

VI Olimpíada de Biologia de Catalunya

Febrer 2016

Part Pràctica: GENÈTICA

Totes les cèl·lules dels organismes vius contenen àcids nucleics. Tant si són procariotes com eucariotes, el DNA és l'àcid nucleic que conté la informació genètica de l'organisme, però a més, la cèl·lula presenta quantitats importants de RNA de diversos tipus (rRNA, tRNA, mRNA, miRNA...). Si l'organisme és eucariota, el DNA està localitzat en el nucli de les seves cèl·lules.

Atès que el DNA conté la informació genètica de l'organisme, si el podem extreure i analitzar-lo podrem estudiar la variabilitat genètica, identificar mutacions en malalties, determinar les relacions de paternitat/maternitat. Per tant, sens dubte, l'extracció de DNA és molt rellevant per als estudis genètics. Extreure DNA de qualsevol teixit no demana aparells especials ni reactius difícils de trobar, però si cal conèixer les propietats físico-químiques dels àcids nucleics envers de les altres molècules biològiques per a poder-ne fer una separació diferencial. Si volem analitzar DNA, cal evitar contaminació amb d'altres molècules. A més, cal tenir en compte que com a defensa davant la possible invasió d'àcids nucleics (i, per tant, d'informació genètica) forànis, les cèl·lules disposen d'un arsenal d'enzims degradadors específics, les RNases i les DNases, i per això, cal anar amb especial cura quan volem extreure àcid nucleic i que aquest no es degradi.

Als laboratoris de genètica i biologia molecular es poden fer servir "kits" d'extracció de DNA que assegurin especificitat, manca de contaminants i integritat de l'àcid nucleic obtingut, simplificant i optimitzant el procés d'obtenció i anàlisi posterior.

Així, doncs, aquesta pràctica constituirà en obtenir el DNA de cadascun de vosaltres, a partir d'una mostra bucal (les cèl·lules epitelials de la vostra mucosa bucal), d'una manera gens agressiva i tal i com es pot fer en un laboratori d'anàlisi forense o de genètica molecular humana, emprant un "kit" especialment dissenyat per a aquesta tasca, que utilitza boles magnètiques per a capturar el DNA i separar-lo amb un imant de la resta del lisat cel·lular. Aquest DNA serà el·luït, carregat i separat mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa i visualitzat mitjançant un agent intercalant i llum UV. El protocol experimental del "kit" ha estat adaptat a l'elevat nombre d'alumnes i al temps de la pràctica, simplificant el nombre de passos i sacrificant també, la puresa de l'àcid nucleic que obtindreu. Tanmateix, raonarem el com i per què de cada pas del protocol, i com influeix en el resultat final. En aquesta pràctica es valoraran la capacitat de comprensió, la integració de conceptes, la destresa manual, l'execució d'accions, l'activitat individual i de col·laboració en equip, l'estratègia de treball, la presa de decisions.

MagMAX™

THERMO-FISHER

DNA Multi-Sample Kit

REACTIUS

- Boles d'Unió al DNA (*DNA Binding Beads*), 10 mg/ml
- Tampó d'Elució 1 del DNA
- Tampó d'Elució 2 del DNA
- Tampó de Lisat de DNA Multi-Mostra
- Solució de Rentat 1
- Solució de Rentat 2
- Aigua estèril lliure de DNAses (resuspensió del DNA)
- Aigua estèril (rentat de la cavitat bucal)

PROTOCOL ADAPTAT PER A LES "OLIMPIADES DE BIOLOGIA 2016 (CATALUNYA)" per M^a JOSÉ LÓPEZ-INIESTA i GEMMA MARFANY (UNIVERSITAT DE BARCELONA)

CONSIDERACIONS GENERALS

Recomanacions

- El protocol s'ha de fer a temperatura ambient (20 a 25 °C) excepte quan s'indiqui.
- Evita crear bombolles quan barregis les mostres per pipeteig.
- Quan aspiris, compte amb no separar les boles magnètiques que uneixen el DNA de l'imant.
- Quan capturis les boles en l'imant, pots extreure el líquid sobrenedant quan estigui totalment clar. El temps necessari per recollir el sobrenedant varia segons el tipus de mostra i la quantitat de DNA present.
- Tapa els tubs mentre facis les reaccions d'unió, rentat i elució, per evitar pèrdua de material i contaminació.
- Usa tubs de plàstic de volum 2 ml.
- Mentre facis els passos del protocol de Rentat i Elució, barreja les mostres amb vòrtex o remenant els tubs, per evitar que s'enganxin les boles magnètiques a les parets de plàstic dels tubs.
- Usa pipetes de volum menor (per exemple, les de volum entre 20 i 200 µl per a extreure el líquid sobrenedant sense remenar les boles enganxades a l'imant).

