

Atividades Laboratoriais

Caso prático

A substituição de uma guanina por uma adenina (G>A) afeta a posição 18 do gene GNPTAB (18G>A).

No sentido de caracterizar um grupo de indivíduos para esta substituição programou-se uma experiência constituída pelas seguintes fases:

1. Amplificação por PCR de um fragmento de ADN contendo o local de interesse.
2. Ensaio de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para a deteção da substituição 18G>A – Digestão dos fragmentos amplificados com a enzima Pst1.
3. Corrida em gel de agarose dos fragmentos digeridos e interpretação dos resultados
4. Leitura de sequências e análise do impacto da substituição 18G>A ao nível da proteína GNPTAB.

1. Amplificação por PCR de um fragmento do ADN contendo o local de interesse para esses indivíduos

Fragmento de ADN a amplificar com o tamanho de 356 pb

```
CGGAGGCTGTGACCTGCGCGCGGCCCGA CCGGGGCCCTGAATGGCGGCTCGCTGAGGCGG  
CGGCGGCGGCGGCGGCGGCTCAGGCTCCTCGGGGCGTGGCGTGGCGGTGAAGGGGTGATGCTGT  
TCAAGCTCCTG>ACAGAGACAGACCTATACTGCCTGTCCACAGGTATGGGCTCTACGTGTG  
CTTCTTGGGCGTCGTTGTCACCATCGTCTCCGCTTCCAGTTCGGAGAGgtgagtgcggcgcc  
gcagcctggaccgggcgcccgaccctgcactgcctcgccgtgccccgcgatgccccgataca  
gtatgtatTTTTTcattattagagacggggTTTTgccc
```

Primers delimitantes do fragmento indicados a sublinhado. Primer forward a sombreado claro e primer reverse a sombreado escuro. Substituição 18G>A marcada a negrito.

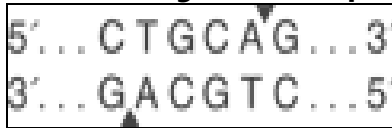
Mãos na massa

Protocolo

- A) Para cada indivíduo mistura num tubo 10 µl de Primer Forward, 10µl de primer reverse, 10 µl de Tampão de incubação, 3 µl de Cloreto de magnésio, 2 µl de Taq polimerase, 2 µl de uma mistura nucleótidos (A, T, G e C) e 2 µl de DNA. Completa com água até 100 µl.
- B) Coloca no termociclador. Condições de amplificação: 94°C durante 45 segundos, 62°C durante 45 segundos e 72°C durante 45 segundos. Repetir 30 vezes.

2. Ensaio de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para a deteção da substituição 18G>A

Digestão dos fragmentos amplificados com a enzima Pst1.



Local que a enzima Pst1 reconhece e forma como corta

Sequência com o A

CGGAGGCTGTGACCTGCGCGCGGCGGCCCGA CCGGGGCCCTGAATGGCGGCTCGCTGAGGCGG
 CGGCGGCGGCGGCGGCGGCTCAGGCTCCTCGGGGCGTGGCGTGGCGGTGAAGGGGTGATGCTGT
 TCAAGCTCCTACAGAGACAGACCTATACCTGCCTGTCCCACAGGTATGGGCTCTACGTGTGCTT
 CTTGGGCGTCGTTGTACCATCGTCTCCGCCTTCCAGTTCGGAGAGgtgagtagcggcgccgca
 gcctggaccgggcgctcgaccctgcaactgcctcgccgtgccccgcgatgccccgatacagta
 tgtatTTTTcattattagagacggggTTTTgccc

A enzima Pst1 não reconhece nenhum local de corte nesta sequência e deixa-a intacta.

Sequência com o G

CGGAGGCTGTGACCTGCGCGCGGCGGCCCGA CCGGGGCCCTGAATGGCGGCTCGCTGAGGCGG
 CGGCGGCGGCGGCGGCGGCTCAGGCTCCTCGGGGCGTGGCGTGGCGGTGAAGGGGTGATGCTGT
 TCAAGCTCCTGCAGAGACAGACCTATACCTGCCTGTCCCACAGGTATGGGCTCTACGTGTGCTT
 CTTGGGCGTCGTTGTACCATCGTCTCCGCCTTCCAGTTCGGAGAGgtgagtagcggcgccgca
 gcctggaccgggcgctcgaccctgcaactgcctcgccgtgccccgcgatgccccgatacagta
 tgtatTTTTcattattagagacggggTTTTgccc

A enzima Pst1 reconhece um local de restrição na sequência e corta-a. A seta indica local de corte.

