



Laboratório de Desenvolvimento de Modelos Biológicos (LDMB)

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES – PIBIC

Vigência: 01/2020 a 09/2020

Desenvolvimento de sondas beacon universais para genotipagem de camundongos isogênicos

Discente: Caroline Ferreira da Costa, 168907

Orientador: Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo construir e testar beacons moleculares (molecular beacons ou sondas beacons) para genotipagem de animais de laboratório, sendo esses, camundongos de linhagens isogênicas do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório localizado na UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas. Tendo em vista a importância do controle genético na administração de colônias de linhagens isogênicas de camundongos, uma vez que a contaminação genética pode comprometer os resultados experimentais das diversas áreas das ciências em que estes animais são empregados. As linhagens isogênicas de camundongos são muito apreciadas e utilizadas pela comunidade científica por possuírem características próprias que são determinantes aos mais diversos estudos. A contaminação entre linhagens representa a perda destas características e conseqüentemente o desperdício de tempo e recursos, além de dados incorretos obtidos nos experimentos. Diferenças no padrão genético das linhagens influenciam os testes farmacológicos e as respostas de comportamentos de animais, podendo permanecer inadvertidos em um longo período sem que o pesquisador perceba. Desta forma os dados do seu trabalho estarão comprometidos. Por isso, o monitoramento genético é um fator importante a ser considerado e deve fazer parte da rotina de um biotério de produção. As sondas beacon é um método simples de análise molecular utilizando sondas universais para a tipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), nos quais os alelos são identificados por cores fluorescentes, a amplificação é realizada na presença de dois diferentes beacons moleculares e cada alelo é identificado pelo desenvolvimento de fluorescência de uma cor única. Esse tipo de ensaio discrimina fortemente alvos que diferem um do outro por tão pouco quanto uma única substituição de nucleotídeo. sendo um excelente método para verificação de genotipagem das linhagens de camundongos isogênicos.

Sondas Beacons

O uso das sondas beacons para genotipagem irá substituir a técnica de análise do polimorfismo de microssatélites, marcadores moleculares genômicos que são amplificados pela reação de PCR Qualitativo (Reação em Cadeia de Polimerase) que é uma técnica que possibilita sintetizar um fragmento de DNA a partir de outro fragmento de DNA. O método consiste em usar a enzima TAQ DNA Polimerase para replicar o fragmento de DNA genômico desejado. Após a desnaturação da

cadeia de DNA e ligamento dos primers (pequenas sequências de DNA, que indicam para a enzima o fragmento a ser sintetizado) a TAQ DNA polimerase liga nucleotídeos soltos na solução nas cadeias simples de DNA, assim formando novas sequências. Esse processo ocorre de 20 a 30 ciclos, gerando milhões de cópias do DNA desejado [9] . Depois do PCR, ocorre a eletroforese, técnica que consiste "correr" o DNA em um gel de agarose, aplicando uma corrente elétrica. As bandas menores (com menos pares de base) correm primeiro, já as maiores ficam para trás [9] . Depois de feita as duas técnicas citadas acima, as sequências são comparadas, confirmando ou não a linhagem do camundongo. Uma outra metodologia que utiliza sondas fluorescentes para SNPs são metodologias com análise de PCR em tempo real. Estas sondas são muito eficientes e são chamadas TaqMan. TaqMan é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'—>3' da Taq DNA polimerase. Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan é degradada devido à atividade exonuclease 5'— >3' da Taq DNA polimerase, separando o quencher da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do quencher resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida [10]. Apesar da alta eficiência de detecção de SNPs com o uso desta sonda, o preço é bastante grande e é necessário produzir uma sonda para cada SNP. Onerando ainda mais o protocolo. As sondas Beacon, assim como a TaqMan possui uma extremidade com fluorescência e outra com o quencher. Na reação a fluorescência é emitida a partir da separação do quencher da molécula de fluorescência, mas não por degradação do oligo e sim por hibridização da sonda que é feita após a reação de PCR. Com isso, pode-se construir primers específicos para cada SNP com Tags que serão reconhecidos pelas sondas beacons. Possibilitando a construção de sondas beacons universais para dois tipos de Tags, que estarão ligados a primers específicos de SNPs. Com o uso das sondas beacon será possível obter o resultado visualizando a fluorescência ou não após a reação de PCR, que é uma técnica que utiliza um oligos homólogos com marcador fluorescente e ao mesmo tempo baratear o processo de análise com sondas universais.

Descrição da Pesquisa

Iniciou-se o projeto estabelecendo um Protocolo para extração de DNA de camundongo. Depois iniciou-se uma pesquisa para o desenho de primers específicos para a análise de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP), nessa pesquisa foi encontrado o artigo "Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse" de autoria de Petko M. Petko e associados [12], onde é descrito a distribuição alélica de 235 SNPs em 48 cepas de camundongos, criando assim um banco de dados de polimorfismos úteis para fins de genotipagem. A partir dessa informação foi escolhido uma SNP que diferencia a linhagem BALB/cJ da linhagem C57BL/6J.

A partir dos dados desse artigo, foi pesquisado no site Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) [13] a sequência genética desse genótipo escolhido.

MGI é o recurso de banco de dados internacional para camundongos de laboratório, fornecendo dados genéticos, genômicos e biológicos integrados para facilitar o estudo da saúde e doenças humanas.

A sequência do genótipo escolhido está indicada na imagem abaixo:

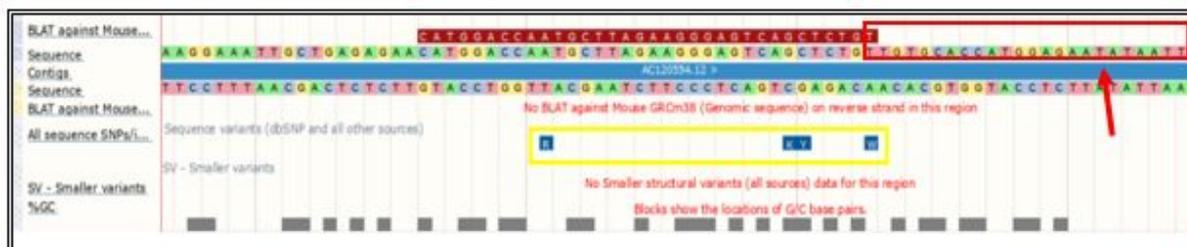
Sequência de DNA desejada

rs8237679 SNP Detail	
Summary	<p>ID rs8237679 dbSNP</p> <p>Variation Type SNP</p> <p>Alleles A/T</p> <p>Created in dbSNP Build 118</p> <p>Last Updated in dbSNP Build 118</p> <p>Additional Resources Browse Genome Browser Ensembl SNPView UCSC Browser NCBI Genome Data Viewer</p>
Genome Location and Flanking Sequence	<p>Location Chr1:58827009 (GRCm38)</p> <p>SNP Orientation to the Genome forward</p> <div style="border: 1px solid red; padding: 5px;"> <p>SNP Reference Flanking Sequence</p> <p>CATG GACCCATGCT TAGAAGGGAG TCAGCTCTG TGTGCACCAT GGAGAAATATA ATCCCCCAA ATCCTCGCAT CTGGATCTTG ATTTTATAT CGACATAGGA GCATATGTCG ACTGGGCTCT GGAGAAACAA CAAGGCATTG TTGCCCTTTC CCTTTTAAAA GGGGATTCT N TTAGTTGAAG TTAGTTGGTT ACAAAGRTGG TGGCACHTCR CATGGGTGGG TTGGTTGGAC CTGACTCTAT AGACTTCCAC CAGTCAGGAA TAGTTGACTA TTTTAAAGSAA GCCCTGGGAG TGAGCCCTGC TGTGACTGTG TAGTGGTGGG AAATGATCTA GAACGTGTTT CTAAGTGCC TCTGTT</p> <p>N = A/T</p> <p>Note: Sequence in lower case indicates low-complexity or repetitive sequence</p> <p>BLAST SNP flanking sequence against the mouse Genome send flank to NCBI BLAST Go</p> </div>

Após a obtenção da sequência desejada foi pesquisado no site Esembl, que é um navegador de genoma para genomas de vertebrados que oferece suporte à pesquisa em genômica comparativa, evolução, variação de sequência e regulação da transcrição. O Ensembl anota genes, calcula alinhamentos múltiplos, prediz a função regulatória e coleta dados de doenças. As ferramentas de ensembl incluem BLAST, BLAT, BioMart e o Variant Effect Predictor (VEP) para todas as espécies com suporte. [14]

Esse navegador auxiliou na escolha da sequência do Primer Reverso com SNP (indicado na imagem abaixo - seta vermelha)

Sequência Primer Reverso com SNP (seta vermelha)



