

# Produção de sonda de DNA diretamente biotinizada com N-hidroxisuccinimida biotina (BNHS)

## Labeling DNA probes directly coupled with biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS)

SONGELÍ MENEZES FREIRE<sup>1</sup>, IVANA NASCIMENTO<sup>2</sup>, JUÇARA SIMÕES<sup>3</sup>, MARIA DE FÁTIMA DIAS COSTA<sup>4</sup>, ROBERT EDUARD SCHAER<sup>2</sup>, ROBERTO MEYER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

<sup>2</sup> Professor de Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

<sup>3</sup> Farmacêutica-Bioquímica. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

<sup>4</sup> Professora de Bioquímica. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

### Resumo

A utilização de sondas de DNA para análise genômica em fase sólida tem se expandido e ultrapassado as áreas da pesquisa, estendendo-se ao terreno do diagnóstico de rotina nas áreas de medicina humana e animal, bem como nas ciências forenses. Estas sondas têm sido utilizadas desde o surgimento da primeira técnica de hibridização descrita com o *southern blotting*, que envolve a imobilização, em filtros de papel, de fragmentos de DNA separados eletroforéticamente. Outra técnica descrita como o *dot*-hibridização é menos complexa do que o *southern* convencional por não requerer o passo prévio de eletroforese e por ser menos exigente quanto à qualidade do DNA, já que dispensa a digestão com enzima de restrição. A marcação mais comum para estas sondas é o fósforo radioisótopo (<sup>32</sup>P), que, apesar de sua alta sensibilidade, apresenta os inconvenientes de risco físico, necessidade de autorização para manipulação de radioisótopos, alto custo e uma vida média muito curta. Uma série de alternativas para o <sup>32</sup>P têm sido utilizadas, com marcas diretas ou secundárias, entre elas a biotina, que tem mostrado grandes vantagens e tem sido usada também em laboratórios especializados e bem equipados. Este trabalho descreve uma modificação do método clássico descrito para sondas de DNA acopladas por biotina hidrazida. Utilizamos a N-hidroxisuccinimida biotina (BNHS) em dimetilformamida, para marcar resíduos de citosina disponíveis em segmentos de fita simples de DNA extraído de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A variação da proporção de biotina e de DNA, bem como sua especificidade e sensibilidade, foram cuidadosamente testadas e criteriosamente analisadas através de ensaios de hibridização, adsorvendo-se DNA cromossômico do *C. pseudotuberculosis* e outros DNAs em papel de nitrocelulose, seguindo-se a incubação com as sondas biotinizadas descritas, avidina-peroxidase e revelação com 4-cloro-1-naftol. Os resultados mostraram que a sonda de DNA produzida tem as características favoráveis esperadas. Desde que não é necessário o *nick translation* nem a utilização de material radioativo ou mesmo de hidrazida, sondas deste tipo podem ser utilizadas no auxílio do diagnóstico de infecções por *C. pseudotuberculosis* e outros microorganismos.

### Palavras-chave

Biotinilação, sonda de DNA, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, N-hidroxisuccinimida biotina, hibridização de DNA

---

Prof<sup>á</sup> Songelí Menezes Freire  
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular  
Departamento de Biointeração  
Instituto de Ciências da Saúde  
Universidade Federal da Bahia  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela  
40.110-100 Salvador, Bahia, Brasil  
e-mail: labimuno@svn.com.br / songeli@ufba.br

## Introdução

A utilização de sondas de ácido nucléico para análise genômica em fase sólida tem se expandido para as áreas de diagnóstico de rotina, e diferentes metodologias são desenvolvidas com o propósito de produção destas sondas (LEARY; BRIGATI; WARD, 1983; TENOVER; UNGER, 1993).

Embora seja clássico o isolamento, a identificação e a classificação bacteriológica de microrganismos por baterias e provas bioquímicas, a dificuldade de execução de alguns testes para inúmeros patógenos tem impossibilitado o diagnóstico preciso inicial e precoce de algumas infecções. Em alguns casos, pode ser suficiente concluir o diagnóstico de forma indireta, através da demonstração da presença de anticorpos por diversos métodos imunodiagnósticos como o ELISA, a imunohistoquímica e a imunofluorescência para uma série de patologias. Entretanto, este dado infere o possível contato do hospedeiro com o patógeno, que pode ter ocorrido em um momento anterior, além de não informar, com precisão, as diferentes espécies e gêneros de microrganismos. Em vários casos, torna-se indispensável a determinação do agente etiológico, o que requer a identificação direta do patógeno.

