

AULA PRÁTICA: ANÁLISE DE GENÓTIPO PELA TÉCNICA DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.

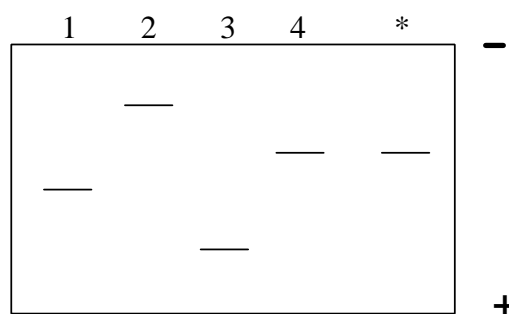
Introdução

Nesta aula, usaremos a PCR para determinar o genótipo de alguns estudantes da classe. Usaremos raiz de cabelo como fonte de DNA genômico, e analisaremos um locus chamado D1S80, que apresenta um alto grau de polimorfismo.

Marcadores genéticos polimórficos têm sido amplamente utilizados em diagnósticos de doenças, análise de paternidade, e análises forenses. O locus D1S80 contém um Número Variado de Repetições em Tandem ("Variable Number of Tandem Repeats" ou VNTR, em inglês). Como o termo implica, este locus apresenta um trecho de DNA que é repetido em graus variados em cada pessoa. Como um exemplo hipotético simplificado, digamos que a unidade de repetição consista dos 2 nucleotídeos, CG. Se sequenciarmos esta região do locus D1S80 de quatro indivíduos diferentes, poderemos ver o seguinte:

Indivíduo 1	ATGCCGTATTACGCGCGCGCGCGCGCCTATTAGGTATTAG
Indivíduo 2	ATGCCGTATTACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCCTATTAGGTATTAG
Indivíduo 3	ATGCCGTATTACGCGCGCGCCTATTAGGTATTAG
Indivíduo 4	ATGCCGTATTACGCGCGCGCGCGCGCGCCTATTAGGTATTAG

Neste exemplo, existem quatro alelos deste VNTR com quatro comprimentos diferentes. Se analisarmos os produtos de PCR destes quatro indivíduos por eletroforese em gel de agarose, observaríamos 4 bandas de tamanhos diferentes ($2 > 4 > 1 > 3$). Em um estudo criminal, poderemos ter quatro suspeitos e um DNA coletado na cena do crime (*). O gel resultante da amplificação do locus por PCR é mostrado na Figura 1.



(Figura 1)

Fatos a respeito de D1S80:

- Mais de 80% das populações humanas analisadas são heterozigotas.
- A unidade repetitiva tem 16 nucleotídeos de comprimento.
- Se há zero unidades de repetição, o produto de PCR terá o tamanho de 142 pb. Isto ocorre devido ao desenho dos primers, que estão localizados flanqueando este VNTR a uma distância que resulta em um fragmento de 142 pb na ausência de repetições.
- 28 alelos do locus D1S80 foram descritos.
- O maior alelo observado até hoje apresentou 41 repetições da unidade.
- Os produtos de PCR variam de 430 a 814 pares de base.

- Sequências dos iniciadores (primers) utilizados na PCR:
 - #1 F 5' CTGGCCTCCAACACTGCCCGCCG 3'
 - #2 R 5' TTGGAGATGCACGTGCCCTTGC 3'

Objetivo do Experimento

Verificar o tamanho do locus D1S80 de diferentes indivíduos.

Procedimentos experimentais

Obtenção do DNA a partir da raiz de cabelo.

1. Arranque um fio de cabelo de forma que uma grande porção do bulbo seja removida de sua cabeça.
2. Com o auxílio de uma pinça e uma gilete, corte fora a maior parte do cabelo, mas mantenha o bulbo (~ 5 mm). Coloque o bulbo em um tubo de centrífuga de 1,5 mL contendo 20 µL de tampão de digestão (0,1 µg/µL de proteinase K em PBS).
3. Incube o bulbo no tampão de digestão por 50 minutos a 55°C, e depois por 10 minutos a 95°C.
4. Quando o extrato de DNA esfriar, agite os tubos (com um agitador) por 30 segundos, centrifugue brevemente e coloque os tubos no gelo.

