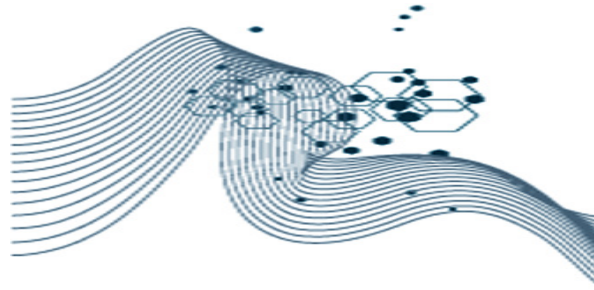


DNA Day



Preparado por Alexandre Teixeira, Andreia Neves, Astrid Moura Vicente, Luisa Romão, Marta Barreto

Sociedade Portuguesa de Genética Humana

Em parceria com o Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge



Programa

O roubo das gomas – quem é o criminoso?

Nível 2º ciclo, 3º ciclo, talvez até 3º e 4º ano do 1º ciclo

Aplicação prática da genética na área forense.

Sumário: Guião de uma cena de crime: uma caixa cheia de gomas foi roubada de uma sala onde estavam vários alunos e também um de nós. O criminoso deixou indícios que podem ser analisados pelos peritos em genética forense, nomeadamente um copo de água onde deixou alguma saliva. Todos na sala são suspeitos, e devem ceder uma amostra da sua “saliva” para extracção de DNA. Simula-se um reacção de PCR (explicando o conceito anteriormente), e separação em gel de agarose. Teremos fotos de diferentes perfis de DNA (bandas no gel de agarose), as quais são comparadas com as do criminoso – com identificado o ladrão de gomas!

Detalhes: O copo de água está previamente preparado e contem já saliva ou DNA de um de nós presente na sala. Vamos fazer ou simular a extracção de DNA a partir do líquido do copo. Cada suspeito cede a sua “saliva” e o grupo fará uma extracção de DNA. Há simulação de preparação de amostras para PCR, e simulação de PCR. Se houver sistema electroforese em gel de agarose disponível podemos separar amostras previamente preparadas, caso contrário teremos fotos tiradas anteriormente. Os alunos comparam os padrões e identificam o criminoso (que foi um de nós). Esta identificação será então feita através da análise dos polimorfismos nos genes D1S76 ou ApoB usando a técnica de PCR.

Eventualmente pode ser feito um documentário, com um acompanhamento explicativo por um perito ao longo do desenrolar da acção, se recrutarmos jovens actores.

O material necessário como os primers, cotonetes e talvez mais algumas das soluções de trabalho deverão ser anteriormente adquiridos. Para o Pavilhão do Conhecimento, e se estiverem de acordo com esta actividade, tentaremos pedir um equipamento de PCR emprestado a uma casa comercial, assim como tentaremos obter os géis de agarose, ou poderemos levá-los do INSA. Para os outros centros Ciência Viva teremos que ser mais criativos...

Tarefas:

1. Isolamento de DNA a partir de células da mucosa bucal
2. Amplificação da região polimórfica por PCR.
3. Preparação do gel de agarose
4. Análise dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose. Discussão e integração dos resultados para resolução do crime.

Introdução

Análise do polimorfismo para distinção entre indivíduos (Informação para os monitores)

A análise de polimorfismos do DNA por técnicas de PCR e sequenciação tem diversas aplicações na genética forense como em aplicações médicas. Estas vão desde identificação de indivíduos, testes de paternidade, ao acompanhamento de processos de transplante de medula óssea e determinação de graus de susceptibilidade a doenças de componente genética.

Nesta actividade, os alunos vão ter a oportunidade de simular a determinação do seu genótipo para um polimorfismo não codificante, partindo de um esfregaço da mucosa bucal, por aplicação da técnica de PCR.

Irão igualmente analisar os resultados da análise de polimorfismos previamente feitos pelo monitor no âmbito da aplicação a uma cena de crime como anteriormente referido.

