellet* de pDNA foi lavado com etanol 70%, para retirar o excesso de álcool isopropílico e sais e posteriormente ressuspensionado em água ultrapura, mantendo as amostras a -20°C até sua análise.

3.6 Eletroforese em gel de Agarose e Espectrofotometria

A análise do pDNA obtido, através da técnica de *salting-out*, foi realizada através de duas técnicas. Uma das técnicas foi a eletroforese em gel de agarose 0,8 % corados com Gel-Red (Biotium, USA) e posterior visualização em transluminador L-PIX (Foccus, Brasil) através da incidência de luz ultravioleta, analisando a presença de bandas correspondentes a pDNA OC (Circular aberto), SC (Circular Superhelicoidizado) e RNA.

Na análise por espectrofotometria foi utilizado o aparelho nanoVue (GE Healthcare, USA) para visualização da concentração de DNA obtida juntamente com a pureza dos mesmos através das relações 260 nm/280 nm para contaminação com proteínas e 260 nm/230 nm para contaminação com sais e álcool. Para a primeira relação foram considerados aceitáveis valores na faixa de 1,8 a 2,0. Já para a segunda relação os valores aceitáveis devem ficar na faixa de 2,0 a 2,2.

3.7 Análise de expressão dos produtos purificados através de coluna e por *salting-out* na transformação por Lipofecção

Após todo o procedimento de cultura bacteriana, extração, purificação dos pDNA's obtidos, foi realizado testes de expressão dos plasmídeos purificados com colunas de extração comercial (Kit Midiprep Promega) e por *salting-out* em células eucariotas, também foi realizada a comparação do pDNA purificado pelos dois métodos. Para isso, foi utilizada a técnica de lipofecção para a transformação celular com os produtos purificados. A transformação celular através de lipofectamina foi realizado utilizando o kit Lipofectamine LTX Reagent- Invitrogen, onde foi utilizado placas de 96 poços com a quantidade de 100 µl de células HEK na concentração de $5,0 \times 10^5$. Foi realizado o mix com 100 µl de meio sem soro, juntamente com 100 ng de plasmídeos de ambos protocolos (um mix para os plasmídeos purificados por *salting-out* e outro para plasmídeos purificados por coluna), com 0,1 µl de PLUS reagente, onde foi incubado durante 15 min à temperatura ambiente. Após, esse mix foi fracionado em 3 tubos com 33 µl do mix para adicionar a (Lipofectamine LTX reagente), na quantidade de 0,5 µl por mix, e nova incubação por 25 min à temperatura ambiente. Por fim, 30 µl do mix foi adicionado por poço na placa e incubando as células em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂. Os produtos derivados da lipofecção foram observados em um microscópio de transmissão invertida (Olympus IX70), acoplado a uma câmera (Q color 3) e também

utilizando o software (Q Capture PRO 7) para visualização e posteriormente retirada de fotografias das células em cultura.

3.8 Citometria de Fluxo em células eucariotas da linhagem HEK

As células HEK lipofectadas com plasmídeos obtidos pelos diferentes modos de extração e purificação, foram analisadas por citometria de fluxo com parâmetros segundo publicado inicialmente por (Delgado-Cañedo et al., 2006). Adquirindo 10.000 células discriminadas em gráficos FSC-H vs. SSC-H e discriminando células com positivas para a expressão do gene EGFP, e células negativas para a não presença do gene EGFP em gráficos com parâmetros SSC-A vs. FL1-A a fim de analisar a eficiência dos dois métodos de extração na lipofecção dos plasmídeos através de fluorescência emitida pela expressão o gene EGFP. Neste trabalho para análise foi utilizado o citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6).

3.9 Análise de rendimento de pDNA utilizando o protocolo *salting-out* e o kit de purificação por coluna (Midiprep Promega)

Nesta etapa do trabalho foi realizada duas extrações e purificação de pDNA, utilizando dois métodos diferentes. Um dos métodos foi o *salting-out* e o outro método foi a utilização do kit de extração e purificação de pDNA da empresa (Promega), a partir do mesmo volume de cultura bacteriana. Para isso, foi realizada cultura bacteriana com células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α em meio LB líquido com a composição citada anteriormente, o meio foi suplementado com antibiótico ampicilina na concentração de 100 mg/mL, na proporção de 10/1000 μ l. O volume foi no total de 300 mL de cultura bacteriana para a extração dos plasmídeos através do método *salting-out*, e 300 mL de cultura bacteriana para extração de pDNA utilizando o kit Midiprep da Promega. Foi realizada a medição da OD (Densidade Óptica) por espectrofotometria das células em cultura no comprimento de onda a 600 nm, para observação da quantidade inicial de células antes da extração dos pDNA.

4.10 Análise dos produtos purificados por coluna de extração e por *salting-out* utilizando HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Neste método foi analisado o lisado bruto não precipitado com álcool isopropílico e o lisado bruto precipitado com álcool isopropílico. Também foi realizada a análise da amostra de pDNA purificada tanto com coluna de extração comercial (Midiprep

Promega), quanto o pDNA purificado pela técnica de *salting-out* proposta neste trabalho. O intuito foi realizar uma comparação dos plasmídeos purificados com os não purificados. Foi utilizado o HPLC (Shimadzu), acoplado com um detector na faixa do UV (SPD-20 AV Detector UV/VIS), onde foi estabelecido um protocolo para análise desses pDNA. Realizou-se o processo de modo que foi utilizada uma coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT tamanho 4,6x250, de numeração = 4253613, para identificação das biomoléculas presentes no meio.

Dois solventes foram utilizados. Na bomba A, o solvente utilizado foi água ultrapura e na bomba B o solvente usado foi acetonitrila. O programa foi de 0,0 min até 1,5 min da fase móvel, utilizando 100 % de água ultrapura como o solvente inicial. No intervalo entre 1,5 min e 20 min foi utilizado 100 % do solvente acetonitrila. Cada amostra foi diluída até a concentração de 50 ug/ml segundo Freitas e colaboradores, e cada injeção de amostra no aparelho procedeu-se em quantidades de 20 ul cada por injeção. A cada injeção realizada, a seringa era lavada com acetonitrila por cerca de 20 vezes de amostra para amostra. Realizou-se a corrida durante 20 min e observando onde os espectros cromatográficos se apresentavam no comprimento de onda da relação 260/280 nm, e também com o auxílio do software SHIMADZU LC SOLUTION, calculando a área do espectro emitido pelo aparelho e verificando se o intervalo da divisão dá área dos espectros gerados nos dois diferentes comprimentos de onda, equivaliam no final o valor de 1,8, valor este indicado para presença de pDNA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho foi balizado pela necessidade de elaborar um método rápido, barato para purificação de DNA plasmidial (pDNA) puro e em grandes quantidades para uso em procedimentos de transferência gênica em células eucariotas. Como modelo foi usado o procedimento de *salting-out* com sulfato de amônio proposto por Freitas e colaboradores, modificando o protocolo de modo a evitar os passos da cromatografia e dessaltação das amostras com colunas ou saco de diálise. Para substituir estes passos, nós foi desenvolvido um procedimento simples que permite a precipitação em álcool do pDNA tratado com sulfato de amônio, uma vez que a precipitação direta deste material não é possível.

Como já apresentado nos materiais e métodos, o protocolo consiste no tratamento do pDNA obtido por lise alcalina e precipitação em álcool isopropílico com sulfato de amônio 2 M. Para realizar o procedimento de precipitação foram testados os efeitos de dois álcoois (álcool isopropílico e álcool etílico) numa solução de sulfato de amônio 2M. No momento em que o álcool etílico foi adicionado, na quantidade padrão de 2 volumes, o sal precipitou. Por outro lado, a adição de 0,7 volumes de álcool isopropílico não causou a precipitação do sal; contudo, foi formado um sistema de duas fases o qual também afetaria a precipitação do pDNA. Assim, para avaliar o efeito da concentração do sal neste evento de precipitação, foram realizados testes com 4 concentrações diferentes de sulfato de amônio: 0,25; 0,50; 0,75 e 1 M. Observando a concentração máxima de sulfato de amônio para a qual não se formariam as duas fases ou a precipitação do sal.

Os resultados mostraram que o álcool etílico, mesmo em baixas concentrações salinas, precipitava o sulfato de amônio no momento em que entrava em contato com o mesmo. Por outro lado, quando utilizado o álcool isopropílico, a formação do sistema de duas fases aconteceu em concentrações de 0,75 M ou superior; contudo nas duas concentrações mais baixas testadas (0,25 M e 0,50 M), não foi possível a observação das duas fases (Tabela 1).

