

Estudo de um Polimorfismo no Gene da Cadeia Pesada β da Miosina (CP β M)

Ana Luísa Carvalho
Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra

Introdução:

Neste trabalho pretende-se analisar um polimorfismo que ocorre na população, no gene que codifica a cadeia pesada β da miosina (CP β M). Um polimorfismo corresponde a variabilidade numa sequência do genoma, e muitas vezes não apresenta expressão fenotípica e não é patogénico. O estudo de polimorfismos nos elementos de uma família, em que alguns indivíduos sofram de uma doença genética, pode fornecer informação sobre genes candidatos a estarem envolvidos na doença em causa. Mutações no gene que codifica a cadeia pesada da isoforma β da miosina são frequentemente a causa de Miocardiopatia Hipertrófica Familiar (MHF), uma doença cardíaca hereditária, e uma importante causa de morte súbita em adultos jovens. Nos indivíduos afectados por esta doença acontece hipertrofia ventricular e desorganização das células do músculo cardíaco. O estudo de polimorfismos associados aos vários genes que podem estar mutados nesta doença fornece informação sobre o melhor gene candidato numa família com casos de MHF.

Para estudar o polimorfismo presente no intrão 28 do gene da cadeia pesada β da miosina (CP β M), amplifica-se um fragmento de DNA do gene da CP β M, de 248 pb, fragmento este que corresponde à zona do intrão 28 onde existe o polimorfismo. Este segmento do gene contém, em alguns indivíduos, um local de restrição para a enzima BamHI. Digestão do fragmento de 248 pb, amplificado a partir do DNA genómico desses indivíduos, com a enzima BamHI resulta na formação de dois fragmentos de DNA, de tamanhos 163 pb e 85 pb (ver fig. 1). Noutros indivíduos, o local de restrição para a enzima BamHI não existe naquela zona do intrão 28 do gene da CP β M, que deixa de ser digerido pela enzima BamHI (fig. 1). Assim, é possível distinguir as duas formas do polimorfismo digerindo o fragmento de DNA amplificado do gene da CP β M com a enzima BamHI. A este tipo de análise de um polimorfismo chama-se “Restriction Length Fragment Polymorphism” (RFLP).

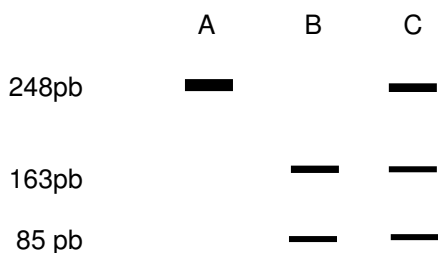


Figura 1- Análise de Restrição. A- Indivíduo Homozigótico para a forma do polimorfismo sem local de restrição. B- Indivíduo homozigótico para a forma do polimorfismo com local de restrição. C- Indivíduo heterozigótico.

Protocolo:**A) Isolamento de DNA de núcleos de leucócitos (não será feito nas aulas práticas)**

1- Colher 10 ml de sangue periférico em tubo esterilizado contendo anticoagulante (EDTA ou citrato). Conservar a 4°C por períodos curtos (< 3 dias) ou a -20°C por períodos longos.

2- Adicionar (a 4°C) 9 a 10 vezes o volume de sangue de solução de lise dos glóbulos vermelhos (sol. lise I):

0.32M sacarose	109.536 g
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)	10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
5 mM MgCl	1.0165 g
1% Triton X-100	10 ml (adicionar depois do autoclave)
	V final = 1l

Misturar lentamente a 4°C, durante 5 min.

3- Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 4°C.

4- Ressuspender o pellet nuclear em 4.5 ml de solução de lise dos núcleos (sol. lise II):

10 mM Tris-HCl (pH 8.2)	1.25 ml de 2 M Tris-HCl (pH 8.2)
400 mM NaCl	20 ml de 5 M NaCl
2 mM Na ₂ EDTA	1 ml de 0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)
	V final = 250 ml

Agitar cuidadosamente.

5- Adicionar 0.5 ml de 10% SDS. Tapar e agitar cuidadosamente.

6- Adicionar 120 µl de proteinase K (stock a 20 mg/ml). Tapar e agitar cuidadosamente.

7- Incubar a 52.5°C durante 3 horas ou a 37°C durante a noite, com agitação fraca.

8- Adicionar 3 ml de 5 M NaCl. Mexer bem.

9- Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min a 15°C.

10- Retirar o sobrenadante para novo tubo. Adicionar etanol absoluto (duas vezes o volume). Inverter o tubo várias vezes até o DNA precipitar.

11- Retirar o DNA com um tip ou pipeta estéril.

12- Lavar com etanol a 70%.

13- Deixar secar e dissolver o DNA em 200 µl de TE ou água. Uma melhor dissolução de DNA pode obter-se se estiver 2 horas a 37°C.

14- Quando o DNA estiver completamente dissolvido, pode ser quantificado lendo a absorvância a 260 nm.