Polimorfismos

Designa-se por **polimorfismo** uma variação genética que aparece em >1% da população e que é transmissível à descendência de forma mendeliana. Esta percentagem permite excluir deste conceito mutações espontâneas que possam ter ocorrido e ter-se espalhado numa dada família. Considera-se um **alelo** cada uma das variantes possíveis de um *locus* polimórfico.

Os estudos de sequências polimórficas ou polimorfismos são utilizados para:

- Identificação de indivíduos (testes de paternidade, peritagens forenses);
- Mapeamento de genes associados a uma doença (estudos de linkage e associação);
- Estudos populacionais (avaliação do grau de diversidade numa população, estudos de migrações, estudos filogenéticos).

Seguem-se alguns exemplos de polimorfismos.

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Como o nome sugere, envolve um único nucleótido. Na maioria dos SNPs um nucleótido é substituído por outro nucleótido diferente, embora o termo também inclua alterações envolvendo inserções ou deleções de um nucleótido. Caracteristicamente, os SNPs possuem dois alelos. Alguns SNPs causam alterações em locais de restrição enzimática (polimorfismos de local de restrição). Uma vez que o DNA codificante corresponde a aproximadamente 1.5%

do genoma humano, a maioria dos SNPs encontra-se nas regiões de DNA não codificante, como por exemplo os intrões e as regiões intergênicas. No entanto, a localização cromossômica dos SNPs não é uniforme, grandes regiões cromossômicas com muito poucos SNPs encontram-se por vezes adjacentes a grandes regiões cromossômicas contendo muitos SNPs.

Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)

Os polimorfismos VNTR correspondem a sequências com um número variável de nucleótidos que estão repetidas em tandem num determinado *locus*, variando de alelo para alelo o número de repetições. Existem duas categorias de VNTRs:

Short Tandem Repeats (STRs): também designados por **microssatélites**; a unidade de repetição tem de 1 a 8 nucleótidos e a extensão da região repetida varia entre 10 e mais de 100 nucleótidos.

Minissatélites: regiões de repetição que se estendem por centenas de nucleótidos, consistindo de repetições em tandem de uma sequência entre 9 e algumas dezenas de nucleótidos.

Os polimorfismos VNTR apresentam múltiplos alelos e, salvo muito raras exceções, localizam-se em regiões de DNA não codificante. Temos como exemplos o ApoB e o D1S76 os quais irão ser utilizados nesta experiência.

Polimorfismos de repetição de transposões

Aproximadamente 45% do genoma humano é composto por repetições de transposões. São elementos móveis do genoma, que têm a capacidade de se auto copiarem e de se inserirem em novos locais do genoma. A grande maioria destes transposões já não são activos mas nalguns casos ainda se verificam eventos de transposição.

Informação a reter:

- Diferença entre polimorfismo e mutação

Polimorfismo: Variação genética frequente, que aparece em mais de 1% da população e que é transmissível de forma mendeliana diferente de mutação: Qualquer alteração genética permanente.

Mutação contexto médico: Alteração genética responsável por um fenótipo patológico

- Genoma Humano: 3.2 Gb, (3×10^9 bp), 23 pares de cromossomas
- Apenas 1.1% a 1.4% da sequência codifica proteína
- Existem cerca de 31 000 genes que codificam proteínas

- Mais de metade do genoma é composta por sequências repetitivas

Os genomas de dois indivíduos diferem em pelo menos 1 nucleótido em cada 1000 polimorfismo to tipo SNP