Tabela 1- Testes de precipitação de pDNA com Álcool Etilico e Álcool Isopropílico

| Álcoois Testados | Concentrações de Sulfato de Amônio(M) | | | |
|---|---------------------------------------|------|------|---|
| | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1 |
| Álcool Isopropílico (Formação de duas fases) | - | - | + | + |
| Álcool Etilico (Precipitação de Sal) | + | + | + | + |

(+) evento observado (-) evento não observado

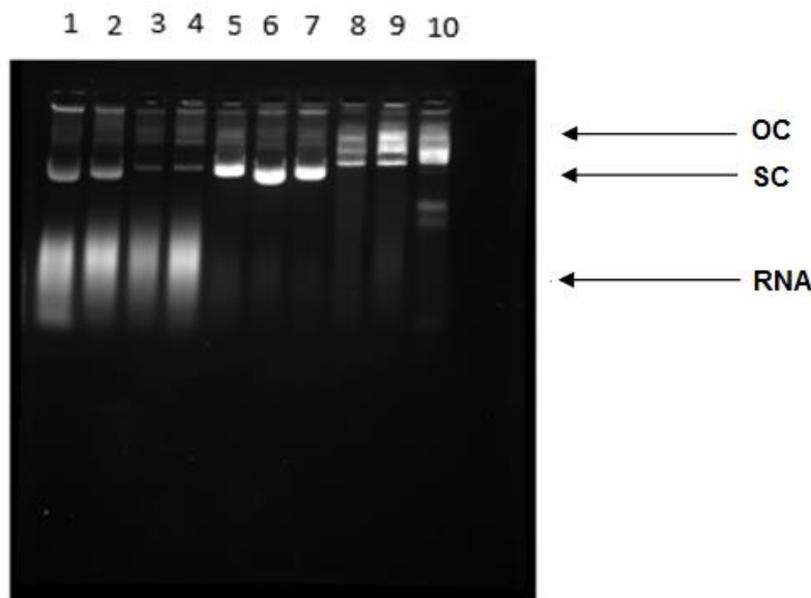
Fonte: O Autor

Assim, todas as amostras de pDNA purificadas pelo método de *salting-out* com sulfato de amônio foram diluídas para a concentração de 0,5 M antes de realizar o processo de precipitação com álcool isopropílico.

Após a determinação das potenciais condições de precipitação do pDNA foi testado o protocolo de Freitas e colaboradores, substituindo o processo de cromatografia e dessaltação pela precipitação do pDNA purificado em álcool isopropílico, após diluição da amostra para a concentração de sulfato de amônio 0,5 M. Testamos o efeito de distintas concentrações de sulfato de amônio (1 M, 2 M e 3 M) durante 10, 20 ou 30 minutos de tratamento a -20°C. Para visualização do resultado da purificação pós-precipitação, duas técnicas foram utilizadas, em primeira instância foi realizado um gel de agarose 0,8 % com os pDNA purificados e não purificados. Conforme demonstrado na Figura 3, a purificação pela técnica aqui proposta mostrou-se eficiente quando comparada com pDNA não purificado (lisado bruto precipitado em álcool isopropílico). Conforme esperado, o lisado bruto (sem tratamento) mostrou banda de pDNA correspondentes às conformações circular aberto e circular superhelicoidizado, e também um arraste intenso com tamanho inferior correspondente a RNA. No tratamento com concentrações de 1 M não foi possível observar a eficiência do sulfato de amônio na purificação, independentemente do tempo de tratamento, e os padrões de banda mostraram-se semelhantes àquele do lisado bruto. Na concentração de 2 M foi possível observar uma quantidade muito baixa de RNA nas amostras, as quais apresentaram bandas de pDNA SC de alta intensidade e o tempo de tratamento não apresentou diferenças visíveis. Na

concentração de 3 M também houve grande redução da banda correspondente ao RNA, mas houve um retardo do pDNA durante a eletroforese.

Figura 3: Imagem de gel de agarose 0,8%, para análise de pDNA expostos a diferentes concentrações de sulfato de amônio em diferentes tempo. Amostra 1: lisado bruto; amostras 2,3 e 4 produtos purificado com Sulfato de amônio 1 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente); amostras 5, 6 e 7 produtos purificado com Sulfato de amônio 2 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente); amostras 8, 9 e 10 produtos purificado com Sulfato de amônio 3 M (10, 20 e 30 minutos, respectivamente). As siglas OC (Open Circular) corresponde ao pDNA na conformação circular aberto e a sigla SC (Supercoiled Circular) corresponde a conformação circular superhelicoidizado.



