

PRÁTICA - 3

Nome:

Diferenciação Linear dos Cromossomos Nº USP:

► Contextualização

A diferenciação linear dos cromossomos é de suma importância para o preciso pareamento de homólogos no processo de cariotipagem. A perfeita identificação dos homólogos com base em uma série de marcadores ao longo dos cromossomos é importante para a identificação de alterações em sua estrutura. Além disso estes marcadores são referenciais para o mapeamento físico de genes culminando com a integração de mapas genéticos, citogenéticos e genômicos. Nesta aula será apresentada a metodologia para a obtenção de diferentes tipos de marcas; sua correlação com a estrutura da cromatina e as formas de leitura dos marcadores cromossômicos.

► Questões

Bandamento-C

- 1.) Descreva a metodologia de obtenção do bandamento-C
- 2.) Que tipo de estrutura cromossômica é revelada por esta metodologia?
- 3.) Descreva alguma características destas regiões
- 4.) Faça um esquema da metáfase observada no microscópio
- 5.) Faça um breve relato do que se pode extrair de informações da prancha de cariótipos de milho corados pela metodologia do bandamento-C
- 6.) Observe a metáfase mitótica de humanos:
 - 6.1.) A que estrutura estão associadas às bandas-C em humanos?
 - 6.2.) Descreva a característica dos cromossomos sexuais com base no bandamento-C? O que se pode dizer a respeito da estrutura da cromatina com base nestas observações? O que pode ser dito com relação ao número de genes destes cromossomos?

Bandamento-G

- 1.) Descreva a metodologia de obtenção do bandamento-G

-
- 2.) Que tipo de estrutura cromossômica é revelada por esta metodologia?
 - 3.) Descreva alguma características destas regiões
 - 4) Faça um breve relato do que se pode extrair de informações da prancha de cariótipos de milho corados pela metodologia do bandamento-C

Bandamento por Fluorocromos

- 1.) Qual é o princípio químico para o aparecimento das bandas no bandamento por fluorocromos?
- 2.) O que são competidores não fluorescentes?
- 3.) Observe a prancha com metáfase mitóticas de *Crotalaria juncea* (Leguminosae-Papilionoideae):
 - 3.1.) Quantos cromossomos esta espécie possui?
 - 3.2.) Esta espécie possui regiões ricas em AT? Como se chega a esta conclusão?
 - 3.3.) Esta espécie possui regiões ricas em GC? Como se chega a esta conclusão?
 - 3.4.) Faça uma interpretação geral sobre a estrutura genômica da *C. juncea* com base nos dados apresentados nesta prancha [busque informações com os monitores e com o professor]
- 4) O fluorocromo Quinacrina tem afinidade por qual tipo de sequência de DNA?
 - 4.1.) Com base nesta constatação volte a prancha de bandamento-G e observe cariótipo humano corado com quinacrina:
 - 4.1.a.) Existe uma correlação entre o padrão de bandamento-G e bandamento com quinacrina nos genoma humano?
 - 4.1.b.) Com base nesta correlação o que se pode concluir sobre a natureza das sequências de DNA que estão presentes nas bandas escuras do bandamento-G?
 - 4.1.c.) O que poderíamos inferir sobre a natureza das sequências de DNA que estão presentes nas bandas claras do bandamento-G?

Bandamento-NOR ou Bandamento Ag-NOR

- 1.) Descreva a metodologia de obtenção do bandamento-NOR
-

- 2.) Qual é a especificidade ou a afinidade da prata que que haja precipitação?
- 3.) O que se pode observar por esta metodologia?
- 4) Observe a metáfase mitótica de *Allium sativum* focalizada no microscópio. Faça um esquema e interprete.
- 5.) Observe a prancha de *Crotalaria juncea*. Faça uma interpretação.
- 6.) Qual é a correlação existente entre genes ribossomais 18S-5.8S-26S, constrição secundária e nucléolo.

Hibridização Molecular *In Situ* Fluorescente - FISH

- 1.) O que é uma sonda de DNA?
- 2.) Quais as metodologias para a obtenção de uma sonda de DNA?
- 3.) Descreva a metodologia do FISH?
- 4) Descreva o princípio molecular da metodologia de FISH
- 5.) Como se dá o processo de detecção da sonda?
- 6.) Observe a metáfase mitótica humana apresentada:
 - 6.1.) Faça uma interpretação da figura.
 - 6.2.) Descreva que tipo de sonda foi utilizada.
 - 6.3.) Qual é a relação existente entre o resultado da FISH e do bandamento-C de humanos?

Referências

- Guerra, M., & Souza, M. D. (2002). Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Singh, R. J. (2002). Plant cytogenetics. CRC press.
-

▶ **Apêndice**

Obtenção de raízes

➔ Sementes de milho :

Embeber as sementes em água destilada (use uma placa de Petri pequena).

Germinar as sementes em Sphagnun umedecido, em banho-maria a 28o C, em sala climatizada (28oC).

➔ Bulbo ou sementes de cebola:

Colocar bulbos de cebola sobre um recipiente contendo água, para germinação das raízes ou germinar sementes como no ítem a.

Cortar as raízes com 1 cm e tratá-las com solução aquosa de colchicina 0,1%, durante 5 horas em temperatura ambiente (26 - 28 oC).

➔ Estacas de Passiflora:

Para a obtenção de um grande número de raízes para a rotina de trabalho as estacas são cultivadas em copos de plásticos contendo o substrato Plantmax composto de vermiculita, turfa e cascas vegetais processadas, e após 15 a 20 dias as primeiras raízes emergentes são coletadas. As estacas são desenvolvidas em telado.

Pré-Tratamentos de raízes

Milho: Após 2-3 dias, coletar raízes, com 1 cm de comprimento em:

Hidroxiquinolina a 300ppm (0,03%), por 2:30 horas ou

Hidroxiquinolina a 600ppm + Cicloheximida a 6,25 ppm, por 2:30 horas (Concentração final da solução : H a 300ppm + C a 3,12ppm).

Passiflora: Após 15 a 20 dias as primeiras raízes emergentes são coletadas em Hidroxiquinolina a 600 ppm + Cicloheximida a 6,25 ppm, por 2:30 horas (Concentração final da solução: H a 300ppm + C a 3,12 ppm).

Cebola: Cortar as raízes com 1 cm e tratá-las com solução aquosa de colchicina 0,1%, durante 5 horas em temperatura ambiente (26 - 28 °C).

Fixação

Transferir as raízes para fixador de Carnoy (3 partes em álcool etílico absoluto: 1 parte de ácido acético glacial P.A) deixando pernoitar em temperatura ambiente .

Transferir o material para álcool a 70% (duas trocas) e manter em geladeira (para coloração pelo método de Feulgen).

Coloração pelo método de Feulgen

- 1.Retirar o material (raízes conservadas em álcool a 70%) da geladeira com antecedência, deixando atingir a temperatura ambiente.
 - 2.Lavar as raízes em água destilada por 5 minutos.
 - 3.Hidrólise Ácida: colocar o material em HCL 1 N, 60°C durante 8 minutos.
 - 4.Lavar o material em água destilada por 5 minutos.
 - 5.Colocar as raízes em Reativo de Schiff, em frascos escuros, tampados. Conservar o frasco em ambiente escuro, deixando corar por 45 minutos.
 - 6.Lavar as raízes em água corrente, por 10 minutos.
-