Para genotipar estes polimorfismos o DNA extraído das células da mucosa bucal terá de ser amplificado, para tal iremos recorrer a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) é um método que possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA. Na fase inicial do PCR são necessárias temperaturas elevadas de forma a desnaturar a dupla cadeia da molécula de DNA em duas cadeias de DNA simples. No passo seguinte, reduz-se a temperatura inicial da reacção, permitindo assim que duas sequências curtas de oligonucleótidos (os *primers* ou iniciadores) hibridem, por complementaridade em extremidades opostas da sequência alvo. Num 3º passo, a síntese do DNA ocorre de 5' para 3' por extensão a partir de cada primer (Fig.1). Esta síntese é conseguida através da adição de uma DNA polimerase e dos quatro desoxinucleótidos. Geram-se assim duas novas cadeias de DNA iguais à inicial. Promovem-se ciclos sucessivos destes três passos - desnaturação, hibridação e polimerização - que resultam na amplificação exponencial da sequência inicial de interesse. Como a técnica de PCR envolve várias etapas de desnaturação, hibridação e extensão pela polimerase, obriga a vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. O desenvolvimento de equipamento capaz de programar de forma contínua a alternância destes ciclos, aliado à utilização de DNA polimerases termoestáveis (e.g. Taq polimerase) permitiu a automatização de todo o processo. Desta forma, em apenas algumas horas, milhões de cópias da sequência inicial podem ser geradas.

A técnica de PCR tem ganho um crescente impacto na Medicina, sendo várias as suas aplicações, nomeadamente ao nível da Medicina Forense, do diagnóstico de Doenças Genéticas, do Diagnóstico de doença residual em oncologia e do Diagnóstico em Infeciologia.