Fonte: O Autor

Após avaliação em gel de agarose, para avaliar a aplicabilidade deste método em larga escala, repetimos o protocolo de tratamento do pDNA com sulfato de amônio 2 M durante 10 minutos a -20°C , em duplicata, e comparamos a quantidade de plasmídeo obtido com aquele obtido usando sistema de purificação comercial. A partir do mesmo volume de cultura bacteriana para ambos métodos, foram feitas amostras de 150 mL para purificação de pDNA avaliando a quantidade e qualidade obtida em cada método. Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados obtidos ao final do processo, onde foi obtida uma quantidade muito maior de pDNA a partir do método aqui proposto. Com o Kit midiprep da empresa Promega conseguimos uma concentração de $73,5 \mu\text{g/mL}$ de pDNA num volume final de 1 mL, já com nosso método conseguimos uma concentração de $300 \mu\text{g/mL}$ no mesmo volume final, sendo assim conseguimos cerca de 4 vezes a quantidade pDNA em relação ao kit comercial.

Tabela 2- Análise da quantidade de plasmídeo obtido nos diferentes métodos

| Métodos Utilizados | OD inicial | 260/280 nm | 260/230 nm | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|
| Midiprep Promega | 0,378 | 2,01 | 0,97 | 73.5 |
| <i>Salting-out</i> | 0,375 | 1,86 | 2,19 | 300 |