Obtenció de DNA genòmic a partir de mucosa bucal

Abans de començar

- Revisa les recomanacions de la primera pàgina.
- Engega un bloc d'escalfament (o bany sec) per a escalfar a 70 °C.
- Assegura't que tens tots els reactius abans de començar el protocol.

Recollir i lisar les mostres

1. Amb 10 ml d'aigua estèril renta curosament la boca. Es tracta de remoure l'aigua (ablució) dins la cavitat bucal uns quants minuts.
2. Recull almenys 5 ml en un tub de plàstic estèril de 15 ml.
3. Centrifuga a 2000 rpm durant 5 min. Les cèl·lules de la mucosa bucal han de quedar en un pellet al fons del tub.
4. Descarta el sobrenedant i resuspen en 200 µl de Tampó de Lisat de DNA Multi-Mostra (tub MS)
5. Recull les cèl·lules i passa-les a un tub nou estèril de 2 ml.
6. Remena vigorosament durant 3 minuts a velocitat mitjana en un vòrtex, fins que el pellet es resuspengui.

Extracció del DNA

7. Afegeix 160 µl d'isopropanol 100% (IP) a cada lisat
8. Barreja vigorosament per inversió el tub durant 2 minuts .
9. Afegeix 40 µl de la barreja preparada de les boles magnètiques per unir al DNA (BM). Barreja vigorosament per inversió el tub.
10. Posa el tub en l'imant durant 2 minuts, fins que la solució quedi clara i les boles magnètiques s'enganxin a la paret de l'imant.
11. Descarta el sobrenedant curosament, evitant emportar-te les boles magnètiques.
12. Renta la mostra amb 500 µl de la Solució de Rentat 1 (tub WS1). Treu el tub fora de l'imant i barreja vigorosament per inversió el tub.
13. Posa el tub en l'imant durant 1-2 minuts, fins que la solució quedi clara i les boles magnètiques s'enganxin a la paret de l'imant.
14. Descarta el sobrenedant curosament, evitant emportar-te les boles magnètiques. Repeteix el pas 6, però emprant 500 µl de Solució de Rentat 2 (tub WS2).

15. Mantenint el tub en l'imant, descarta el sobrenedant curosament, evitant emportar-te les boles magnètiques. Seca a l'aire el tub obert durant uns 3 minuts, encara enganxat a l'imant.

16. OPCIONAL!!!! SI NO, ES POT SALTAR I ANAR AL PUNT 17

- Mentres els tubs s'assequen a l'aire, prepara una solució fresca de RNase A per a les teves mostres.
- Treu el tub de l'imant, afegeix 100 µl de solució de RNasa a la mostra, barreja els tubs vigorosament per inversió.
- Treu el tub de l'imant, afegeix 100 µl de Tampó de Lisat de DNA Multi-Mostra, més 120 µl d'isopropanol 100%, barreja els tubs vigorosament per inversió.
- Posa el tub en l'imant durant 1-2 minuts, fins que la solució quedi clara i les boles magnètiques s'enganxin a la paret de l'imant.
- Repeteix el pas 12, afegint Solució de Rentat 2. Mantenint el tub en l'imant, descarta el sobrenedant curosament, evitant emportar-te les boles magnètiques. Seca a l'aire el tub obert durant uns 3 minuts, encara enganxat a l'imant.

Elució

17. Afegeix 25 µl de Tampó d'Elució 1 del DNA a la mostra (EB1 tub)
18. Molt breument, fes un vòrtex per separar les boles.
19. Incuba la mostra a 70 °C durant 5 min en un bloc sec amb el tub tapat.
20. Treu el tub i afegeix 25 µl de Tampó d'Elució 2 a la (EB2 tub)
21. Si fa falta, dóna un cop de vòrtex al tub. També pots fer-ho per agitació per inversió durant 20 segons, fins que les boles magnètiques quedin resuspeses. Col·locar llavors el tub a l'imant, fins que la solució quedi clara i les boles magnètiques s'enganxin a la paret de l'imant.
22. Mantenint el tub en l'imant, agafa el sobrenedant curosament, evitant emportar-te les boles magnètiques, i trasllada el volum que puguis recuperar (conté el DNA eluït) a un nou tub.