Após desenvolver trabalhos com métodos indiretos de diagnósticos baseados na identificação ou mesmo quantificação de anticorpos contra o agente da linfadenite caseosa, o nosso grupo resolveu desenvolver uma sonda de DNA de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, como alternativa futura de ampliação do estudo molecular deste microrganismo.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um coccobacilo Gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos, e encontra-se amplamente distribuído em populações animais, causando linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, linfagite ulcerativa peitoral e abscessos abdominais em cavalos. Também ocorrem infecções em bovinos e humanos (JOLLY, 1965; SONGER et al., 1990; PEEL et al., 1997). *C. pseudotuberculosis* é filogeneticamente relacionado com o *Mycobacterium tuberculosis* (PASCUAL

et al., 1995; SIMMONS; HODGSON; STRUGNELL, 1998).

A linfadenite caseosa é uma doença infecciosa crônica, cuja transmissão se dá principalmente através da pele, pelo contato de animais sadios com animais portadores de abscessos que evoluem até a supuração (SIMMONS; HODGSON, STRUGNELL, 1997; SIMMONS et al., 1998), entretanto, a transmissão também acontece por aerossóis, através do leite e por vetores como moscas (ELLIS et al., 1987; PATON et al., 1995; BRAVERMAN et al., 1999). A introdução de um animal infectado em um rebanho sadio resulta em aparecimento de abscessos nos animais ao longo de dois a três anos ou mesmo antes deste período (RIBEIRO et al., 1991), e a erradicação da doença torna-se extremamente difícil (ALVES; OLANDER, 1999).

O presente trabalho foi realizado objetivando a produção de uma sonda não radioativa de DNA para diagnóstico molecular, como alternativa ao método clássico de cultura bacteriológica, que possibilite a identificação deste microrganismo nas amostras de biópsias, e aos métodos indiretos de detecção de anticorpos por imunodiagnóstico, já desenvolvidos no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS (OLIVEIRA et al., 1992).

## Materiais e métodos

### Cultura do microrganismo

A cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi mantida e cultivada pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), segundo metodologia clássica descrita por OLIVEIRA et al. (1992) com pequenas modificações. As colônias foram semeadas em meio BHI por 48 horas a 37°C, e a cepa foi, então, cultivada em meio ágar-triptose lactoalbumina, enriquecido com extrato de levedura, durante 72 horas, em garrafas de Roux. A cultura com a suspensão bacteriana em fase de crescimento logarítmico foi, então, lavada três vezes com NaCl 0,15 M tamponada com fosfato 0,015 M, pH 7,4 (STF), seguindo-se lavagem com tampão Tris-HCl 10 mM, contendo 1 mM de EDTA pH 8 (Tris-HCl-EDTA).

### Extração do DNA

A técnica utilizada para extração do DNA foi realizada segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989a) com modificações baseadas em Leary, Brigati e Ward (1983) e Reisfeld et al. (1987). Após a última centrifugação a 3.000 g a 4°C durante 30 min, o precipitado foi pesado, e 1 mg de massa úmida bacteriana foi ressuspenso em 5,5 ml de Tris-HCl. As células foram lisadas por adição de 1ml de RNAse (10 mg/ml) e 10 ml de lisozima (50 mg/ml) em banho de gelo durante 5 minutos, seguidos de 100 ml de uma solução de SDS 2,5% em 100 mM Tris-HCl e 0,25 mM de EDTA pH 8. Após agitação, 120 ml de acetato de amônio 8M foram adicionados, e a amostra foi incubada durante 15 minutos sob agitação vertical. Após centrifugação, adicionou-se ao sobrenadante 0,6 volumes de isopropanol. O precipitado de DNA foi lavado com etanol e, posteriormente, diluído em 50 ml de tampão Tris-HCl-EDTA. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose, e a concentração e a pureza foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260 e 280 nm, segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989a).