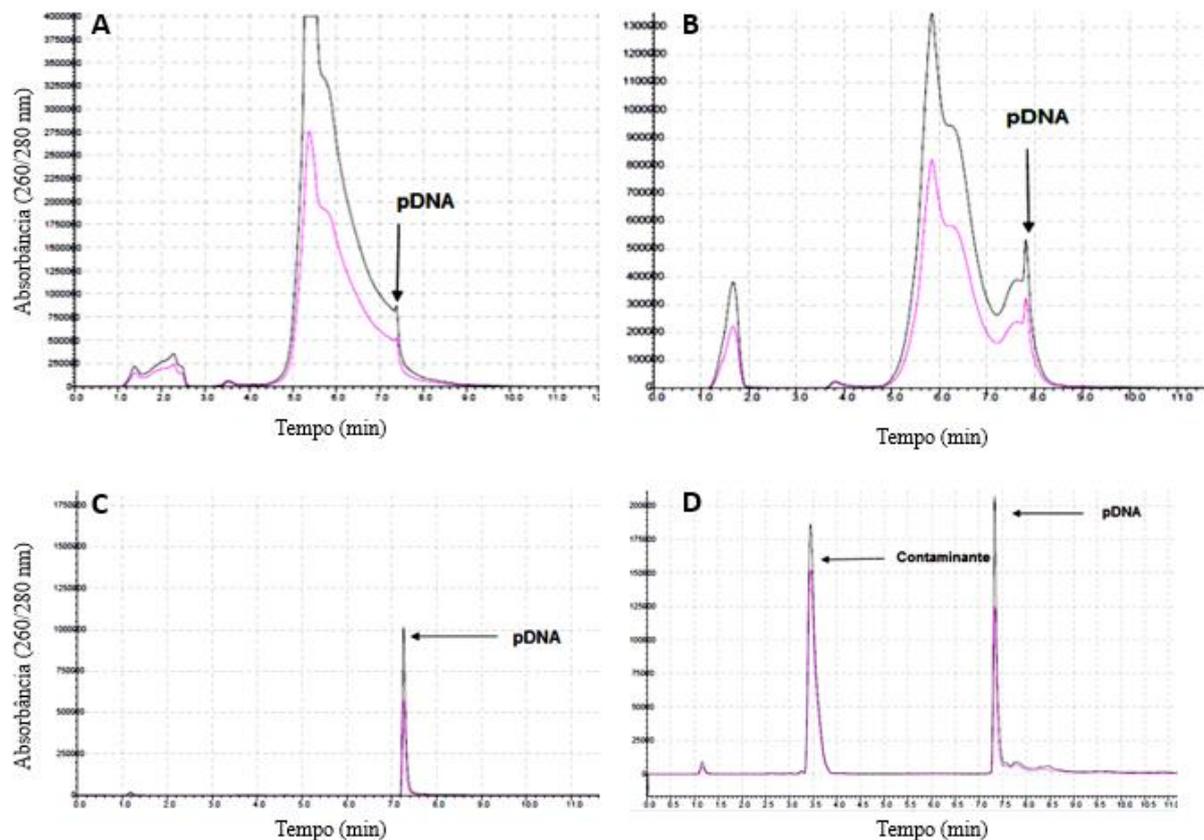
Fonte: O Autor

Os valores de pureza obtidos pelo método proposto foram compatíveis com outros protocolos que usaram sulfato de amônio, em outro sistema de purificação de pDNA já relatados como, por exemplo, a purificação de pDNA usando o sal em sistema de duas fases aquosas utilizando PEG (polietileno glicol) e sulfato de amônio (Ribeiro et al., 2001), (Gomes et al., 2009), (Trindade et al., 2005). Estes trabalhos utilizaram o sulfato de amônio não apenas para purificação, mas também para fornecer hidrofobicidade à molécula de pDNA para posterior análise por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC); contudo, somente o trabalho de Freitas e colaboradores o sal foi usado diretamente na técnica de *salting-out* para precipitação de diversas biomoléculas. Ao mesmo tempo, todos os trabalhos citados usaram purificação por cromatografia e posterior dessaltação em colunas comerciais.

Para comprovar a qualidade do plasmídeo obtido pelo método, aqui desenvolvido da mesma cultura bacteriana foi utilizado para realizar a purificação de pDNA, comparando o método aqui proposto e a purificação usando kit comercial (Midiprep Promega). Os produtos obtidos foram quantificados por espectrofotometria e sua pureza foi avaliada por HPLC. Como demonstrado na figura 4 A, o lisado bruto, sem a precipitação por álcool isopropílico nem purificação com sulfato de amônio, mostra uma grande quantidade de biomoléculas além do pDNA. Após a precipitação com álcool isopropílico algumas substâncias são removidas da amostra, mas a alta quantidade de contaminantes ainda continua grande (Figura 4 B). No entanto, após a purificação com sulfato de amônio e posterior precipitação em álcool isopropílico, a amostra apresentou um alto grau de pureza, compatível com os valores obtidos nas análises por espectrofotometria na avaliação das relações 260nm/280nm e 260nm/230nm (Figura 4 C). Na avaliação da purificação realizada com kit comercial as relações 260nm/280nm e 260nm/230nm apresentaram valores aceitáveis de pureza quando usada a solução de eluição do kit como branco da leitura; porém, quando foi usada água ultrapura como branco a relação 260nm/230nm apresentou valores baixos de pureza sugerindo a

presença de sais na própria solução na amostra. Na análise por HPLC foi possível observar a presença de contaminantes; contudo, as análises dos valores de absorbância em 260nm e 280nm do pico correspondente aos contaminantes sugere que estes não correspondem a ácidos nucleicos (Figura 4 D). Desta forma, podemos concluir que com o presente protocolo é possível obter-se pDNA de qualidade, similar àquele oferecido por kits comerciais que utilizam sistema de cromatografia em coluna.

Figura 4: Análises por HPLC de diferentes fases e métodos de purificação de plasmídeo. São mostrados gráficos representativos de A-lisado bruto; B- lisado bruto precipitado com álcool isopropílico; C- produto purificado pelo método de salting-out precipitado com álcool isopropílico; D- produto purificado com sistema comercial de cromatografia em coluna. A linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 260 nm e a linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 280 nm.