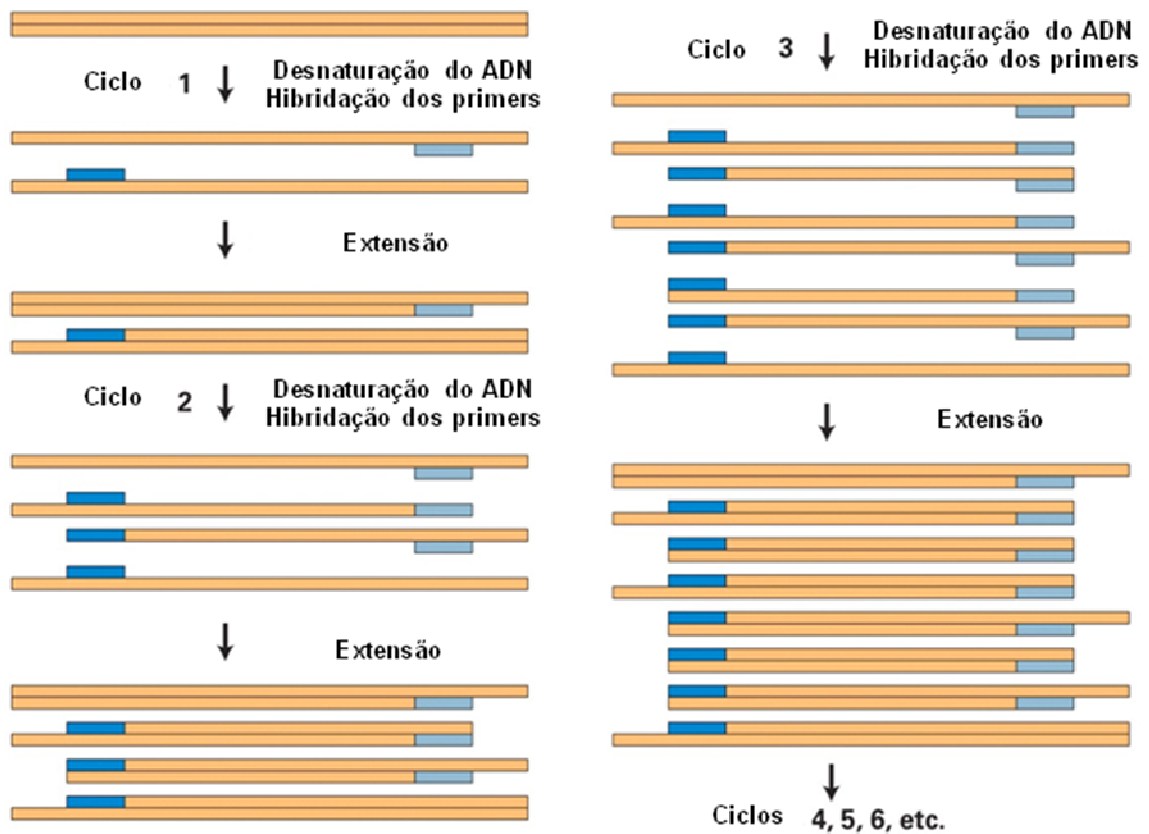


Figura. 1 Técnica de PCR

Para se observarem os productos amplificados através da técnica de PCR é necessário correr os ADNs num gel de electroforese em agarose

A electroforese de ADN em gel de agarose é o método utilizado por rotina para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA. A agarose é um polímero natural (polissacarídeo) extraído do agar (hidrocoloide das algas vermelhas). Os geis preparam-se fundindo a agarose na presença de um tampão apropriado. A solução obtida é deitada num molde e deixada arrefecer até solidificar. Ao solidificar forma-se uma matriz cuja densidade é determinada pela concentração da agarose.

Quando se aplica um campo eléctrico através do gel, o DNA carregado negativamente migra em direcção ao ânodo. A velocidade de migração é determinada por um conjunto de parâmetros, entre os quais o tamanho da molécula e a concentração da agarose. A velocidade de migração é inversamente proporcional ao \log_{10} do tamanho do fragmento (em bp) e, para um mesmo tamanho de fragmento de DNA, a velocidade de migração é maior num gel com menor concentração de agarose. A migração das moléculas de DNA através do gel, depende ainda da voltagem aplicada; quanto mais alta for a voltagem, mais rápida a migração. Para

visualizar o DNA nos geis de agarose utiliza-se o corante fluorescente brometo de etídio. Esta substância possui grupos químicos que se intercalam entre as bases do DNA. Em consequência, o corante ligado ao DNA fluoresce com mais intensidade do que o corante livre, quando irradiado com luz ultravioleta (Fig.2). O brometo de etídio permite detectar cadeias simples e duplas de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA.

Por convenção, os geis de DNA são lidos da esquerda para a direita, com os poços colocados no topo. A área do gel perpendicular ao poço designa-se “pista” ou *lane*. Portanto, ao olhar para uma *lane* analisam-se os fragmentos de DNA colocados nesse poço. Fragmentos de DNA com o mesmo tamanho migram a mesma distância no gel dando origem a **bandas**. Por convenção, o tamanho de cada fragmento de DNA é expresso pelo número de **pares de bases** que o constituem (bp).