Mãos na massa

Protocolo

- A) Mistura num tubo 20µl do produto de ADN amplificado, 2µl de enzima, 4µl de tampão de incubação. Completa com água até 40 µl.
- B) Coloca o tubo em banho-maria a 37°C durante 3 horas.

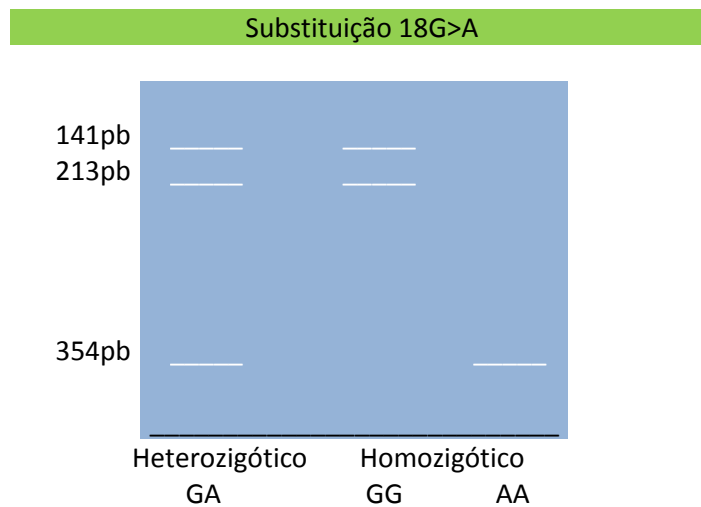
3. Corrida em gel de agarose dos fragmentos digeridos e interpretação dos resultados.

Mãos na massa

Protocolo

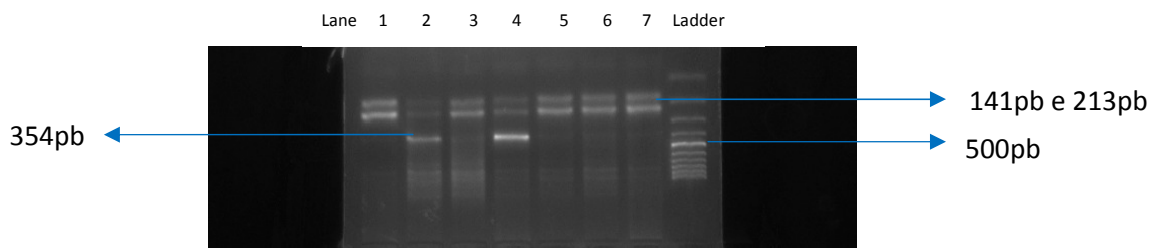
- A) Aplica 5 µl de ADN em cada poço do gel.
- B) Coloca o gel a correr. Aplica uma voltagem de 90V.
- C) Observa o resultado da corrida num transiluminador de UV.

Padrões electroforéticos esperados em indivíduos com diferentes genótipos para a substituição 18G>A após a restrição com a enzima Pst1.



Quiz

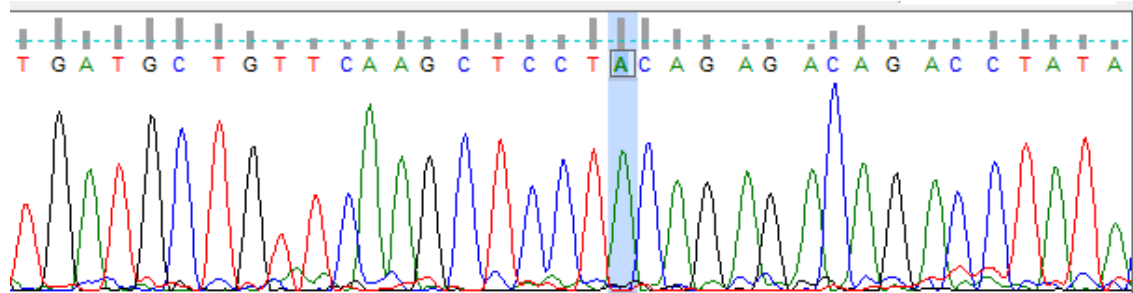
Observa a imagem seguinte. Quais as lanes do gel correspondem a indivíduos heterozigóticos GA?