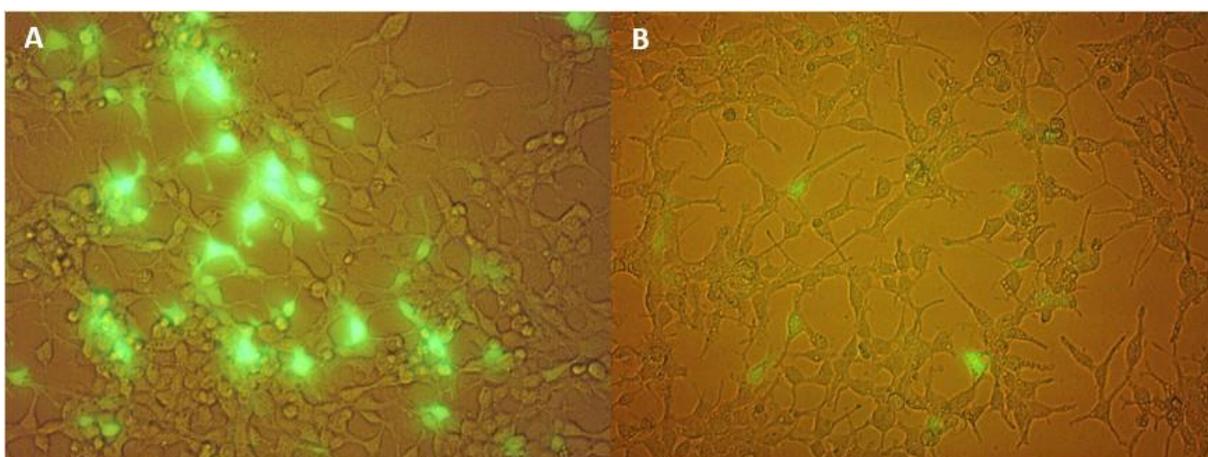
Fonte: O Autor

Um ponto importante a ser salientado nesta análise por HPLC é o fato de termos estabelecido o uso de colunas hidrofóbicas C18 que, embora sejam as mais utilizadas para análises de HPLC, não existe na literatura, ao menos no nosso conhecimento, nenhum trabalho otimizando para análise por este método. Na literatura encontramos alguns estudos que utilizam HPLC para análise de pDNA (Trindade et al.; 2005), (Gomes et al.; 2009);

entretanto, estes utilizam colunas diferentes às utilizadas neste trabalho, tanto no tamanho quanto no material empacotado, fazendo com que o espectros sejam diferentes. Isso pode ser devido ao tamanho da coluna, hidrofobicidade da substância empacotada e/ou solvente usado na fase móvel. Finalmente, sabendo da elevada pureza do plasmídeo obtido, nós realizamos testes de expressão do gene repórter EGFP com o objetivo de mostrar o produto obtido, além de puro, está funcional para protocolos de transferência gênica. Assim, realizamos a transfecção celular utilizando a técnica de lipofecção em células humanas da linhagem HEK, usando como controle positivo o plasmídeo purificado com kit comercial.

O plasmídeo purificado por *salting-out* mostrou eficiência de transfecção maior em relação ao plasmídeo purificado com o kit comercial. Inicialmente a fluorescência do gene repórter EGFP foi avaliada por microscopia, observando visualmente a quantidade de células transformadas e também a intensidade da fluorescência. Ambos parâmetros foram superiores no plasmídeo purificado por *salting-out* com sulfato de amônio Figura 5. Além disso, a avaliação da morfologia celular após transfecção indica que não houve danos estruturais nas células transformadas com plasmídeos de ambos protocolos, indicando também que o produto purificado por *salting-out* não possui resíduos citotóxicos.

Figura 5: Em **A** mostra as células da linhagem HEK lipofectadas com plasmídeos purificados pelo método *salting-out*, e em **B** as células da linhagem HEK lipofectadas com os plasmídeos purificados pelo kit Midiprep Promega. Visualmente é possível observar a maior intensidade de expressão do gene EGFP em células lipofectadas com plasmídeos purificados por *salting-out*.