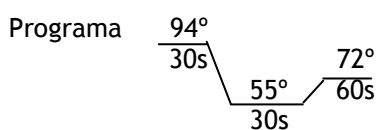
B) Quantificação do DNA isolado

Para determinar a concentração de DNA em amostras de DNA puras, pode ler-se a absorvância a 260 nm. As bases nitrogenadas do DNA absorvem radiação ultravioleta a este comprimento de onda.

$$A_{260\text{ nm}} = 1 \Rightarrow 50 \mu\text{g/ml ds DNA}; 40 \mu\text{g/ml ss DNA / RNA}$$

A razão entre as absorvâncias a 260 nm e a 280 nm dá informação sobre a pureza da amostra. Contaminação da amostra de DNA ou RNA com proteína faz diminuir a $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$. Uma amostra de DNA pura, tem $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}} = 1.8$; uma amostra de RNA pura tem $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}} = 2$.

Para determinar a concentração de DNA nas amostras de DNA isoladas, fazer duas diluições (1:250 e 1:500) da amostra, e ler $A_{260\text{ nm}}$ e $A_{280\text{ nm}}$.

B) Amplificação por PCR de um fragmento de 248pb do gene da CPβM**Reacção de PCR (50 µl):**

Componentes	Volume	Concentração final
DNA molde (DNA genómico)	1-3 µl	~100 ng
Tampão Taq polimerase (10×)	5 µl	1×
dNTPs 5 mM	2 µl	200 µM
Primer 1 20 µM	1 µl	400 nM
Primer 2 20 µM	1 µl	400 nM
Taq polimerase (5U/µl)	0.5 µl	2.5U/100 µl
H ₂ O	até perfazer 50 µl	

PCR:

3 min 94°C

25 ciclos:

30 seg 94°C; 30 seg 55°C; 1 min 72°C

10 min 72°C

4°C

C) Análise de Restrição

Digestão do produto de PCR com a enzima BamHI:

Reacção de digestão:

17.7 µl de DNA

2 µl de tampão 10× apropriado para a BamHI

0.3 µl de BamHI

Incubar a 37°C durante 1h.

D) Electroforese em gel de agarose do fragmento de DNA amplificado por PCR e digerido com BamHI

1. Preparação do gel de agarose 2% em TAE (50 ml/gel):
 - Pesar agarose
 - Adicionar TAE (1×)
 - Aquecer no micro-ondas para derreter a agarose
 - Deixar arrefecer
 - Adicionar 2 µl de brometo de etídeo 10 mg/ml
 - Verter na tina de electroforese e deixar solidificar
2. Preparação das amostras: adicionar “Loading Buffer”, na diluição de 1:10, às amostras a correr no gel
3. Electroforese: Aplicar as amostras no gel, a par com um padrão (5 µl) contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Correr a electroforese a 100V, cerca de 30 min.
4. Visualizar no transiluminador os produtos da digestão presentes no gel.

Soluções necessárias:**50x TAE (500 ml)**

121 g Tris

28.5 ml ácido acético glacial

50 ml 0.5 M EDTA, pH 8

H₂O até 500 ml**Brometo de etídeo (10 mg/ml)**250 mg de brometo de etídeo em 25 ml de H₂O; proteger da luz.**10x “Loading Buffer”**

10 g Ficoll 400

10 ml 0.5 M EDTA

30 ml H₂O

5 ml 10% SDS

0.125 g Azul de Bromofenol

0.125 g Xileno de Cianol

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO FINAL DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELECTROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE**SOLUÇÃO STOCK UTILIZADA:****50× TAE (500 ml)**

121 g Tris

28.5 ml ácido acético glacial

50 ml 0.5 M EDTA, pH 8

H₂O até 500 ml**DADOS DOS COMPOSTOS**

M=121g/mol

M=60.05g/mol; 1l=1.05kg

M=372g/mol

- Preparação de 100 ml de 0.5 M EDTA, pH 8:

- Concentração do stock de 50× TAE (em molaridade):

Tris:

Ácido acético:

EDTA:

- Concentração final de TAE no gel (em molaridade):

Tris:

Ácido acético:

EDTA:

SOLUÇÃO STOCK UTILIZADA:**10× "Loading Buffer"**

10 g Ficoll 400

10 ml 0.5 M EDTA

30 ml H₂O

5 ml 10% SDS

0.125 g Azul de Bromofenol

0.125 g Xileno de Cianol

- Preparação de 100 ml de 10% SDS:

- Concentração final de “loading buffer” nas amostras:

Ficoll 400:

EDTA:

SDS:

Azul de Bromofenol:

Xileno de Cianol:

SOLUÇÃO STOCK UTILIZADA:

Brometo de etídeo (10 mg/ml)

250 mg de brometo de etídeo em 25 ml ml de H₂O.

Usar 2 µl da solução stock para fazer um gel de 50 ml

Concentração final no gel: