



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:

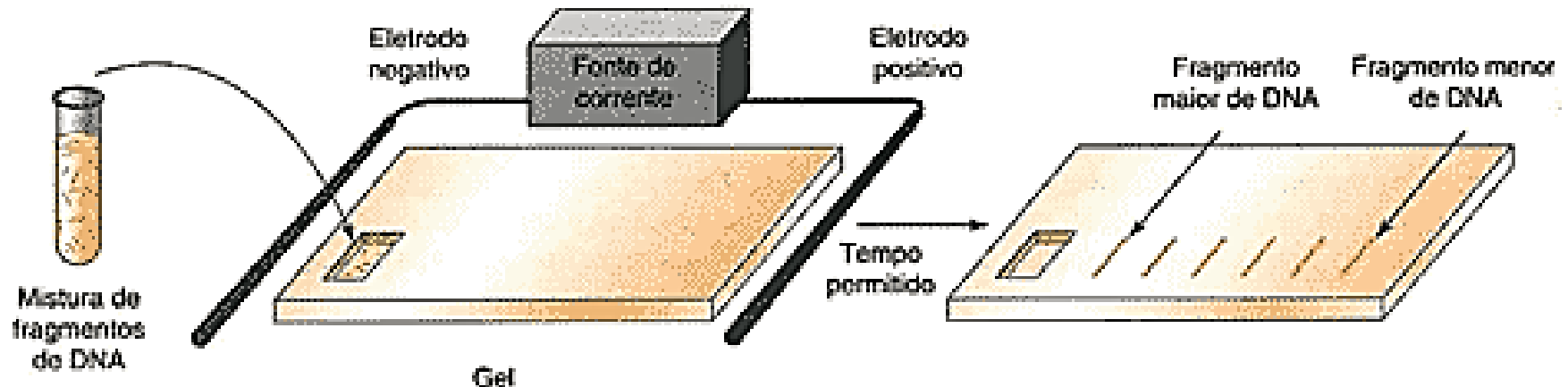
Mónica Sebastiana
Rita Santos
Susana Martins
Fernando Dias
Susana Serrazina

mgsebastiana@fc.ul.pt
absantos@fc.ul.pt
sgmartins@ciencias.ulisboa.pt
fmdias@fc.ul.pt
sm_serrazina@fc.ul.pt

Eletroforese em gel de agarose

Eletroforese na análise de ácidos nucleicos:

“A eletroforese consiste no movimento de partículas carregadas sob a ação de um campo elétrico. Sob a ação de um campo elétrico, os cátions (íons de carga positiva) movem-se para o cátodo (polo negativo), e os aniões (íons de carga negativa) movem-se para o ânodo (polo positivo), com velocidades diferentes. A diferente velocidade de migração está relacionada com a **carga** e/ou **massa molecular** das moléculas em análise.”

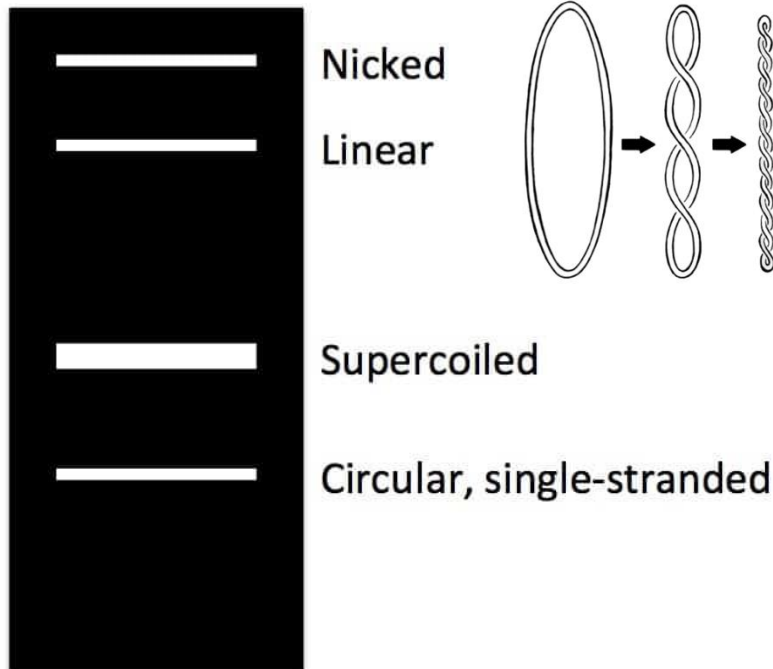


Eletoforese em gel de agarose

Técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas numa matriz semi-sólida durante a aplicação de uma diferença de potencial.

A eletroforese normalmente é utilizada para separar **proteínas** e moléculas de **DNA** e **RNA**.