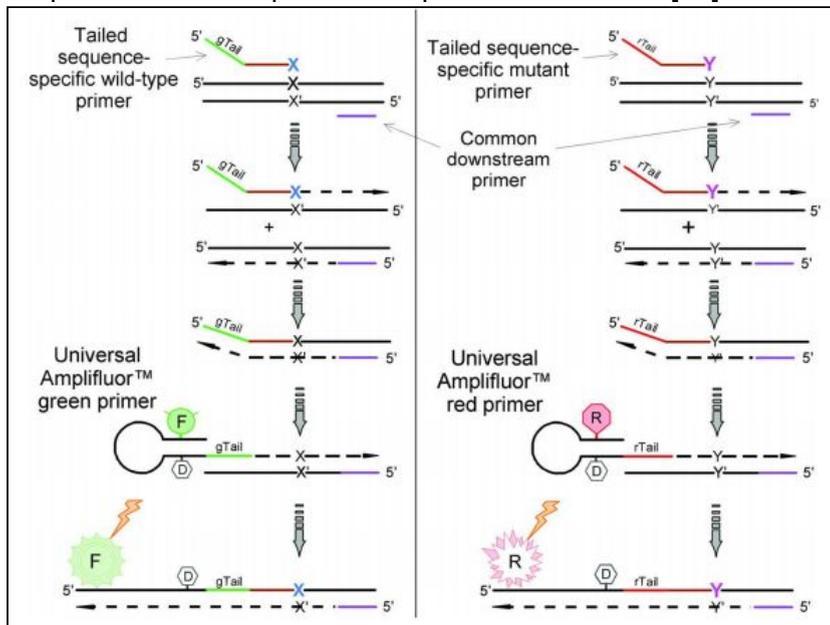
Depois de decidir a sequência com a SNP correta para diferenciar as duas linhagens desejadas, usamos essa sequência para fazer uma análise no site OligoAnalyzer, que é uma ferramenta de análise de primer para oligonucleotídeos, nele é possível projetar e analisar bases de DNA e RNA para obter informações sobre comportamento e propriedades. Essa sequência será o primer reverso com a SNP. [15]

Para obter o Primer Forward Comum para as duas linhagens de camundongo, escolhemos uma sequência com 27 pares de bases que estão 218 pares de bases anteriores à sequência do Primer Reverso com SNP. O Primer Forward Comum terá um total de 247 pares de bases.

Desenho das Sondas Beacon Universais.

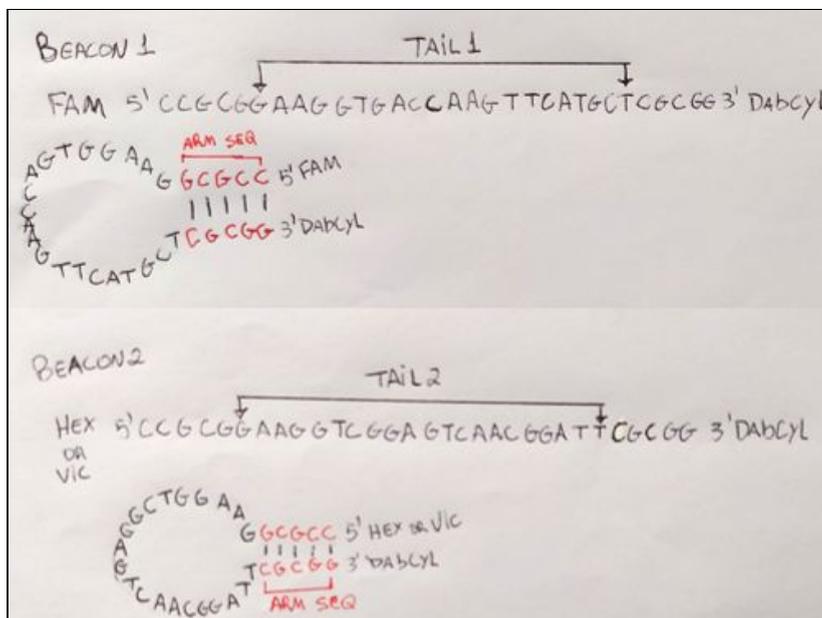
O desenho de sondas universais será realizado utilizando as sequências universais propostas nos ensaios de kits Amplifluor [16], assim como suas sequências complementares para complementação dos primers específicos dos SNPs a serem utilizados como mostrado na imagem abaixo:

Esquema de reação e detecção de SNP de dois alelos usando primers específicos de alelo acoplados com dois primers Amplifluor Universais. [17]



As sequências correspondentes ao perfil que será colocado na sonda e nos primers universais serão as seguintes:

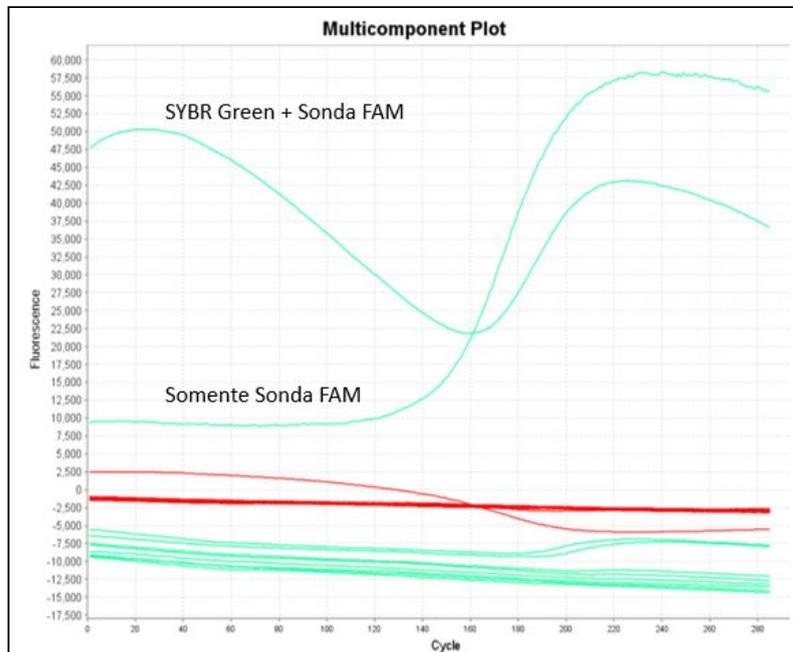
Sequência das Sondas Beacon Universais foram modificados a fim de que as sequências gTails e rTail ficassem entre as regiões do quencher e do fluorocromo, como demonstrado na figura abaixo.



Depois foi estabelecido um Protocolo de PCR e um Protocolo de Eletroforese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dinâmica Sonda Beacon Universal - FAM



A imagem acima apresenta a curva da Sonda FAM juntamente com SYBR green e a curva somente da Sonda FAM. Foi adicionado no primeiro poço da primeira fileira da placa para PCR-RT 1 μ L de Sonda Fam com concentração de 0,637 mM, 10 μ L de PBS (Tampão fosfato-salino) e 5 μ L de SYBR Green e foi feita diluições seriadas nos 4 próximos poços (10, 100, 1000 e 10000 vezes). No primeiro poço da segunda fileira da mesma placa foi adicionado 1 μ L de Sonda Fam com concentração de 0,637 mM, 10 μ L de PBS (Tampão fosfato-salino) e foi feita diluições seriadas nos 4 próximos poços (10, 100, 1000 e 10000 vezes), mas somente os poços sem diluição obtiveram curvas detectáveis no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System. As curvas SYBR Green + Sonda FAM e somente a Sonda FAM estão apontadas na imagem acima. Nesta imagem podemos avaliar o comportamento da Sonda FAM na questão de temperatura e concentração ideal quando esta for acompanhar a amostra de DNA.

A curva do SYBR Green sofre declínio entre as temperaturas de 19 °C a 59 °C pois está se ligando à Sonda FAM, quando às ligações se esgotam a Sonda FAM começa a “abrir o seu grampo” subindo a sua curva entre as temperaturas 59 °C a 79 °C, depois ela chega no seu limite de fluorescência.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ainda é necessário fazer testes e padronizar a utilização das sondas beacon universais juntamente com as amostras de PCR com o DNA dos camundongos isogênicos BALB/cJ e C57BL/6J para concluir de maneira sólida esse trabalho, no entanto, isto irá demandar mais tempo que o prazo final deste projeto. As etapas aqui propostas foram seguidas para mais 31 SNPs com o intuito de produzir um quadro de análise para um número maior de espécies, incluindo todas as isogênicas encontradas no CEMIB/UNICAMP. Estes oligos entrarão em processo de síntese assim que possível. Sem dúvidas as informações aqui geradas facilitarão esta padronização uma vez que a concentração mínima de sonda necessária para detecção pelo equipamento foi encontrada, assim como a dinâmica de intensidade de fluorescência de acordo com a temperatura de análise. Acreditamos que com mais alguns testes realizaremos a padronização desta metodologia, que poder aplicada de acordo com o interesse do centro, para a genotipagem de camundongos isogênicos.