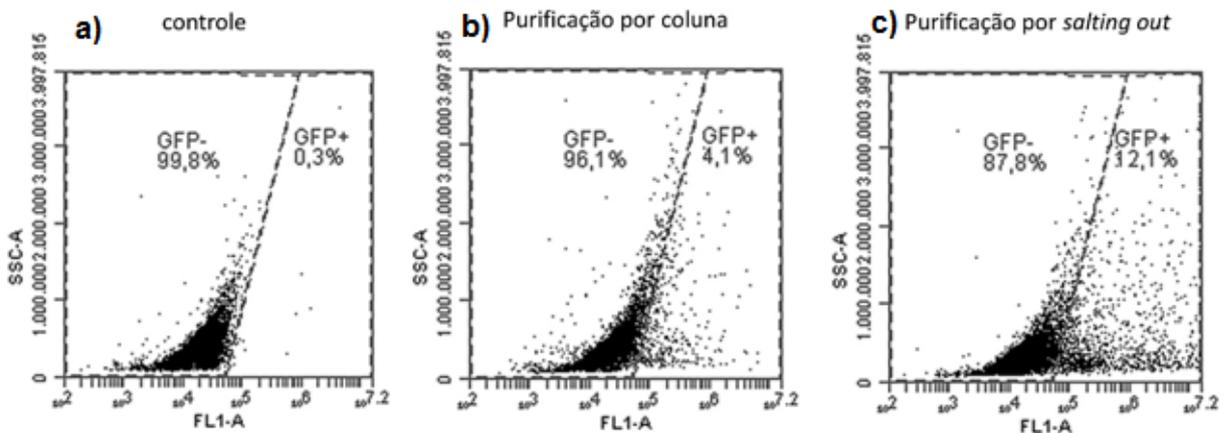


Fonte: O Autor

A análise da eficiência de transfecção das células HEK para ambos métodos de purificação foi analisada por citometria de fluxo, uma vez que este método fornece dados muito precisos do número de células transformadas e, concomitantemente, a intensidade da fluorescência

emitida em cada célula. Como demonstrados na Figura 6, a eficiência neste método de purificação foi aproximadamente 3 vezes superior em comparação com os plasmídeos purificados por coluna comercial.

Figura 6: A análise de citometria realizada em células transformadas com o plasmídeo pCR-BicolorRSV, purificado por diferentes métodos e comparando a eficiência da lipofecção e a eficiência do plasmídeo em expressar o gene EGFP.



Fonte: O Autor

As diversas análises realizadas neste trabalho como, espectrofotometria, HPLC, expressão gênica e citometria de fluxo, nos propiciou bons resultados para a purificação dos pDNA utilizando a técnica de *salting-out* obtendo resultados semelhantes ao de Freitas e colaboradores. A adaptação proposta nesse trabalho, foi extremamente eficiente, onde não foi necessário a utilização de sistemas cromatográficos e dessaltação das amostras, diferindo do trabalho de Freitas e colaboradores, sendo assim, diminuindo o valor da técnica de purificação de pDNA, em comparação com a purificação por HPLC e colunas de purificação comerciais.

Em relação a valores, nosso método de purificação em comparação com métodos comerciais custa em torno de 7 reais para purificação de até 100 mL de cultura bacteriana. Já o Kit da Promega para o mesmo fim, cada reação de purificação de 100 mL de cultura, custa em torno de 40 reais, uma diferença extremamente maior, e eficiência de purificação inferior que obtivemos com o *salting-out*. Também ressaltando que obtivemos uma maior concentração de pDNA utilizando *salting-out* do que em relação ao kit da Promega, sendo assim obtendo um custo-benefício maior que o kit comercializado.

Lamentavelmente, não existe trabalhos presentes na literatura para comparação de nossos dados referente a análise de expressão, somente em relação a análise cromatográfica, mas a com a utilização de outra técnica de purificação, que é o método de purificação do sistema de duas fases aquosas (Gomes et al., 2009; Prazeres et al., 1998; 1999; Trindade et al., 2005).

A análise cromatográfica foi extremamente interessante para comparar os métodos de purificação, mostrando a eficiência do método *salting-out*, frente a outros métodos de purificação de pDNA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos podemos salientar os seguintes pontos

- A partir da concentração de 2 M de sulfato de amônio foi perceptível a purificação do pDNA a partir das precipitações de biomoléculas como proteínas e RNA;
- Obtivemos uma concentração de pDNA cerca de 4x maior em relação ao que o kit Midiprep da Promega, a partir da mesma quantidade de meio de cultura bacteriana;
- As análises por HPLC mostraram a eficiência que obtivemos no processo de extração e purificação de pDNA, mostrando uma eficiência muito maior do método *salting-out*, em relação ao kit comercial utilizado neste trabalho;
- A funcionalidade do pDNA purificado por *salting-out* comprovou que o nosso produto além de estar em elevada pureza, é um produto funcional, comprovando não conter resíduos citotóxicos, obtendo resultados mais satisfatórios do que em relação aos pDNA purificados pelo kit da Promega;
- A citometria de fluxo nos mostrou uma análise quantitativa de células transformadas, onde conseguimos obter resultados muito satisfatórios. Células transformadas com os pDNA purificados por *salting-out* apresentaram eficiência cerca de 3 x maior que as células transformadas com os pDNA purificadas pelo kit da Promega.
- O trabalho contribui para um maior entendimento da técnica de *salting-out*, principalmente para precipitação de proteínas e outras biomoléculas em amostras de pDNA a serem purificadas;
- A partir dos resultados aqui obtidos, um artigo científico deverá ser elaborado com os dados presentes nesse trabalho.