As moléculas são separadas de acordo com a sua dimensão; as de menor massa irão migrar mais rapidamente.



Moléculas de DNA com mesmo peso molecular, mas com configurações espaciais diferentes (superenroladas, circulares, lineares), migram com velocidades diferentes.

Moléculas de DNA com corte em uma das cadeias (“*Nicked*” ou “*Relaxed*”), migram mais lentamente que as moléculas lineares ou superenroladas de mesmo peso molecular.

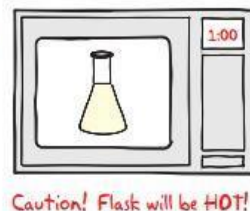
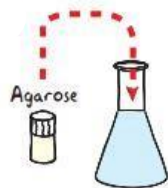
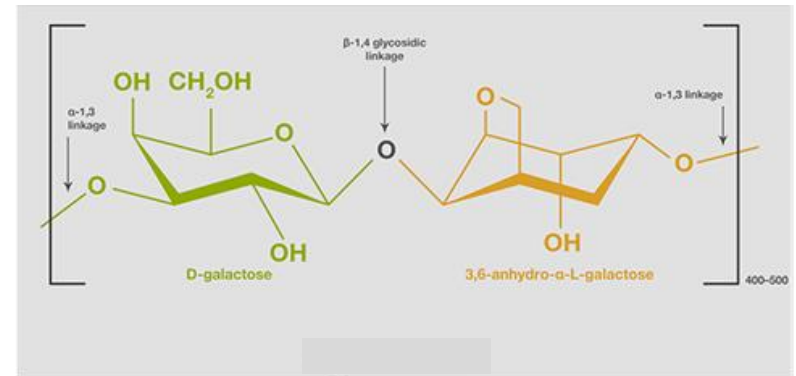
Componentes

Agarose:

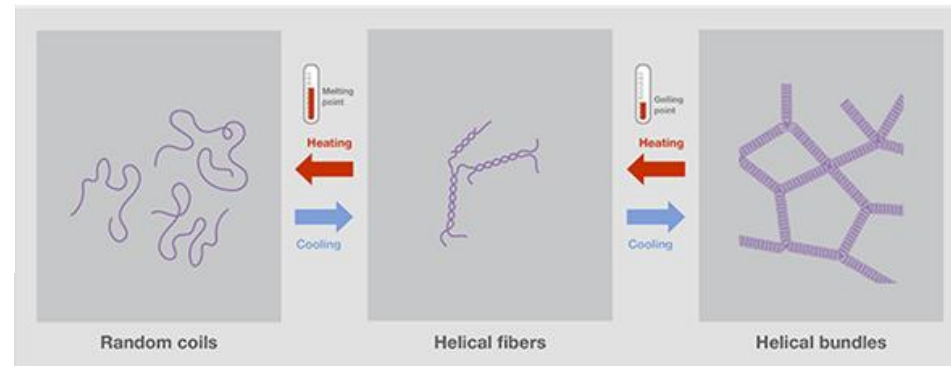
-A agarose é um polissacarídeo

- Usada em concentrações de 0,5 a 2%
- Fácil de preparar
- Não-tóxico
- Ampla capacidade de separação de fragmentos
- Baixa resolução

Outro tipo de matriz: poli(acrilamida)



Caution! Flask will be HOT!



Componentes

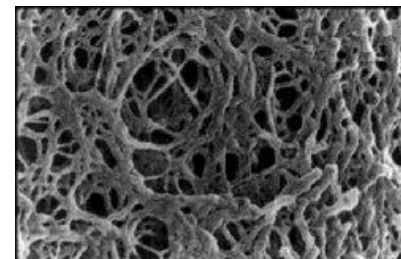
“A migração de moléculas lineares é inversamente proporcional ao logaritmo da sua dimensão. **A mobilidade é influenciada pela massa molecular relativa dos próprios ácidos nucleicos, pela porosidade do gel, pela forma e carga das moléculas.** No entanto, uma vez que as moléculas de DNA têm toda carga elétrica negativa, a migração é limitada pelo **atrito** causado pela malha de agarose”

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

Poros maior

Poros menor

Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments



Componentes

Tampão de eletroforese:

“A mobilidade eletroforética do DNA é afetada pela composição e força iônica do tampão de eletroforese. Na ausência de íons a mobilidade do DNA é nula (ou quase) devido à falta de condutância elétrica. Os dois principais tampões utilizados como electrólitos durante a eletroforese em gel de agarose são TBE e TAE. “