Amplificação do locus D1S80

1. Prepare um novo microtubo de 0,5 mL adicionando o seguinte:

<u>Reagente</u>	<u>Volume</u>
DNA extraído	3.0 µL
Mistura de reação (* *)	<u>22.0 µL</u>
	25.0 µL (volume final)

**A mistura de reação (que será distribuída para os grupos) contém:

<u>Reagente</u>	<u>Volume</u>	<u>Concentração final</u>
H ₂ O	16,30 µL	
tampão de PCR (sem Mg ²⁺)	2,50 µL	1 X
50 mM MgCl ₂	0,75 µL	1,5 mM MgCl ₂
DMSO	1,25 µL	5% v/v
10mM dNTPs	0,50 µL	200 µM cada
Taq DNA Polymerase (5U/µL)	0,25 µL	0,05 U/ µL
primer F (50µM)	0,25 µL	0,5 µM
primer R (50µM)	0,25 µL	0,5 µM
Volume total	22,0 µL	

Mantenha o tubo no gelo até o próximo passo.

2. Coloque o tubo contendo a mistura de PCR no termociclador, sob as seguintes condições de ciclagem:

Passo 1: 3 minutos a 95 °C

Passo 2: 1 minuto a 95 °C

Passo 3: 1 minuto a 65 °C

Passo 4: 1 minuto a 72 °C

Passo 5: repetir passos 2 - 4 mais trinta e nove vezes (total de 40 ciclos)

Passo 6: 10 minutos a 72 °C

Passo 7: banho a 4 °C

3. Quando a PCR estiver concluída, os tubos serão estocados a 4 °C. Os produtos obtidos serão posteriormente analisados em gel de agarose 2%.

Eletoforese em gel de agarose

Os géis de agarose serão previamente preparados pelas técnicas do LBBM de acordo com o protocolo abaixo. Entretanto faremos uma demonstração de como preparar este gel durante a aula.

1. Pesar 1,0 g de agarose. Adicionar 50mL de tampão TAE (40 mM Tris acetato pH 8, 10 mM EDTA). Homogeneizar bem.
2. Aquecer a solução no aparelho de microondas até completa dissolução da agarose. Preparar a forma para o gel (colocar o pente e os suportes laterais). Aguardar esfriar até 40^oC (até quando você conseguir segurar com as mãos) e acrescentar 2,5 µL de uma solução de brometo de etídio 10mg/ml. **CUIDADO! BROMETO DE ETÍDIO É CARCINOGENICO!** Despejar sobre a forma da cuba e deixar polimerizar por pelo menos 20 min.
3. Transferir o gel para a cuba e adicionar tampão TAE à cuba de modo a cobrir o gel. Retirar o pente suavemente. Adicionar 2,5 µL do 10X tampão de amostra a cada reação de PCR e aplicar 25 µL da amostra juntamente com um marcador de peso molecular, no gel de agarose. Correr o gel a 100 volts por 1 – 1,5 horas. **CUIDADO PARA NÃO TOCAR O TAMPÃO!**
4. Interromper a eletroforese quando o corante azul estiver a 2 cm do fim do gel.
5. Transferir o gel para o transiluminador e, em seguida, observar o gel sob luz UV, utilizando óculos protetores. Fotografar o padrão de bandas observado.

Questões:

1. Os quatro suspeitos da Figura 1 são homozigotos ou heterozigotos para D1S80?
2. Por que incubamos o bulbo capilar em tampão de digestão por 50 minutos a 55°C e depois por 10 minutos a 95°C? Qual a função da proteinase K?
3. Por que no experimento foi utilizado um gel de agarose numa concentração maior que a usual (2% (p/v))?
4. Por que o brometo de etídio é carcinogênico?
5. Analise e compare o padrão dos VNTRs obtidos por TRÊS grupos de sua turma. O que vocês podem concluir sobre a variabilidade deste VNTR nesta comparação?