6 Referências

ABERIN, CS.; FRANKLIN SG.; **Acetate-free purification of plasmid DNA on Hydroxyapatite.** Inte patent WO 02095047. (2002)

DELGADO-CAÑEDO, A.; DOS SANTOS, DG.; CHIES, JAB.; KVVITKO, K.; NARDI, NB.; **Optimization of an electroporation protocol using the K562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNAses.** Cytotechnology, 51: 141-148. (2006)

FERREIRA, GNM.; CABRAL, JMS.; PRAZERES, DMF.; **Development of process flow sheets for the purification of Supercoiled Plasmids for Gene Therapy applications.** Biotechnology Progress, 15: 725-731. (1999)

FREITAS, SS.; SANTOS, JAL.; PRAZERES, DMF.; **Optimization of Isopropanol and Ammonium Sulphate Precipitation steps in the purification of plasmid DNA.** Biotechnology Progress, 22: 1179-1186. (2006)

GOMES, GA.; AZEVEDO, AM.; BARROS, MRA.; PRAZERES, DMF.; **Purification of plasmid DNA with aqueous two phases system of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate.** Separation and Purification technology, 65: 22-30. (2009)

HORN, NA.; MEEK, JA.; BUDHAZI, G.; MARQUET, M.; **Cancer Gene Therapy usina Plasmid DNA: Purification of DNA for Human Clinical Trials.** Human Gene Therapy, 6: 565-573. (1995)

JUNGBAUER, A.; **Continuous downstream processing of biopharmaceuticals.** Trends Biotechnology, 31: 479-492. (2013)

MANIATIS, T.; FRITSCH, EF.; SAMBROOK, J.; **Molecular cloning: a laboratory manual.** Colds Spring Harbor Laboratory Press, 24: 1. (1982)

MESQUITA, RA.; ANZAI, EK.; OLIVEIRA, RN.; NUNES, FD.; **Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica de PCR.** Pesquisa Odontológica Brasileira, 15: 314-319. (2001)

MILLER, AS.; DYKES, DD.; POLESKY.; **A simple salting out procedure for extranting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Research, 16: 1215-1229. (1988)

MIRICA, KA.; LOCKETT, MR.; SNYDER, PW.; SHAPIRO, ND.; MACK, ET.; NAM, S.; WHITEDIDES, GM.; **Selective preparation and purification of monovalentes proteins using oligovalents ligands and sulfate de ammonium.** Bioconjugate Chemistry, 23: 293–299. (2012).

POH, JJ.; GAN, SKE.; **Comparasion of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction.** Bioscience reports, 34: 620-634. (2014).

PRAZERES DMF, SCHLUEP T, COONEY C.; **Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography.** Journal of Chromatography, 806: 31-45. (1998)

PRAZERES, DMF.;FERREIRA, GNM.; MONTEIRO, GA.; COONEY, CL.; CABRAL JMS **Large-Scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks.** Tibtech, 17: 169-174. (1999)

RIBEIRO, SC.; MONTEIRO, GA.; CABRAL, JMS.; PRAZERES, DMF.; **Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phases systems.** Biotechnology and Bioengineering, 78: 376-384. (2001)

RIVERO, ERC.; NEVES, AC.; SILVA-VALENZUELA, MG.; SOUSA, SOM.; NUNES, FD.; **Simple salting-out methos for DNA extraction from formalina-fixed, paraffin-embedded tissues.** Pathology-Research and Practice, 202: 523-529. (2006)

STADLER J, LEMMENS R, NYHAMMAR T.; **Plasmid DNA purification.** The journal of gene medicine, 1: 54-66. (2004)

TRINDADE, IP.; DIOGO, MM.; PRAZERES, DMF.; MARCOS, JC.; **Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two phases extration and hydrophobic interaction chromatography.** Journal of Chromatography A, 1082:176-184. (2005).

VARGAS, AE.; MARKOSKI, MM.; CAÑEDO, AD.; SILVA, SHD.; NARDI, NB.;**Genetic Modification of Mesenchymal Stem Cells.** Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J), 879: 479-490. (2012)