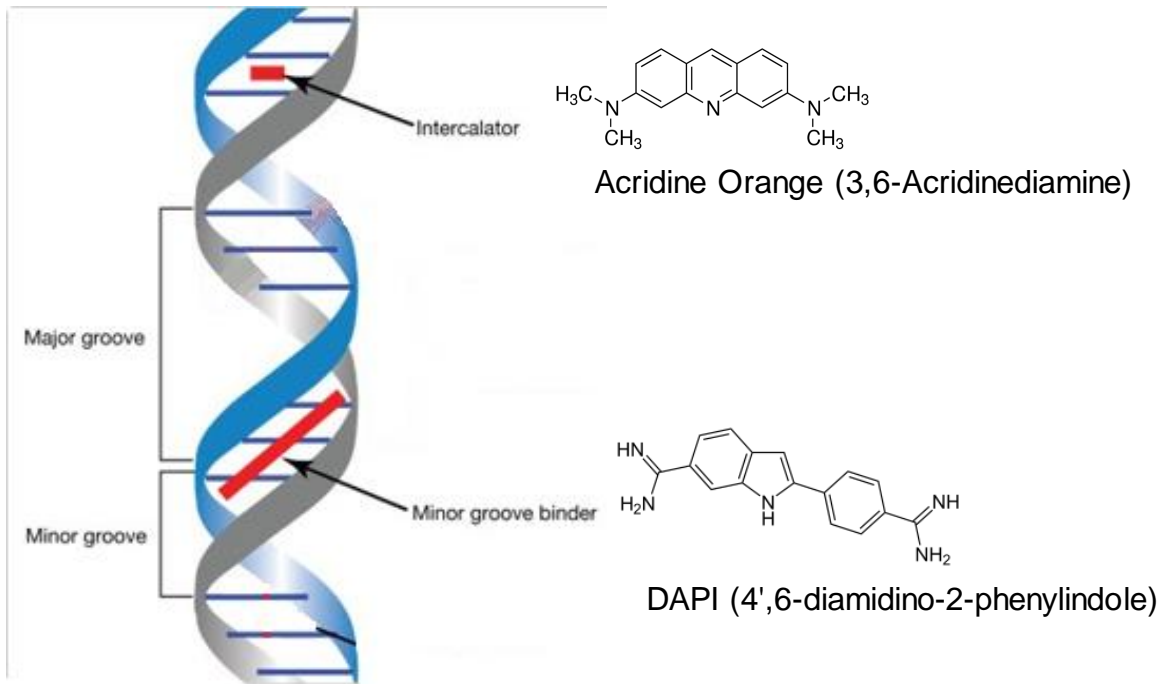
Tipos de tampões:

- a) TAE (Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-acetato-EDTA) < capacidade tamponante; migração + rápida
- b) TBE (Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-borato-EDTA) > capacidade tamponante; migração + lenta

Componentes

Corantes de ácidos nucleicos

Green Safe: acridine orange (intercalante) + DAPI (ligante do sulco menor)



O corante intercala-se no DNA durante a sua migração no gel, emitindo uma fluorescência verde após exposição a radiação ultravioleta (≈ 270 nm e ≈ 290 nm).

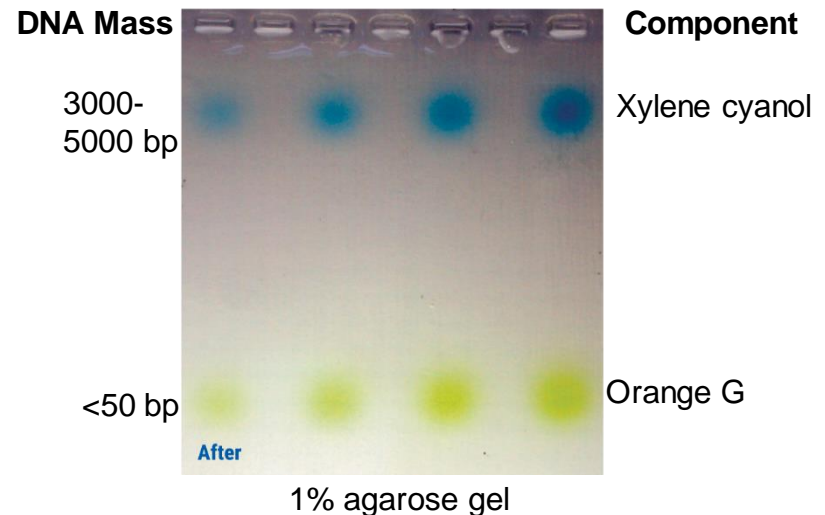


Componentes

Tampão de amostra (*loading buffer*):

O tampão de amostra contém sacarose ou glicerol para conferir à amostra uma densidade superior à do tampão de eletroforese – facilita a deposição da amostra no poço. Também contém um corante (ex. Orange G) para acompanhar a migração das amostras no gel, durante a eletroforese.

Nenhum destes componentes é intercalante, apenas permitem acompanhar a migração eletrofororética



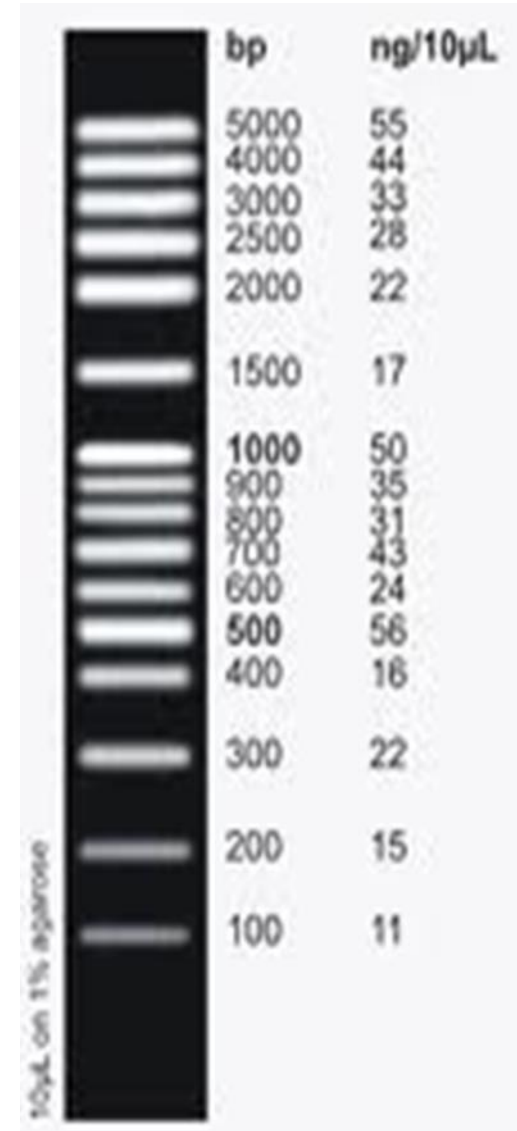
Componentes

Marcador de Massas Moleculares:

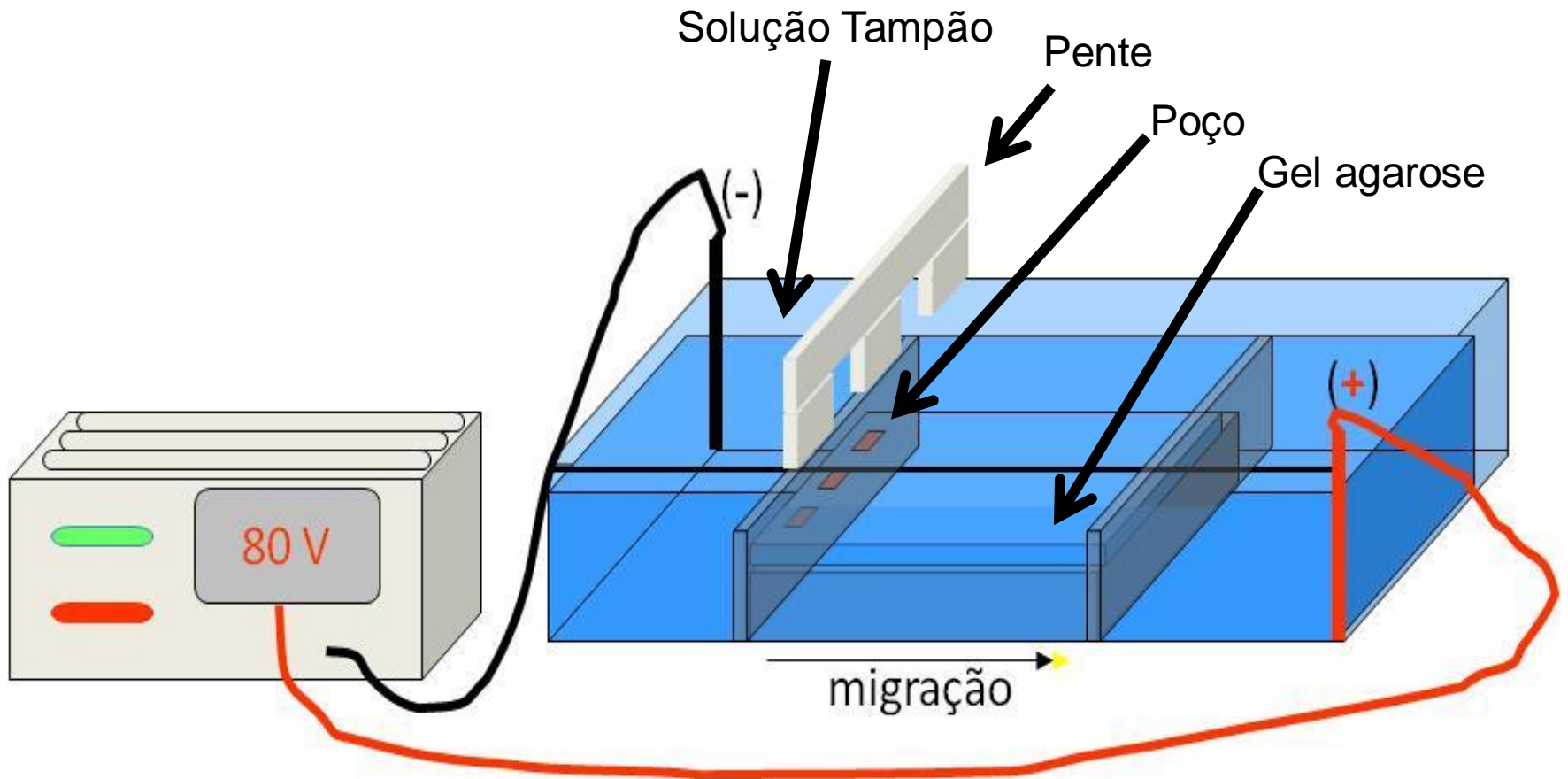
É necessário aplicar em um dos poços o marcador de massas moleculares (*ladder*) para proceder à estimativa visual da dimensão dos fragmentos de DNA

O *ladder* é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos (atualmente gerados por síntese *in vitro*).

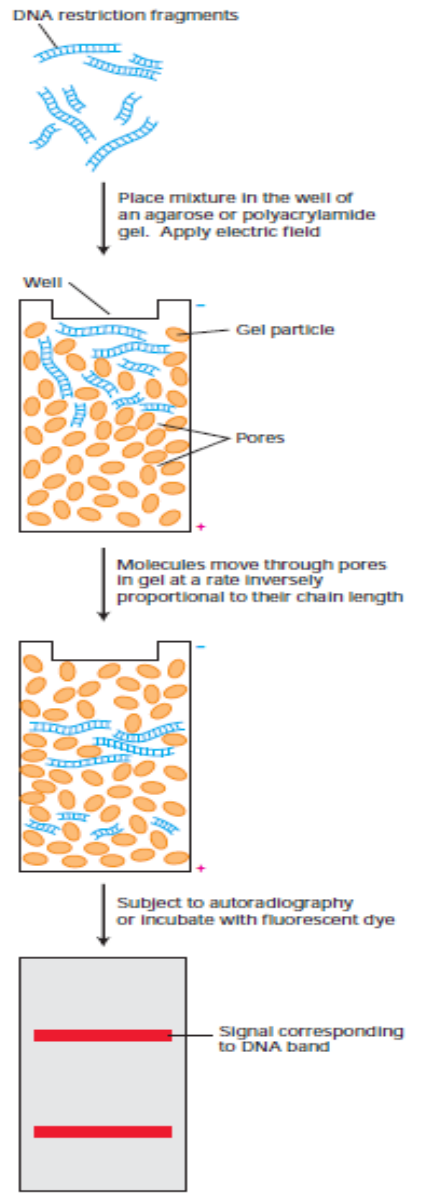
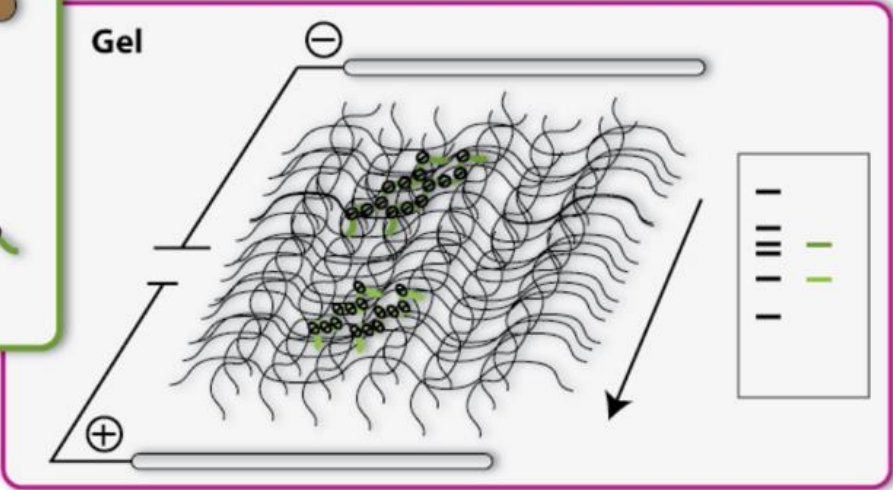
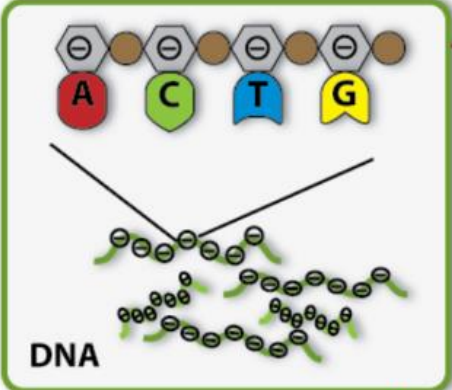
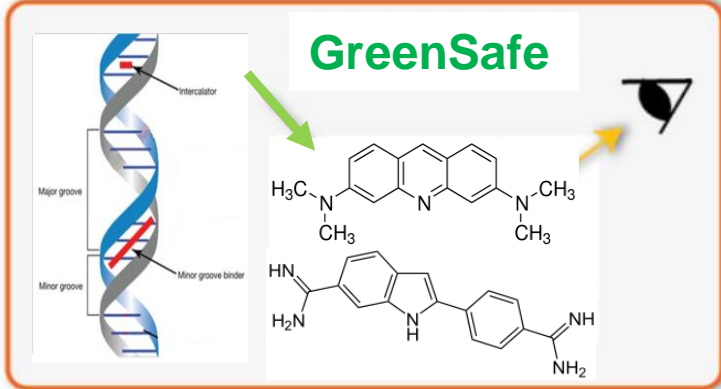
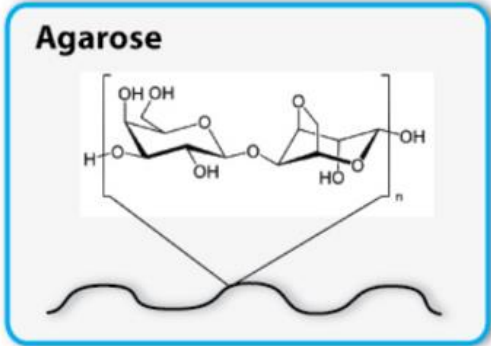
Permite inferir, por comparação, a dimensão dos fragmentos presentes nas amostras em análise.



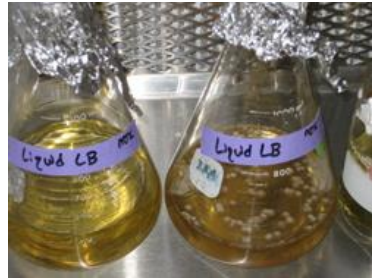
Montagem



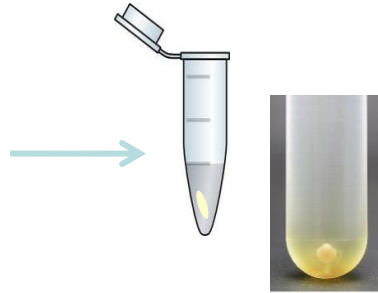
Resumo



Relembrar: Miniprep



Cultura bacteriana



Pellet bacteriano

Ressuspensão do *pellet*
(Solução I)
+
Incubação 10 min,
4 °C

Lise celular
(Solução II)
+
Incubação 5 min,
4 °C



5 min, 14000g



Recolher
sobrenadante e
adicionar etanol
absoluto frio



10 min, 14000g

Neutralização do DNA
(Solução III)
+
Incubação 5 min, 4 °C

Lavagem
do *pellet*
(etanol 70%)



5 min, 14000g

Secar
pellet
ao ar

Ressuspender
em ddH₂O

Congelar a
-20 °C

Relembrar: PCR e Digestão

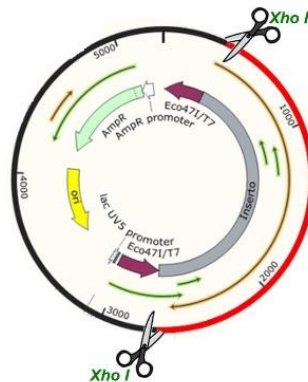
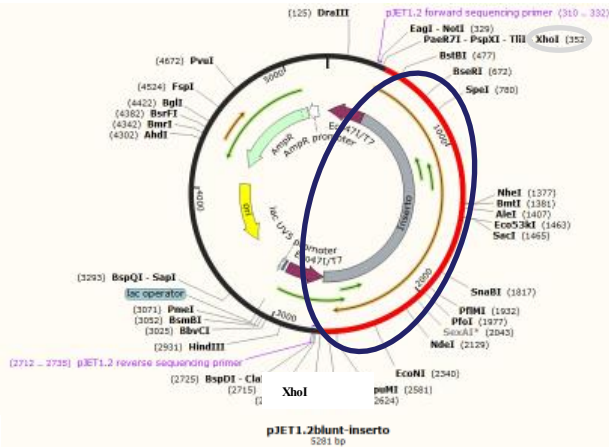
Amplificação o inserto de 2300 bp por PCR