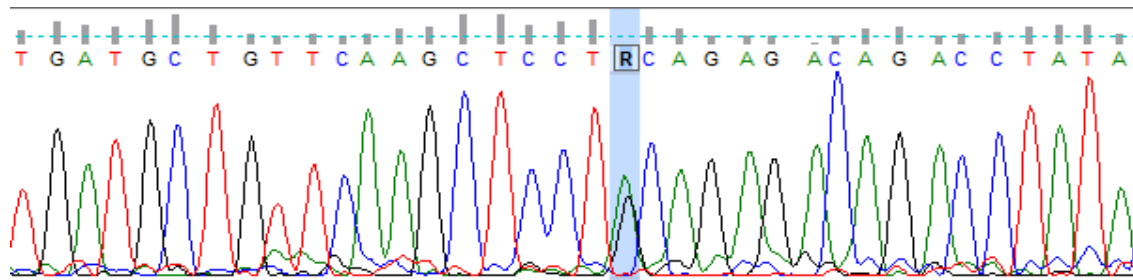
4. Leitura de sequências e análise do impacto da substituição 18G>A na proteína

Sequência parcial de um fragmento de ADN contendo a zona onde se localiza a substituição 18G>A em 3 indivíduos.

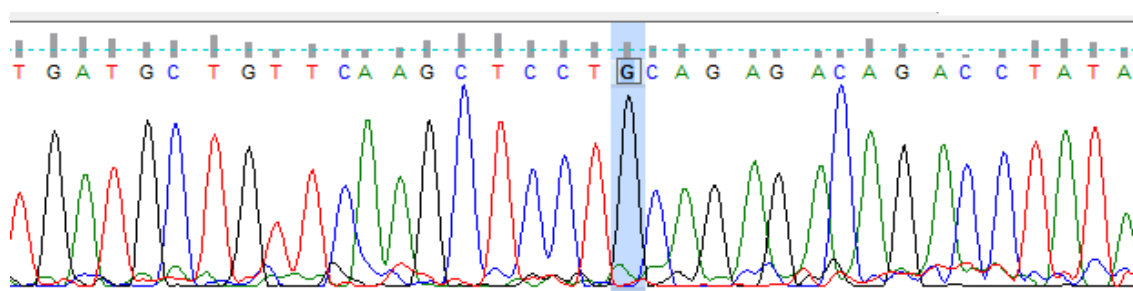
Indivíduo 1



Indivíduo 2



Indivíduo 3



Quiz

Identifica os genótipos dos indivíduos 1, 2 e 3.

Quiz

Com base na informação constante no quadro seguinte e na tabela do código genético:

- Diz qual é a alteração que se observa na proteína GNPTAB na presença da substituição 18G>A (posição assinalada com a seta).
- E se fosse a posição 17 a estar alterada e em vez da Timina tivéssemos uma Citosina (17T>C)?

↓

```

CGTGGCGTGGCGGTGAAGGGGTGATGCTGTTCAAGCTCCTGCAGAGACAGACCTATAACCT
.....ATGCTGTTCAAGCTCCTGCAGAGACAGACCTATAACCT
.....-M--L--F--K--L--L--Q--R--Q--T--Y--T--

GCCTGTCCACAGGTATGGGCTCTACGTGTGCTTCTTGGGCGTCGTTGTCACCATCGTCT
GCCTGTCCACAGGTATGGGCTCTACGTGTGCTTCTTGGGCGTCGTTGTCACCATCGTCT
C--L--S--H--R--Y--G--L--Y--V--C--F--L--G--V--V--V--T--I--V--

CCGCCTTCCAGTTCGGAGAGGTGGTCTGGAATGGAGCCGAGATCAATACCATGTTTTGT
CCGCCTTCCAGTTCGGAGAGGTGGTCTGGAATGGAGCCGAGATCAATACCATGTTTTGT
S--A--F--Q--F--G--E--V--V--L--E--W--S--R--D--Q--Y--H--V--L--

TTGATTCCATAGAGACAATATTGCTGGAAAGTCCTTTCAGAATCGGCTTTGTCTGCCCA
TTGATTCCATAGAGACAATATTGCTGGAAAGTCCTTTCAGAATCGGCTTTGTCTGCCCA
F--D--S--Y--R--D--N--I--A--G--K--S--F--Q--N--R--L--C--L--P--
    
```

Primeira base	Segunda base				Terceira base
	U	C	A	G	
U	UUU } Fen UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tir UAC } UAA } Fim UAG }	UGU } Cis UGC } UGA } Fim UGG } Trp	U C A G
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Tre ACC } ACA } ACG }	AAU } Ans AAC } AAA } Lis AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gli GGC } GGA } GGG }	U C A G