Electroforesi de DNA i Visualització

23. Agafa 16 µl del DNA i afegeix 4 µl de Tampó de Càrrega (TC tub).
24. Carrega la mostra en un gel horitzontal d'agarosa.
25. Connecta la font d'electroforesi a 120 V. Deixa'l córrer 20-30 min
26. Visualitza el gel sota llum UV.

MagMAX™

THERMO-FISHER

DNA Multi-Sample Kit

REAGENTS

- DNA Binding Beads, 10 mg/mL
- DNA Elution Buffer 1
- DNA Elution Buffer 2
- Multi-Sample DNA Lysis Buffer
- Wash Solution 1
- Wash Solution 2
- Water nuclease-free (DNA resuspension)
- Water sterile (mouth wash)

ADAPTED PROTOCOL FOR THE "OLIMPIADES DE BIOLOGIA 2016
(CATALUNYA)" BY M^a JOSÉ LÓPEZ-INIESTA AND GEMMA MARFANY
(UNIVERSITAT DE BARCELONA)

GENERAL CONSIDERATIONS

Guidelines

- Perform the protocol at room temperature (20 to 25 °C) except where noted.
- Store and use the DNA Elution Buffers at room temperature.
- Avoid creating bubbles when mixing samples by pipetting up/down.
- When aspirating, be careful not to dislodge the DNA binding beads from the magnet.
- When capturing beads on the magnetic stand, you can remove the supernatant once the solution is clear. The bead collection times can vary depending on sample type and the quantity of nucleic acid used.
- Close the tubes during the binding, washing, and elution steps to prevent spill-over and cross-contamination.
- The vortex shaking speeds in this protocol are recommendations, as the speeds can vary depending on the model of vortexer used. Ideal speeds mix the samples thoroughly without splashing.
- Use 2-mL reaction tubes for all samples.
- During the washing and elution steps, vortex the samples in short pulses to prevent the beads from sticking to the sides of the tubes.
- If the DNA Binding Beads are being removed with the supernatant, use smaller pipet tips to remove the supernatant

Isolation of genomic DNA from buccal swabs

Before you begin

- Review the guidelines described in the first page.
- Preheat a heated block (or alternate heat source) to 70 °C.
- Be sure you have all the reagents you need before starting the protocol.

Collect and disrupt the sample

1. Use 10 ml sterile water to wash thoroughly your mouth. Keep moving the water inside your buccal cavity back and forth for several minutes.
2. Collect at least 5 ml in a 15 ml plastic sterile tube.
3. Centrifuge at 2000 rpm for 5 min. The buccal mucose cells will pellet at the bottom.
4. Discard the supernatant and resuspend with For each buccal swab, add 200 μ L of Multi-Sample DNA Lysis Buffer (MS tube)
5. Collect the cells and pass them into a fresh 2 mL processing tube.
6. Shake the tube for 3 minutes at speed 1 or 2 on the vortex adaptor, until the pellet is resuspended.

Perform the DNA extraction

1. Add 160 μ L of 100% isopropanol to each lysate (IP tube)
2. Shake end-over-end the processing tube vigorously for 3 minutes.
3. Add 40 μ L of prepared DNA-binding bead mix to the sample, then shake the tube end-over-end with vigour (Mag tube)
4. Place the tube on the magnetic stand for 2 minutes or until the solution clears and the beads are pelleted against the magnet.
5. Discard the supernatant carefully, avoiding the beads.
6. Wash the sample using 500 μ L of Wash Solution 1 (WS1 tube). Take the tube out of the magnet and shake vigorously end-over-end.
7. Place the tube on the magnetic stand for 1-2 minutes until the beads are pelleted against the magnet.
8. Discard the supernatant being careful not to disturb the beads. Repeat step 5 using 500 μ L of Wash Solution 2 (WS2 tube)
9. Keeping the tube on the magnetic stand, discard the supernatant, being careful not to disturb the beads. Air-dry the uncapped tubes on the magnetic stand for 3 minutes.