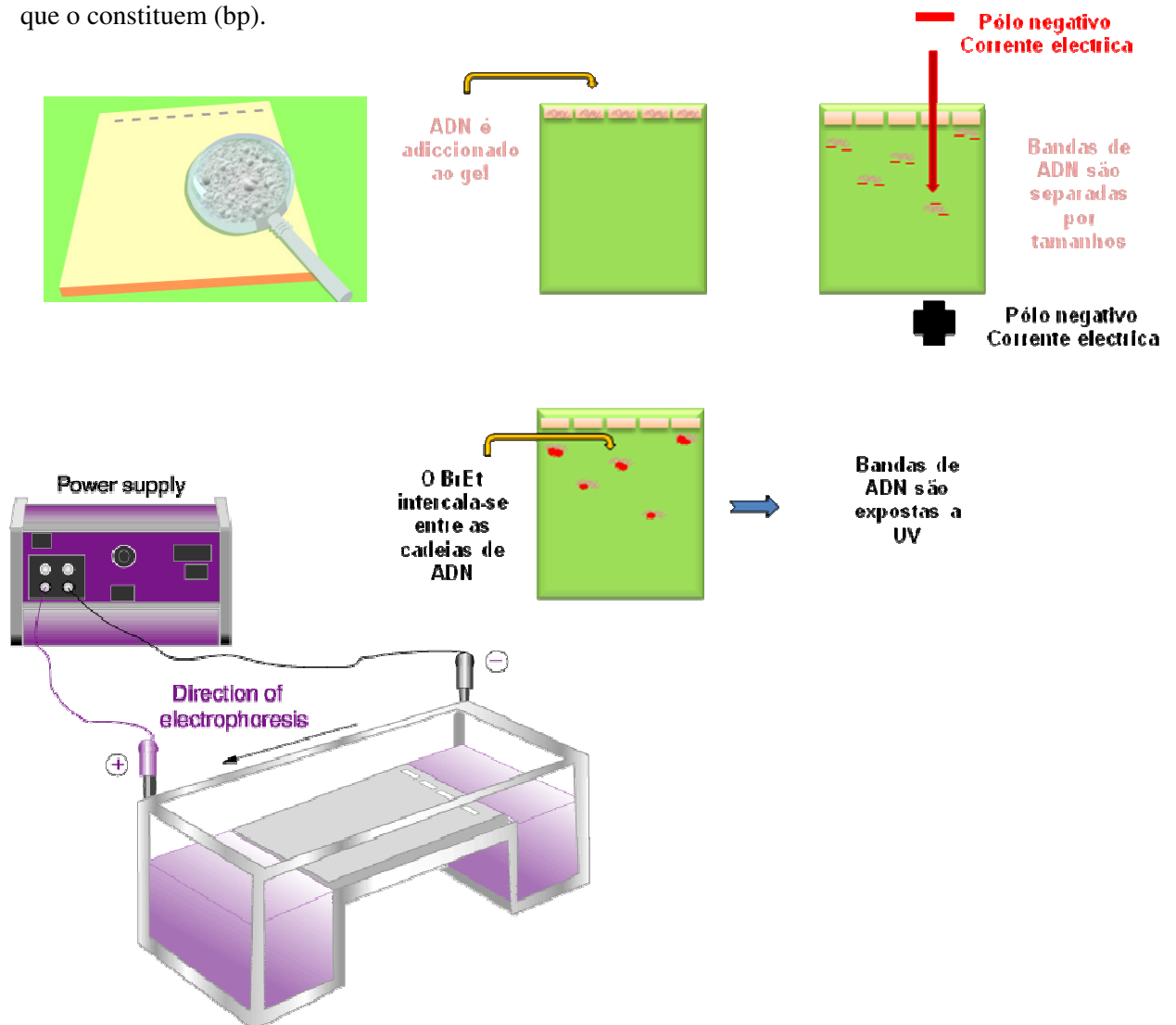


Figura 2. Geis de agarose

Parte 1 - Isolamento de DNA a partir de células da mucosa bucal

Objectivo: obtenção de células para extracção de DNA e posterior amplificação por PCR da região polimórfica *ApoB* ou *DIS76*.

Objectivo: extracção de DNA genómico

Nesta aula prática os alunos vão realizar um esfregaço da mucosa bucal com o objectivo de recolher células a partir das quais se irá isolar DNA genómico. Na extracção de DNA com Hidróxido de Sódio a amostra inicial contendo células é aquecida (98-100° C) na presença de 50 mM NaOH. O aquecimento provoca a lise das células e a consequente libertação do DNA. O NaOH desnatura as proteínas e degrada o RNA que possa estar presente na solução. Após o aquecimento a solução é neutralizada com tampão Tris. O DNA obtido por este método encontra-se em cadeia simples, sendo contudo utilizável como molde para amplificação por PCR.