- Tampão [10x]: 2 μ L
- $MgCl_2$ [25 mM]: 2 μ L
- Primer PjetFwd [5 pmol μ L⁻¹]: 2 μ L
- Primer PjetRev [5 pmol μ L⁻¹]: 2 μ L
- dNTP [5 mM]: 1 μ L
- DNA: 20-50 ng de DNA plasmídico
- Taq [1U μ L⁻¹]: 0,5 μ L
- ddH₂O: para perfazer 20 μ L

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

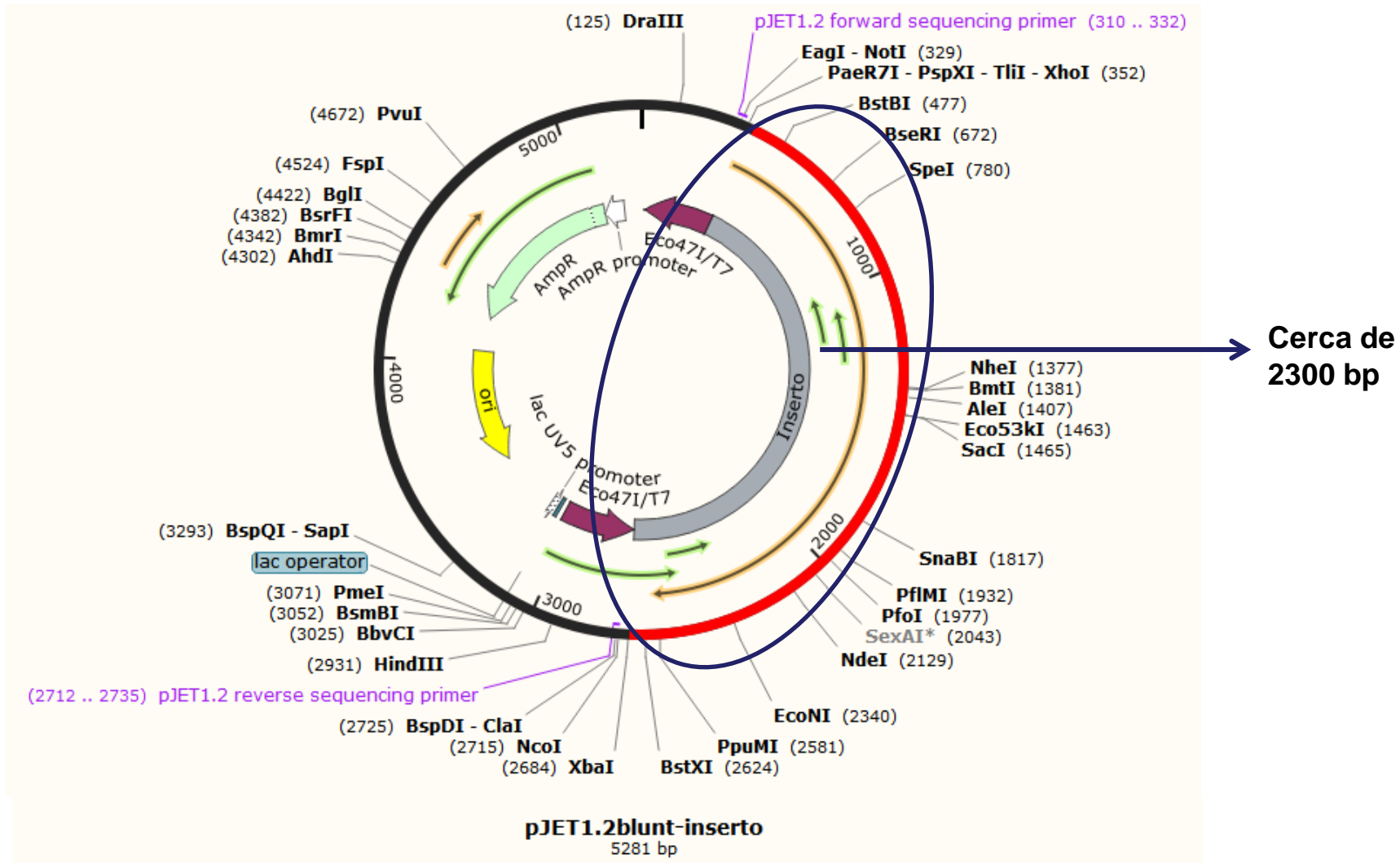


Digestão para isolamento do inserto de 2300 bp

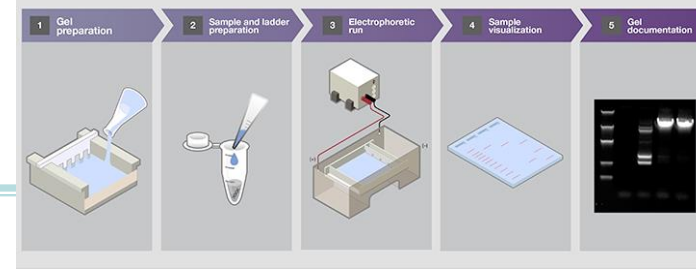
- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300: 2,5 μ L
- enzima *XhoI*: 1 μ L
- tampão de reação [10x]: 2,5 μ L
- ddH₂O até perfazer um volume total de 25 μ L

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

Inserto



Protocolo



1- Preparar um gel de agarose a 0,8 % em tampão de corrida (TBE 0,5x ou TAE 1x), num volume final de 50 mL.