### Biotinilação da sonda

A padronização da biotinilação foi realizada segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989b) com modificações baseadas em Leary et al. (1983) e Reisfeld et al. (1987), empregando-se algumas variações, quando foram utilizados 100 ml de diversas concentrações entre 1 mg/ml e 100 mg/ml de DNA de *C. pseudotuberculosis* previamente extraído e anteriormente desnaturado a 100°C por 10 minutos. A reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo e amostras de DNA foram diluídas em Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8 e incubadas a 4°C com 2 ml de diferentes concentrações de éster de biotil-N-hidroxisuccinimida [BNHS] (Sigma) entre 0,15 a 0,50 mM em dimetilformamida (Sigma) (0,25 e 0,50 mM) em períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram dialisadas contra STF e congeladas a -20°C.

### Dot-hibridização

Realizado em membranas de nitrocelulose (Sartorius) após adsorção de 2 ml de DNA a ser testado (1 mg/ml de DNA genômico alvo, de várias origens) com aparelho de dot com pressão negativa. Após secagem, as membranas foram testadas separadamente com 1 mg/ml de sonda em bolsas plásticas seladas, em uma pré-hibridização por 4 horas a 42°C, seguida da hibridização propriamente dita durante 16 horas a 42°C.

Para o controle de sua especificidade, a sonda foi incubada com o DNA de *C. pseudotuberculosis*, *L. interrogans pomona*, *L. interrogans icterohaemorrhagiae* e *L. biflexa* e de bacteriófago lambda gt11.

A sensibilidade da sonda foi testada adsorvendo o DNA biotilado em diferentes concentrações e posterior revelação direta de cor, pela técnica descrita a seguir.

A detecção da atividade da sonda após hibridização das membranas lavadas com STF foi realizada por incubação das membranas com BSA 3% em STF a 37°C durante uma hora e incubadas, então, com avidina-peroxidase (Sigma) na concentração de 1 mg/ml durante 1 hora a 37°C. Após lavagem com Tris-HCl 0,05 M, a reação foi observada mediante incubação rápida com a solução reveladora contendo um volume de 4-cloro-1-naftol 0,3% em metanol e quatro volumes de Tris-HCl 0,05 M contendo 0,2 M de NaCl e 0,33 ml/ml de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30%. A reação foi interrompida com lavagem da membrana com água destilada.

## Resultados e discussão

Os resultados obtidos nas diversas situações mostram que as amostras de 100 ml de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* contendo de 0,8 a 1 mg adicionados a 2 ml de 0,5 mM de BNHS produziram sondas com maior sensibilidade quando testadas, tanto diretamente adsorvidas no papel de nitrocelulose, quanto nos testes de hibridização (FIG. 1 e 2).

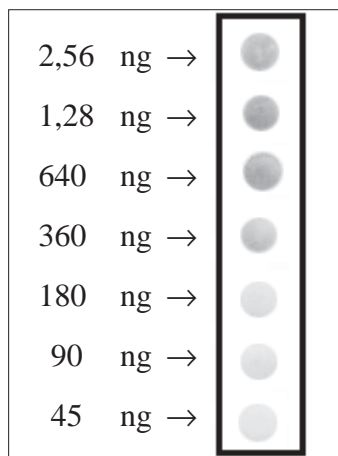


FIGURA 1 - Revelação da aplicação direta da sonda de DNA de *C. pseudotuberculosis* (diaminobenzidina)

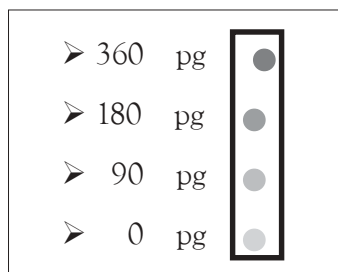


FIGURA 2 - Hibridização da sonda genômica de DNA de *C. pseudotuberculosis* com *C. pseudotuberculosis* como alvo

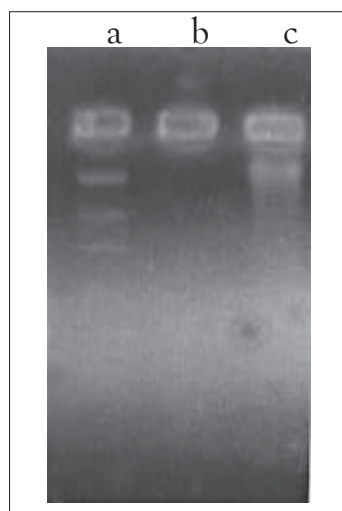


FIGURA 3 - Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,3% corado com brometo de etídio. a) Padrão de PM de DNA; b) Tampão de amostra de DNA; c) DNA extraído de *C. pseudotuberculosis*

A marcação do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* foi realizada em diferentes concentrações, adicionando-se também diferentes concentrações de N-hidroxissuccinimida-biotina (BNHS) e variando o tempo de incubação para a conjugação entre 12 e 96 horas a 4°C. O perfil eletroforético do DNA purificado e utilizado para obtenção da sonda biotinilada encontrava-se em bom estado, conforme pode-se observar no gel de agarose (FIG. 3).

Surpreendentemente, o tempo de incubação desta mistura também mostrou que sondas com as mesmas características de sensibilidade foram obtidas indiferentemente nos tempos entre 24 e 96 horas de incubação. Pode-se associar, às condições experimentais apresentadas, as características do DNA utilizado para sonda que, provavelmente, no tempo mínimo de reação, já tinham saturado os resíduos disponíveis para biotinilação e que os mesmos permaneceram estáveis durante o tempo subsequente de incubação.

Quanto à sua especificidade, as sondas de *C. pseudotuberculosis* foram testadas com DNA de *L. interrogans pomona*, *L. interrogans icterohaemorrhagiae* e *L. biflexa* e de bacteriófago lambda gt11. Os resultados observados (FIG. 4) mostram especificidade de interação entre as fitas de DNA do *C. pseudotuberculosis*, com a ausência de reatividade inespecífica com as outras amostras de DNA.

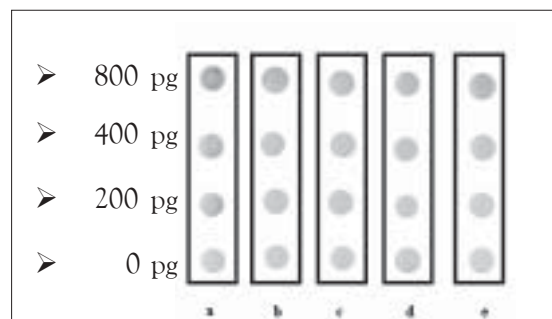


FIGURA 4 - Hibridização da sonda genômica de A de *C. pseudotuberculosis* com: a) *C. pseudotuberculosis*; b) *Leptospira biflexa*; c) *Leptospira interrogans pomona*; d) *Leptospira interrogans icterohaemorrhagiae*; e) Bacteriófago lambda gt11.

O método utilizado na produção da sonda baseia-se na interação da biotina com resíduos não pareados de citosina, facilitada pela ação da dimetilformamida. Os resultados encontrados permitem concluir que as sondas de DNA diretamente biotiniladas com BNHS em dimetilformamida podem ser úteis para o desenvolvimento de sondas para detecção específica de diferentes microrganismos.

A sensibilidade obtida em hibridização com a detecção de até 180 pg de DNA (FIG. 1) foi menor do que a descrita por REISFELD et al. (1987), que conseguiram detectar até 0,9 pg com sondas marcadas com biotina hidrazida em náilon. Entretanto, tal nível de sensibilidade pode ter sido alcançado por haver o autor trabalhado com amostras de DNA puro e homogêneo (DNA de espermatozoides de salmão) e com sonda radiomarcada com  $^{32}\text{P}$ , ao invés de DNA cromossomal bacteriano e marca fria não radioativa utilizados no presente trabalho. Entre as vantagens de se trabalhar com BNHS sem a hidrazida, pode-se citar a rapidez e eficiência da técnica, o baixo custo e a possibilidade de sua utilização em identificação de amostras para estudos *in situ*.