Procedimento: (Todo este procedimento poderá ser realizado pelo monitor previamente e ser simulado com H₂O, à excepção da obtenção do esfregaço bucal que será feito pelos alunos)

1. Pipete para um microtubo 500 µl de NaOH 50 mM. (poderá ser simulado com H₂O)
2. Utilizando um cotonete estéril, raspe o interior da cavidade bucal, incidindo preferencialmente na região da bochecha e na parte lateral da língua. (feito pelos e aos vários alunos, ao monitor presente e ao copo)
3. Com a ajuda de uma tesoura, remova a extremidade do cotonete que contém o esfregaço e mergulhe-a no microtubo com NaOH 50 mM. (tubos previamente marcados com: Prova (amostra do copo); Supeito 1, supeito2....Suspeito x, conforme o número de alunos)
4. Coloque os microtubos num banho a 98° C durante 15 minutos.
5. Adicione à solução de DNA 100 µl de tampão Tris-HCl 1M, pH 8.0.

Esta solução de DNA pode ser usada imediatamente ou guardada a 4° C durante um mês.

Parte-2 Amplificação da região polimórfica ApoB ou DIS76 por PCR.

Objectivo: análise do polimorfismo *ApoB* ou *DIS76* por reacção de PCR

Com o objectivo de genotipar a sequência *ApoB* ou *DIS76*, foram desenhados primers específicos para a região do cromossoma que flanqueia o local de inserção destes VNTRs:

Primer forward DIS76: 5'-GGGTCTCAGCGGATGAAGGTTTTTG-3'

Primer reverse DIS76: 5'-GAACGTGTCAGTATGTAGCGGTTG-3'

OU

Primer forward APOB: 5'-ATGGAAACGGAGAAATTATG-3'

Primer reverse APOB: 5'-CCTTCTCACTTGGCAAATAC-3'

Estes primers vão ser utilizados numa reacção de PCR usando como molde o DNA das células da mucosa bucal.

Procedimento:

1. Identifique os vários microtubos, para a Prova e suspeitos, outro para o controlo negativo.

Pipete os seguintes reagentes, substituindo o DNA genómico por H₂O no controlo negativo:

Reagentes	D1S76/ApoB(µl)
H ₂ O	40.2/40.6
Tampão 10x	5.0
dNTPs 25pmol	0.5/0.1
Primer forward 25 pmol	1.0
Primer reverse 25 pmol	1.0
Taq DNA polimerase 5U/µl	0.3
DNA	2.0
Volume final	50.0 µl

2. Coloque os microtubos no termociclador e inicie o programa de PCR com as condições que se seguem:

Desnaturação inicial – 5 minutos a 95° C

Desnaturação – 1 minuto a 94° C

Annealing – 1 minuto a 56° C (ApoB) ou 65° C (D1S76)

Extensão – 30 segundos (ApoB) ou 2 minutos (D1S76) a 72° C

} x 30 ciclos

Extensão final – 10 minutos a 72° C

3. No final da reacção as amostras devem ser armazenadas a -20° C.

Parte-3 Preparação do gel de electroforese

Objectivo: preparação de um gel de agarose a 1,5 %

Atenção:

Nesta aula, há o uso de um composto, o **brometo de etídio**, que, por se intercalar entre as bases do DNA **possui efeitos mutagénicos e carcinogénicos comprovados**. Portanto, cumpra sempre as seguintes regras de segurança:

- use sempre luvas ao manipular soluções com brometo de etídio ou géis corados
- limite o uso de brometo de etídio a uma área restrita da bancada
- depois de usadas, deite as soluções, luvas e géis corados para recipientes próprios para posterior incineração
- Só os monitores é que deverão manusear estes compostos

Note que, quando correctamente manipulada a concentração de brometo de etídio usada no gel para corar DNA envolve um risco mínimo

Procedimento: (Só os monitores é que deverão realizar este procedimento, o qual deverá ser feito previamente)

1. Coloque 1.5 g de agarose num frasco com 100 ml de tampão TAE. Rolhe parcialmente o frasco e aqueça a solução no microondas até à sua completa dissolução.

2. Arrefeça a solução de agarose até à temperatura de ~60° C e adicione 2.5 µl da solução stock de brometo de etídeo (10 mg/ml).

