



**Ciências
ULisboa**

Faculdade
de Ciências
da Universidade
de Lisboa



2022/2023

FUNDAMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR PRÁTICAS LABORATORIAIS

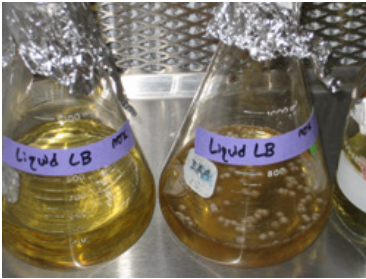
Departamento de Biologia Vegetal
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Docentes:

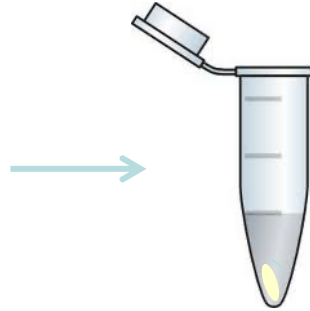
**Mónica Sebastiana
Rita Santos
Filipa Monteiro
Fernando Dias
Susana serrazina**

**mgsebastiana@fc.ul.pt
absantos@fc.ul.pt
fimonteiro@fc.ul.pt
fmdias@fc.ul.pt
smserrazina@fc.ul.pt**

Relembrar: Miniprep



Cultura bacteriana



Pellet bacteriano

Ressuspensão: Solução I

Tris HCl: tampão (pH estável)

EDTA: quelata Mg^{2+} e Ca^{2+}
(essenciais para DNase)

Glucose: pressão osmótica
(integridade celular)

10 min, 4 °C

Neutralização: Solução III

NaAc: neutralização para
renaturação do DNA
plasmídico

(DNA cromossômico não renatura,
moléculas grandes)

5 min, gelo

5 min, gelo

CUIDADO, não
ultrapassar 5 min

Lise: Solução II

NaOH: base (ruptura da
parede e desnaturação de
DNA)

SDS: detergente (solubiliza
membrana e desnatura
proteínas)



10 min, 14000 g

Recolher
sobrenadante para
novo tubo e
adicionar etanol
absoluto frio



5 min, 14000 g

Lavar o *pellet* com
etanol 70 %

Relembrar: Miniprep



10 min, 14000 g

Recolher sobrenadante para novo tubo e adicionar etanol absoluto frio



5 min, 14000 g

Lavar o *pellet* com etanol 70 %



5 min, 14000 g

Ressuspender em ddH₂O

Descartar o sobrenadante e secar o *pellet* ao ar



Etiquetar (Turma/data)

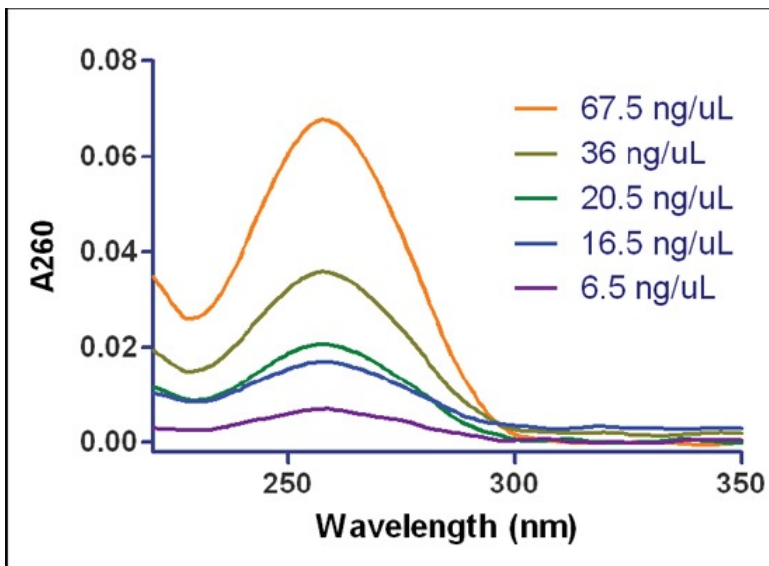
Congelar a -20 °C

Quantificação DNA plasmídico

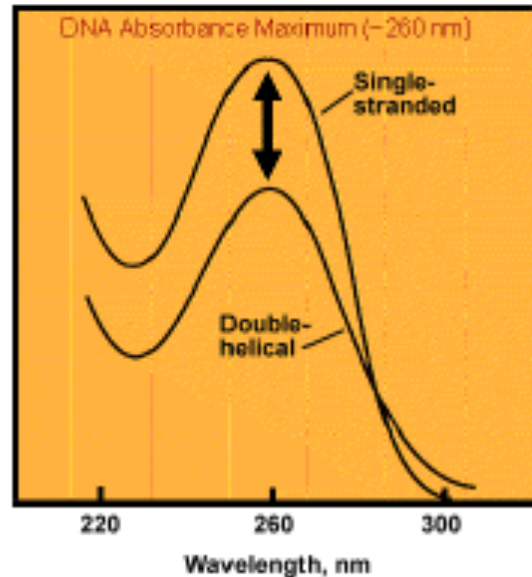


Nanodrop: aparelho que utiliza o princípio da espectrofotometria mas necessita apenas de um pequeno volume de amostra (1-2 μ l)

“As bases púricas e pirimídicas dos nucleótidos absorvem luz ultravioleta (UV) na gama de comprimentos de onda compreendidos entre 200 nm e 350 nm, apresentando um pico de absorção máxima a cerca de 260 nm. Assim, quanto mais luz for absorvida pela amostra de ácido nucleico, mais elevada será a sua concentração. Usando a Lei de Lambert-Beer é possível relacionar a quantidade de luz absorvida em função da concentração da molécula que absorve essa luz.”



Quantificação DNA plasmídico



A absorvência a 260 nm é maior para nucleótidos isolados, intermédia para DNA de cadeia simples (ssDNA), ou RNA, e menor para DNA de cadeia dupla (dsDNA). A absorvência a 260nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos:

$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 50 \mu\text{g/ml}$ dsDNA
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 33 \mu\text{g/ml}$ ssDNA
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 40 \mu\text{g/ml}$ ssRNA
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 20 - 30 \mu\text{g/ml}$ oligonucleótido

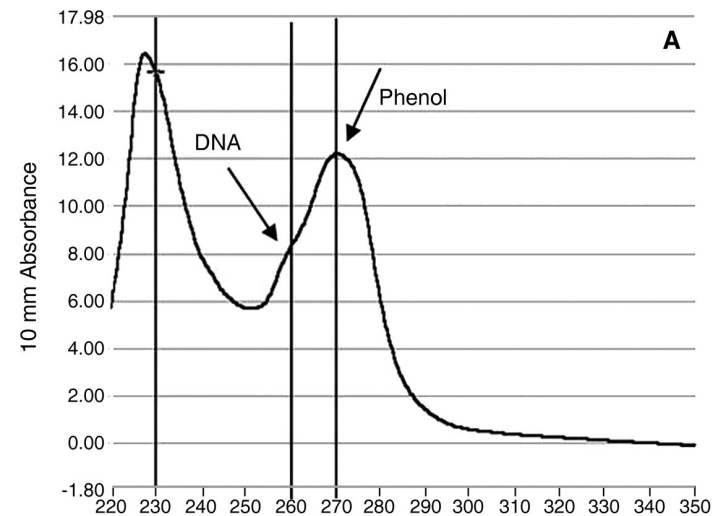
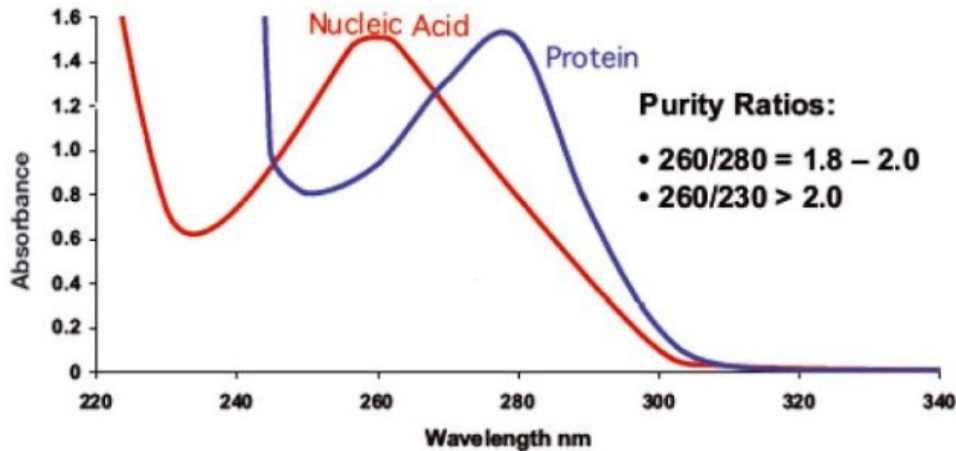
A concentração de DNA ou RNA é então calculada da seguinte forma:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/ml})] = (\text{DO}_{260}) \times (\text{fator de diluição}) \times (50 \mu\text{g DNA/ml}) / (1 \text{ OD}_{260} \text{ unidade})$$

$$[\text{RNA } (\mu\text{g/ml})] = (\text{DO}_{260}) \times (\text{fator de diluição}) \times (40 \mu\text{g RNA/ml}) / (1 \text{ OD}_{260} \text{ unidade})$$

Quantificação DNA plasmídico

As propriedades óticas são usadas não só para detetar e quantificar os ácidos nucleicos, mas também para avaliar o seu grau de pureza. Dependendo do protocolo de extração, as preparações podem conter contaminantes tais como proteínas, álcoois, fenóis e sais, capazes de interferir com a quantificação rigorosa das biomoléculas purificadas por sobreposição dos perfis de absorvência.



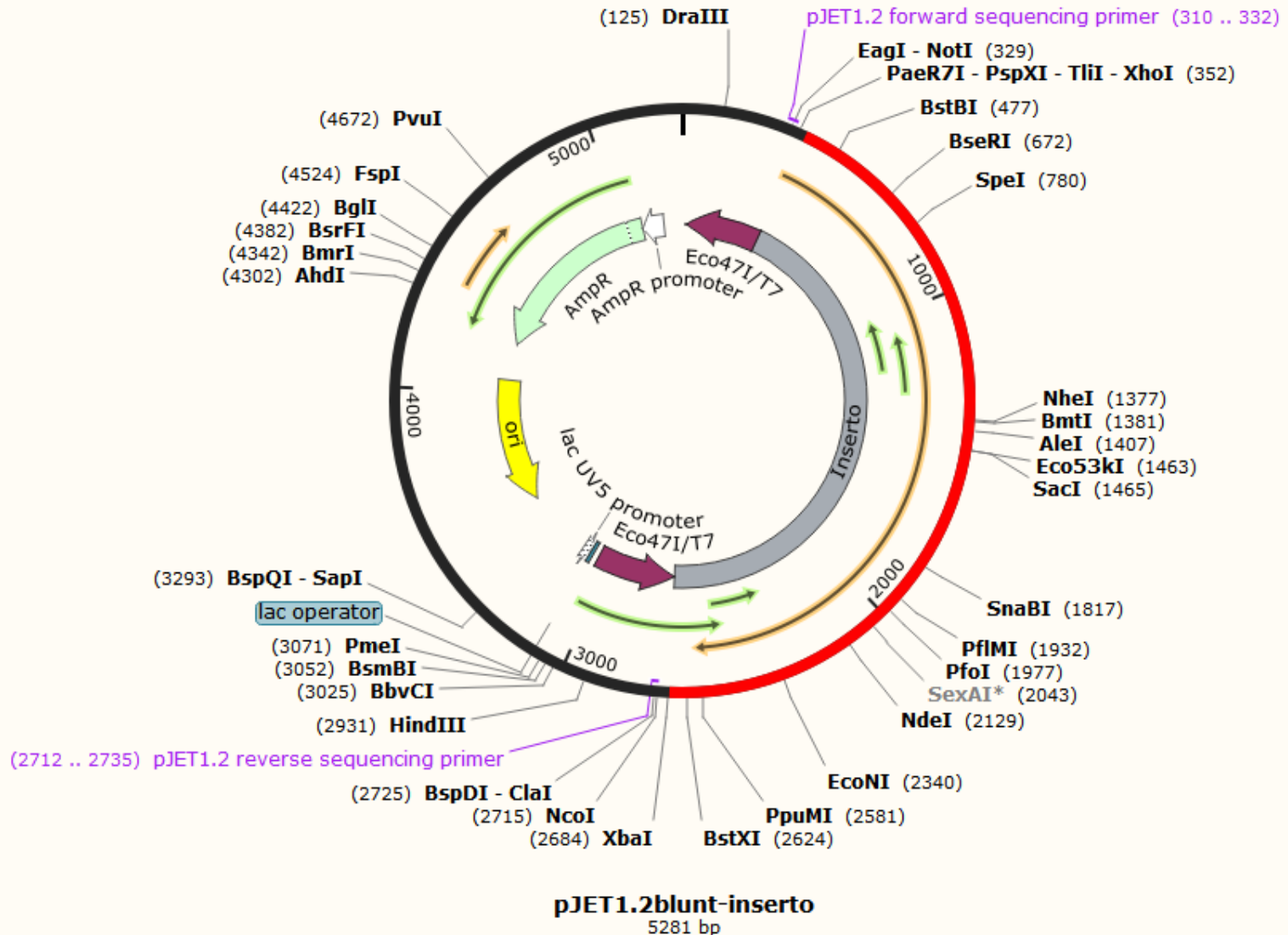
Importante: cálculo das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

A_{260}/A_{280} deve estar entre 1.8 e 2.0. Se < 1.8 : contaminação com proteínas ou fenóis

A_{260}/A_{230} deve estar entre 2.0 e 2.2. Se < 2.0 : contaminantes que absorvem a 230, ex. EDTA, carboidratos, sais, ureia

Plasmídeo

pJET 1.2 + inserto 2300 bp



Abordagem experimental

Amplificação o inserto de 2300 bp por PCR



- Tampão [10x]: 2 μL
- MgCl_2 [25 mM]: 2 μL
- Primer PjetFwd [5 pmol μL^{-1}]: 2 μL
- Primer PjetRev [5 pmol μL^{-1}]: 2 μL
- dNTP [5 mM]: 1 μL
- DNA: 20 ng de DNA plasmídico
- Taq [1U μL^{-1}]: 0,5 μL
- ddH_2O : para perfazer 20 μL

Programa:

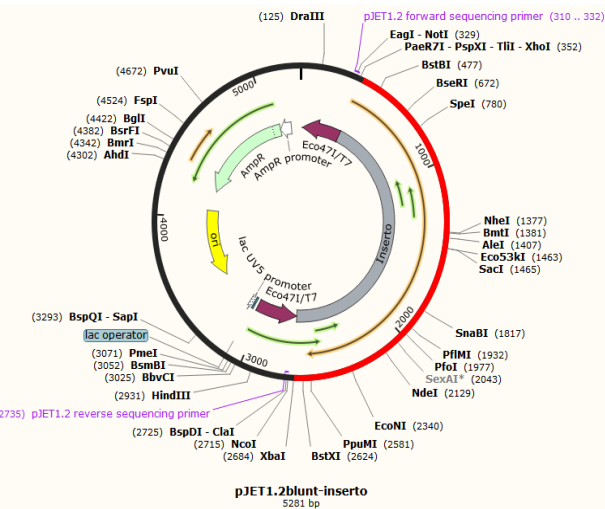
94 °C - 2 min.
94 °C - 1 min.
60 °C - 1 min.
72 °C - 3 min
Repetir os passos de 2 a 4 - 29x
72 °C - 10 min
4 °C, até retirar do PCR
Congelar a -20°C até utilização

Digestão para isolamento do inserto de 2300 bp



- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300: 2,5 μL
- enzima *XhoI*: 1 μL
- tampão de reação [10x]: 2,5 μL
- ddH_2O até perfazer um volume total de 25 μL

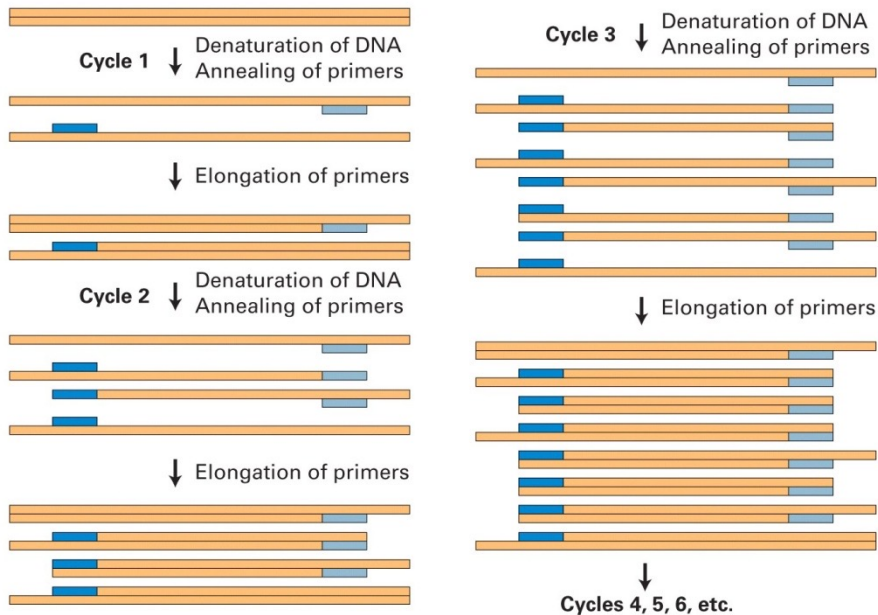
Incubar a 37°C, durante a noite. Congelar a -20°C até utilização.



PCR

Reacção em cadeia da polimerase: usada a partir dos anos 80
(Kary Mullis, prémio Nobel)

Amplificação de DNA sem uso de organismo vivo



Thermus aquaticus

Taq polimerase:
MW ~94 kDa; resistente a altas temperaturas



Técnica fundamental de Biologia Molecular

Clonagem, sequenciação, proteínas recombinantes, detecção de DNA vestigial; doenças genéticas, etc.

PCR

Componentes:

- DNA
- dNTPs (mistura dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos)
- *Primers* (oligonucleotídeos)
- Enzima (Taq DNA polimerase)
- Solução tampão (pH ; Mg²⁺)

Primers*

Geralmente 18-24 bases

~50% GC

G ou C em 3'

Preferencialmente T_m semelhante nos dois *primers*



Programa de PCR

Vários ciclos (~20-40) de :
Desnaturação
Emparelhamento
Extensão.

PCR

Mistura de reação (microtubo de 200 μL – volume final 20 μL):

- Tampão [10x]: 2 μL
- MgCl_2 [25 mM]: 2 μL
- *Primer* PjetFw [5 pmol μL^{-1}]: 2 μL
- *Primer* PjetRev [5 pmol μL^{-1}]: 2 μL
- dNTP [5 mM]: 2 μL
- DNA: 20 ng de DNA plasmídico (Pjet1.2sp2300, concentração inicial 100 ng mL^{-1})
- *Taq* [1U μL^{-1}] : 0,5 μL
- ddH₂O: para perfazer 20 μL

PCR



Programa:

94 °C - 2 min. (desnaturação inicial)

94 °C - 1 min. (desnaturação)

60 °C - 1 min. (emparelhamento)

72 °C - 3 min (extensão: 1 min por cada 1000 bp)

Repetir os passos de 2 a 4 - 29x

72 °C – 10 min

4 °C, até retirar do PCR

Congelar a -20°C até utilização

PCR



Programa:

94 °C - 2 min. (desnaturação inicial)

94 °C - 1 min. (desnaturação)

60 °C - 1 min. (emparelhamento)

72 °C - 3 min (extensão: 1 min por cada 1000 bp)

Repetir os passos de 2 a 4 - 29x

72 °C – 10 min

4 °C, até retirar do PCR

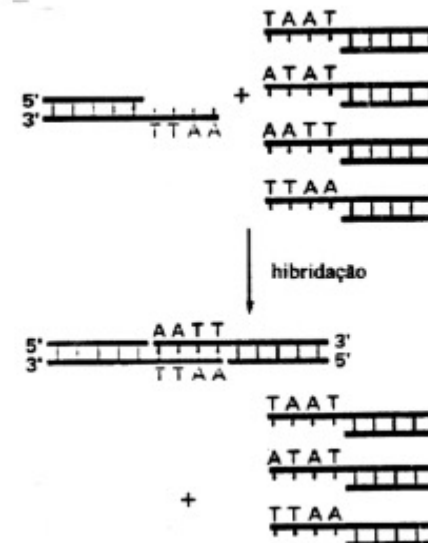
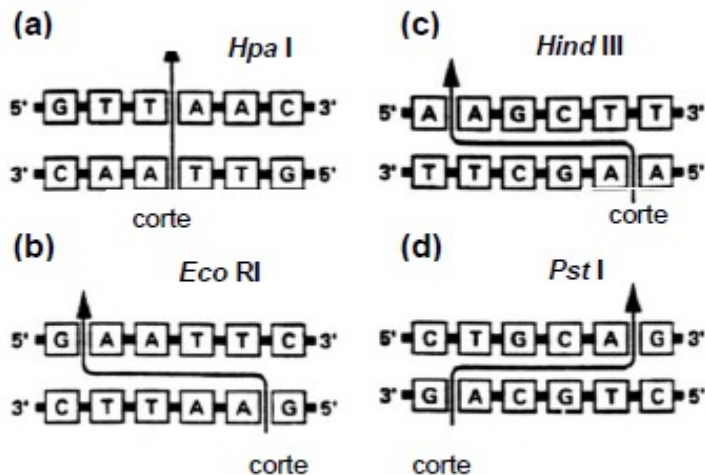
Congelar a -20°C até utilização

Digestão

Existem várias enzimas que atuam sobre os ácidos nucleicos, algumas sem especificidade em relação às bases, como a DNase que degrada moléculas de DNA e a RNase que degrada moléculas de RNA.

Por outro lado existem enzimas com elevada especificidade – ex. **enzimas de restrição**

As seqüências de reconhecimento são em geral simétricas, isto é, a mesma seqüência de 4 a 8 nucleótidos quando lida na direção 5'- 3', está presente em ambas as cadeias do DNA, ocorrendo portanto em sentidos inversos na dupla hélice.



Digestão

O resultado do corte de uma molécula de DNA por uma enzima de restrição pode gerar fragmentos com extremidades retas, como é o caso da enzima *HpaI*; porém, a maioria das enzimas de restrição, ao cortar a dupla hélice, origina fragmentos com extremidades **coesivas**.



No laboratório.....

Tampão: Concentração salina; catiões (Na^{2+} , K^{2+}); pH (geralmente 8)

Temperatura: geralmente 37°C

Conservação: glicerol, baixa temperatura. Importante: **Não descongelar!**

Atividade “*star*”: em condições não óptimas (ex: *EcoRI*)

Digestão múltipla: tampão compatível ou purificação do DNA entre digestões

Tipo de DNA (sequências adjacentes)

Digestão

Digestão com enzima de restrição

Digerir o plasmídeo Pjet1.2sp2300 com enzima de restrição *Xho*I [10U/μL].



Mistura de reação (microtubo de 1,5 mL – volume final 25 μL):

- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300: 2,5 μL
- enzima *Xho*I: 1 μL
- tampão de reação [10x]: 2,5 μL
- ddH₂O até perfazer um volume total de 25 μL

Incubar a 37°C, durante a noite. Congelar a -20°C até utilização.