10. OPTIONAL!!!! OTHERWISE SKIP AND GO TO POINT 11

- While the tubes are drying, prepare sufficient RNase A mix for your samples.
- Remove the tube from the magnetic stand, add 100 μ L of RNase mixture to the sample, then shake the tube for 2 minutes at speed 1 or 2 on the vortex adaptor.
- Remove the tube from the vortex adaptor, add 100 μ L of Multi-Sample DNA Lysis Buffer and 120 μ L of 100% isopropanol to the sample, then shake the tube for 3 minutes at the vortex.
- Place the tube on the magnetic stand for 1 minute until the beads are pelleted against the magnet.
- Repeat step 5 twice more using Wash Solution 2. While the tube is on the magnet, discard the supernatant, then air-dry the uncapped sample on the magnetic stand for 3 minutes

Perform the elution

11. Add 25 μ L of DNA Elution Buffer 1 to the sample (EB1 tube)
12. Briefly vortex the sample to break apart the beads.
13. Incubate the sample at 70 °C for 5 min on a heated block.
14. Remove the tube and add 25 μ L of DNA Elution Buffer 2 to the sample (EB2 tube)
15. Gently vortex the sample for 20 to 30 seconds until resuspended, then place the tube on the magnetic stand for 5 minutes or until the solution clears and the beads are pelleted against the magnet.
16. While the tube is on the magnet, transfer the eluate (which contains the purified DNA) to a new tube, then close the tube immediately.

DNA Electrophoresis and Visualization

17. Take 16 μ L of your DNA and add 4 μ L of Loading Buffer x 5 (TC tube).
18. Load it into the well of an horizontal agarose gel.
19. Connect the electrophoresis source to 100 V. Let it run for 30 min
20. Visualize it under the UV light.

PREGUNTES CLICKERS

1. En una obtenció de DNA des de mostra biològica és imprescindible:
 - a. Utilitzar un detergent per disgregar membranes
 - b. Usar solucions de rentat per a que el DNA no quedi brut
 - c. Afegir boles magnètiques per a capturar el DNA
 - d. Fer servir el vòrtex per trencar molt bé les cèl·lules
2. Quan es treballa amb DNA tot el material ha de ser estèril perquè:
 - a. hi ha bacteris en l'ambient que podrien degradar-lo
 - b. hi ha fongs en l'ambient que podrien degradar-lo
 - c. hi ha RNases en l'ambient que podrien degradar-lo
 - d. hi ha DNases en l'ambient que podrien degradar-lo
3. Suposa que obtens una petita mostra de les boles magnètiques en dos punts diferents del protocol. Primera mostra: Just després dels rentats amb la solució 1 i 2. Segona mostra: just després de l'elució amb aigua. Què hi trobaràs unit a les boles?
 - a. Tant en el punt 1 com en el punt 2 hi trobarem DNA unit a les boles
 - b. Ni en el punt 1 ni en el punt 2 hi trobarem DNA unit a les boles
 - c. En el punt 1, tindrem DNA unit a les boles, però no en el punt 2
 - d. En el punt 1 no hi tindrem DNA unit a les boles, però en el punt 2 sí
4. En una electroforesi els àcids nucleics:
 - a. Se separen segons la mida i la càrrega diferencial quan apliquem un camp elèctric
 - b. Se separen segons la mida quan apliquem un camp elèctric
 - c. Se separen inversament proporcionals a la seva càrrega
 - d. Se separen per l'acció de l'agarosa sobre el DNA
5. Després de l'electroforesi, tens una foto com la que veus aquí mateix. En el carril M hi ha el marcador de pes molecular. En els carrils 1 i 2, una extracció de DNA de mucosa bucal de dues persones diferents. Mira bé aquesta imatge i dedueix què hi veus.
 - a. En el carril 1 i 2 hi ha DNA de bona qualitat, mentre que en el carril 3 hi ha RNA
 - b. En el carril 1 hi ha DNA d'alt pes molecular, mentre que en el carril 2 hi ha DNA degradat, i en el carril 3 hi ha RNA.
 - c. En el carril 1 hi ha RNA, en el carril 2 hi ha DNA sense degradar i en el carril 3, RNA
 - d. Tot és DNA, però en el carril 1 hi ha DNA del marcador de pes molecular, en el carril 2 hi ha DNA sense degradar i en el carril 3, DNA molt degradat.