3. Verta a agarose no molde e coloque o pente.
4. Quando o gel estiver solidificado, retire o pente e envolva o gel em película aderente. Armazene a 4° C.

Parte 4 – Análise dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose.

Objectivo: separação por electroforese dos produtos de PCR e determinação dos vários genótipos para os polimorfismos *ApoB* e *DIS76*.

Procedimento: (Este procedimento poderá ser simulado na aula tendo os géis já feitos e carregando nestes amostras de DNA previamente preparadas)

1. Elabore um esquema com a ordem de colocação das amostras no gel. Poderá ou não usar-se um marcador de massa molecular para distinção do tamanho das bandas. Como exemplo temos o marcador DNA PhiX174 DNA/ BsuRI (HaeIII). (ver figura3)
2. 3. Coloque o gel na tina. Os poços ficam sempre junto ao pólo negativo (cátodo). Adicione tampão **TAE** até cobrir o gel. Certifique-se que os poços estão completamente submersos e livres de bolhas de ar.

Nota: A razão pela qual os poços ficam sempre junto ao pólo negativo é devido a que os ácidos nucleicos estão carregados negativamente, assim irão migrar para o pólo positivo, ou seja para o lado oposto ao cátodo (princípio pela qual se baseia a electroforese).

Atenção, tampão em excesso conduz a corrente por cima do gel e retarda a separação do DNA.

3. Adicione 5µl de corante de electroforese a cada um dos microtubos anteriores.
4. Aplique 10µl do marcador e 20µl das amostras no gel. Aplique as amostras no gel de acordo com o esquema preparado: segure a pipeta com firmeza, remova todo o ar presente na ponta (ao expelir uma bolha de ar a amostra sai fora do poço e perde-se ou contamina os outros poços), introduza a ponta da pipeta no poço e verta a amostra com cuidado. Deve ver a amostra corada depositar-se no fundo do poço.

Cuidados a observar: **não** perfurar o fundo do poço; **não** aspirar o líquido do poço.

5. Tape a tina de electroforese e ligue os eléctrodos a uma fonte de alimentação. Atenção às cores dos cabos de ligação: ligue vermelho a vermelho (ânodo) e preto a preto (cátodo)

6. Ligue a fonte e regule a tensão para **100 volts**. Deve obter valores de intensidade de corrente da ordem dos 50-100 miliamperes. Deixe a electroforese decorrer durante cerca de **45 min**, vigiando periodicamente a frente de migração.

7. No final da electroforese desligue a fonte. Atenção: **nunca retire a tampa da tina com a corrente ligada!!** Com luvas, remova o gel e observe-o no transiluminador (tirar uma foto)

Atenção: a luz UV pode danificar a retina - use sempre óculos de protecção, ou simplesmente um vidro, que filtra os raios UV !!

8. Determine o genótipo de cada indivíduo analisado para o polimorfismo ApoB e D1S76.

Para tal o monitor deverá ter uma foto de um gel já analisado anteriormente e com os alunos determinar a identificação do responsável pelo roubo das gomas. (ver figura 4)

Solução: Como poderão observar no gel, o suspeito 3 (que será o monitor) é o único que apresenta um perfil de DNA (do referido polimorfismo) igual ao obtido do copo (PROVA), bandas A e C.

PhiX174 DNA/ BsuRI (HaeIII)