## Abstract

The use of DNA probes in gene analyses in a solid phase has expanded from research to routine diagnosis in medicine or veterinary plant breeding and forensic science. Those probes have been used since the introduction of the hybridization technique described as southern blotting, which involves the immobilization of electrophoretically separated fragments of DNA onto a filter, followed by hybridization to specific DNA probe sequence. Another technique described as dot hybridization is less complex than the conventional southern blotting; no electrophoretic step is required and it is less demanding on DNA quality because no digestion with restriction enzyme is performed. The most commonly used label in those probes is the radioisotopic  $^{32}\text{P}$  Phosphorus, which needs authorization for using; it is expensive, hazardous, and has extremely short lifetime besides its high sensitivity. A lot of alternatives to  $^{32}\text{P}$  label have been used, with direct or secondary labels. Among them, the biotin-labeled probes have shown great advantages and have successfully been used in specialized and well equipped laboratories. This study reports a modification of the classical method described for DNA probes coupled by hydrazide biotin (REISFELD, 1987). In our work we have used biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS) in dimethylformamide to label cytosine residues of available single-stranded DNA segments extracted from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The variation in the rate of biotin and DNA as well as its specificity and sensibility were carefully tested and criteriously analyzed by adsorption genomic DNA of *C. pseudotuberculosis* and other DNAs in nitrocellulose paper followed by incubation with previously mentioned biotinylated probes, peroxidase avidine and revealed with peroxide hydrogen and 4-chloro alpha naphthol. The results showed that the produced DNA probe have the desired good characteristics. This alternative method, which can be employed with the DNA of other microorganisms, may produce, in an easier way, non-radioactive probes, making that procedure less expensive, more rapid and safer since the nick translation is not necessary, neither the use of radioactive products nor the use of hydrazide. This specific probe can be used on the diagnosis of *C. pseudotuberculosis* infection in goats and sheep.

## Key words

Biotinilation, DNA Probe, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester, DNA hybridization.

## Conclusões

1) Os resultados encontrados mostram o sucesso da utilização da técnica de biotinilação direta de sondas de DNA com BNHS em dimetilformamida de produção rápida, fácil, eficiente e de baixo custo.

2) O DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* na concentração de 0,8 a 1 mg em 100 ml acrescidos de 2 ml de 0,5 mM de BNHS produziu sondas com maior sensibilidade.

3) A sensibilidade da sonda obtida nas condições apresentadas por esta metodologia mostrou ser de 180 pg em nitrocelulose e de 90 pg de DNA, quando testada por hibridização.

4) O tempo de incubação desta mistura, também testado, mostrou que sondas com as mesmas características de sensibilidade foram obtidas nos diferentes tempos entre 24 e 96 horas de incubação.

5) As sondas de *C. pseudotuberculosis* mostraram especificidade, não hibridizando durante a incubação com os DNAs de *L. interrogans pomona*, *L. interrogans icterohaemorrhagiae* e *L. biflexa* e de bacteriófago lambda gt11.

## Referências

- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Vet. Notícias**, Uberlândia, v. 5, n. 1, p. 69-75, 1999.
- BRAVERMAN, Y. et al. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Rev. Sci. Tech.**, v. 18, n. 3, p. 681-690, 1999.
- ELLIS, T. M. et al. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 64, n. 9, p. 261-263, 1987.
- JOLLY, R. D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Comp. Pathol.**, n. 75, p. 417-431, 1965.
- LEARY, J. J.; BRIGATI, D. J.; WARD, D. C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA-probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bio-blot. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 80, p. 4045-4049, 1983.
- OLIVEIRA, S. C. et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): optimal condition to detect antibodies produced against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 149-151, 1992.
- PASCUAL, C. et al. Phylogenetic analysis of genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, n. 45, p. 724-728, 1995.
- PATON, M. W. et al. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 72, n. 7, p. 266-269, 1995.
- PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 2, p. 185-191, 1997.
- REISFELD, A. et al. Non radioactive hybridization probes prepared by reaction of biotin hydrazide with DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 142, n. 2, p. 519-526, 1987.
- RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 461-465, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA. In: \_\_\_\_\_. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989a. v. 1, p. 6.3-27.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes. In: \_\_\_\_\_. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989b. v. 2, p. 10.2-70.
- SIMMONS, C. P.; HODGSON, A. M.; STRUGNELL, R. A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium Pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 3048-3056, 1997.
- SIMMONS, C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.
- SONGER, J. G. et al. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 1, p. 131-136, 1990.
- TENOVER, F. C.; UNGER E. R. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In: PERSING, D. H. et al. (Ed.) **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. New York: American Society for Microbiology, 1993. cap. 1. p. 3-25.