2- Fundir a agarose no micro-ondas (cerca de 1 min; até completa fusão da agarose). Deixar arrefecer até conseguir agarrar no frasco com a mão. Adicionar 1 μL de GreenSafe.

3- Colocar de imediato no molde o pente de espessura e número de dentes adequados ao volume e número de amostras a analisar.

4 -Esperar que o gel solidifique.

5- Colocar o molde com o gel de agarose na tina de eletroforese. Adicionar tampão de corrida até cobrir a superfície do gel.

6- Preparar as amostras:

Produto de PCR: 10 μL + 2 μL tampão de amostra;

Digestão enzimática: 10 μL + 2 μL tampão de amostra;

DNA plasmídico: 10 μL + 2 μL tampão de amostra.

7- Aplicar as amostras nos poços.

8- Reservar o primeiro poço para o marcador molecular – 2,5 μL (já contém tampão de amostra);

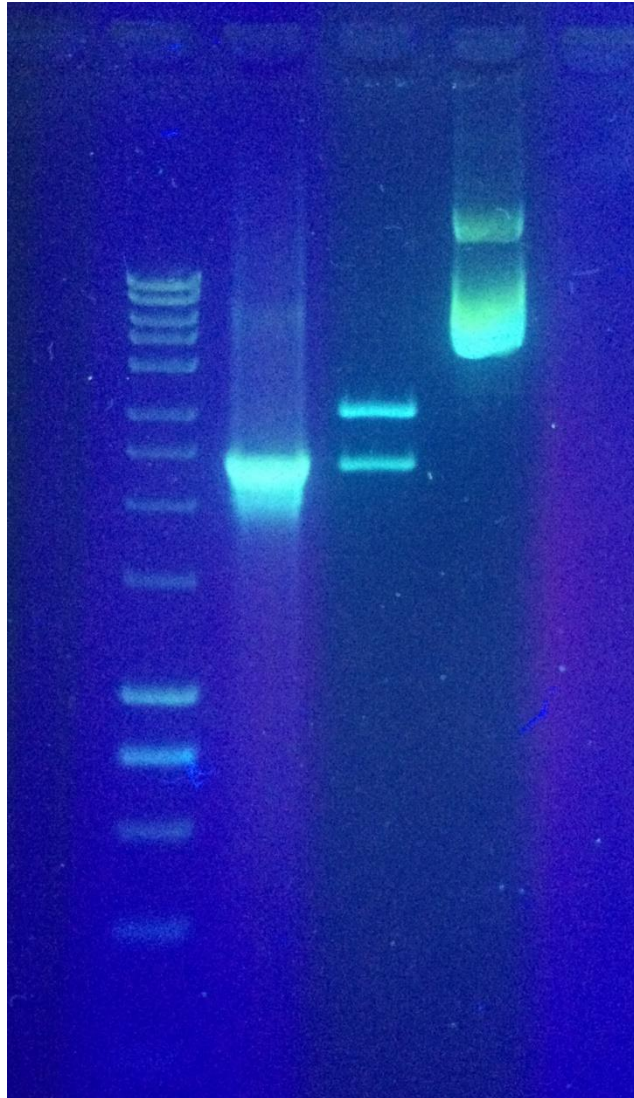
9- Ajustar a voltagem para 80 V.

10-Colocar o gel sobre o transiluminador e analisá-lo sob radiação ultravioleta.

11 - Fazer registo fotográfico e discutir os resultados obtidos.

Resultado

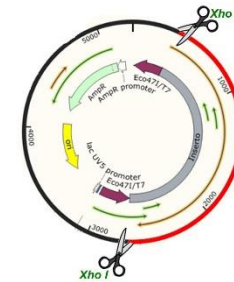
MM PCR Dig DNA plasmídico
2,5 µL 10 µL 10 µL 10 µL (500 ng)



MM – marcador de massas moleculares (DNA ladder)

PCR – amplificação do inserto a partir do pJET1.2 (2300 pb)

Dig - restrição de pJET1.2-inserto com a enzima de restrição *Xho*I



pJet 1.2 – 2 974 pb

Inserto – 2 300 pb

DNA plasmídico – plasmídio não digerido extraído por miniprep