Exemplo do Gel para um Polimorfismo

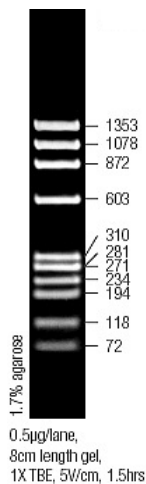


Figura.3

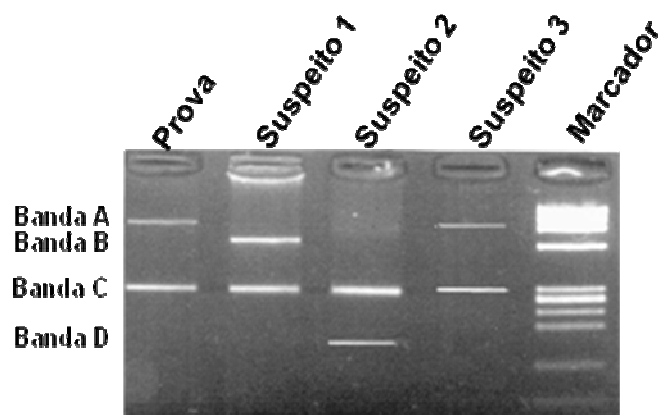


Figura.4

Protocolo simplificado:

(será feito pelos alunos)

1. Pipete para um microtubo 500 µl de H₂O (para simular que é NaOH 50 mM).
2. Utilizando um cotonete estéril, raspe o interior da cavidade bucal, incidindo preferencialmente na região da bochecha e na parte lateral da língua. (feito pelos e aos vários alunos, ao monitor presente e ao copo)
3. Com a ajuda de uma tesoura, remova a extremidade do cotonete que contém o esfregaço e mergulhe-a no microtubo com H₂O. (tubos previamente marcados com: Prova (amostra do copo); Supeito 1, supeito2....Suspeito x, conforme o número de alunos)
4. Coloque os microtubos num banho a 98° C durante 15 minutos.
5. Adicione à solução de DNA 100 µl de tampão Tris-HCl 1M, pH 8.0.

Simulação do PCR:

O monitor deve explicar aos alunos o processo de amplificação de ADN através da técnica de PCR

Simulação corrida do gel de agarose:

Gel feito sem brometo de etídio

Coloque 1.5 g de agarose num frasco com 100 ml de tampão TAE. Rolhe parcialmente o frasco e aqueça a solução no microondas até à sua completa dissolução.

Arrefeça a solução de agarose até à temperatura de ~60° C

Verta a agarose no molde e coloque o pente.

Quando o gel estiver solidificado, retire o pente

Alunos carregam a amostra no gel

Coloque o gel na tina. Os poços ficam sempre junto ao pólo negativo (cátodo). Adicione tampão TAE até cobrir o gel. Certifique-se que os poços estão completamente submersos e

livres de bolhas de ar.

Nota: A razão pela qual os poços ficam sempre junto ao pólo negativo é devido a que os ácidos nucleicos estão carregados negativamente, assim irão migrar para o pólo positivo, ou seja para o lado oposto ao cátodo, sendo a sua velocidade de deslocamento inversamente proporcional ao seu tamanho (princípio pela qual se baseia a separação por electroforese).

Atenção, tampão em excesso conduz a corrente por cima do gel e retarda a separação do DNA.

Adicione 5µl de corante de electroforese a cada um dos microtubos com 20 µl de amostra de ADN, preparados anteriormente.

Aplique 20µl das amostras no gel. Aplique as amostras no gel de acordo com o esquema preparado: segure a pipeta com firmeza, remova todo o ar presente na ponta (ao expelir uma bolha de ar a amostra sai fora do poço e perde-se ou contamina os outros poços), introduza a ponta da pipeta no poço e verta a amostra com cuidado. Deve ver a amostra corada depositar-se no fundo do poço.

Cuidados a observar: **não** perfurar o fundo do poço; **não** aspirar o líquido do poço.

Tape a tina de electroforese e ligue os eléctrodos a uma fonte de alimentação. Atenção às cores dos cabos de ligação: ligue vermelho a vermelho (ânodo) e preto a preto (cátodo)

Ligue a fonte e regule a tensão para **100 volts**. Deve obter valores de intensidade de corrente da ordem dos 50-100 miliamperes. Deixe a electroforese decorrer durante cerca de **45 min**, vigiando periodicamente a frente de migração.

Vizualização do gel em fotografia previamente adquirida

Após descoberta do suspeito o monitor dá as gomas aos alunos