



**Ciências  
ULisboa**

Faculdade  
de Ciências  
da Universidade  
de Lisboa



**2023/24**

# **FUNDAMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR PRÁTICAS LABORATORIAIS**

Departamento de Biologia Vegetal  
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

## **Docentes:**

**Mónica Sebastiana  
Fernando Dias  
Susana Serrazina  
Susana Martins  
Rita Santos**

**mgsebastiana@fc.ul.pt  
fmdias@fc.ul.pt  
smserrazina@fc.ul.pt  
sgmartins@ciencias.ulisboa.pt  
absantos@fc.ul.pt**

# FUNDAMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

## PRÁTICAS LABORATORIAIS

**Avaliação:** Questões PL no exame final

**Frequência:** Obrigatório frequentar 2/3 das aulas PL

**Substituições:** Frequentar a PL em que se encontra inscrito. Em caso de falta por doença ou nos feriados possibilidade de compensar noutra hora, dentro do limite de vagas.

**Uso de bata:** Informar o docente de eventual falta.

**Protocolo:** Ler e levar impresso para a PL.

### TPs e PLs

2ªf, 10.00-13.00 [TP5 / PL 6 + PL 5]

3ªf, 16.00-19.00 [TP1 / PL 1 + PL 2]

4ªf, 9.00-12.00 [TP6 / PL 11 + PL 12]

4ªf, 17.00-20.00 [TP2 / PL 10 + PL 3]

5ªf, 10.30-13.30 [TP4 / PL 8 + PL 9]

6ªf, 14.00-17.00 [TP3 / PL 4 + PL 7]

**Docentes:** Mónica Sebastiana  
Fernando Dias  
Susana Serrazina  
Susana Martins  
Rita Santos

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

# Calendário PL

	Dias e turmas		Dias e docentes	
	4-8 Nov, 18-22 Nov e 2-6 Dez	11-15 Nov, 25-29 Nov, 9-13 Dez	4-8 Nov, 18-22 Nov e 2-6 Dez	11-15 Nov, 25-29 Nov, 9-13 Dez
<b>2ªf 10.00-13.00</b> (C2.2.05)	P6	P5	Rita Santos	Fernando Vaz Dias
<b>3ªf 16.00-19.00</b> (C2.2.05)	P2	P1	Susana Martins	Fernando Vaz Dias
<b>4ªf 9.00-12.00</b> (C2.2.05)	P12	P11	Mónica Sebastiana	Fernando Vaz Dias
<b>4ªf 17.00-20.00</b> (C2.4.39)	P10	P3	Mónica Sebastiana	Susana Serrazina
<b>5ªf 10.30-13.30</b> (C2.4.39)	P8	P9	Susana Martins	Susana Serrazina
<b>6ªf 14.00-17.00</b> (C2.2.05)	P4	P7	Mónica Sebastiana	Susana Serrazina

**PLs** – 3h por semana em que **cada turma** funciona de **15 em 15 dias**

Atenção/confusão

PL11 = PL1

PL111 = PL11

# Noções básicas – Práticas Laboratoriais

Dresscode: uso de bata obrigatório



Lab Rules, DO's & DONT's



Caderno de laboratório



# Noções básicas – Práticas Laboratoriais

---

## **Regras e *guidelines* para conduzir um trabalho experimental**

- Conhecer as regras do laboratório e as diferentes áreas de trabalho,
- Os estudantes não estão autorizados a tocar em nenhum equipamento do laboratório sem instrução prévia,
- Antes de iniciar um protocolo, retirem todas as dúvidas com o PROFESSOR,
- Se não souberem como utilizar um equipamento, PEÇAM AJUDA AO PROFESSOR!
- Não é permitido no laboratório o desenvolvimento de experiências não consideradas na temática da aula
- Não é permitido o desenvolvimento de experiências na ausência do professor

# Noções básicas – Práticas Laboratoriais

## Resíduos

### GRUPO III – Risco Biológico



Luvas

SACO DE COR **BRANCA** – COLOCAR OS SEGUINTE RESÍDUOS:

- Todos os resíduos provenientes de quartos ou enfermarias de doentes infecciosos ou suspeitos, de unidades de hemodiálise, de blocos operatórios, de salas de tratamento, de salas de autópsia e de anatomia patológica, de patologia clínica e de laboratórios de investigação, com excepção dos referidos no GRUPO IV;
- Todo o material usado em diálise;
- Peças anatómicas não identificáveis;
- Sistemas utilizados na administração de soros e medicamentos (excepto os do GRUPO IV);
- Sacos colectores de fluidos orgânicos e respectivos sistemas;
- Fraldas e guardos descartáveis, talas, gessos e ligaduras gessadas contaminados ou com vestígios de sangue;
- Material de protecção individual utilizado em cuidados de saúde e de serviços de apoio geral em que haja contacto com produtos contaminados;
- Resíduos que resultam da administração de sangue e derivados.

### GRUPO IV – Risco Específico



SACO DE COR **VERMELHA** – COLOCAR OS SEGUINTE RESÍDUOS:

- Peças anatómicas identificáveis;
- Cadáveres de animais de experiência laboratorial;
- Materiais cortantes e perfurantes (devidamente acondicionados);
- Produtos químicos e fármacos rejeitados;
- Citostáticos e todo o material usado na sua manipulação e administração.

# Noções básicas de laboratório

## Práticas laboratoriais de FBM - equipamento

### Micropipetas :



Escolher pipeta segundo o volume

P10

P200 (50/100)

P1000

Escolher pontas:

Branca

Amarela

Azul

Pipetar:

1: Pressionar embolo (1<sup>o</sup> stop)

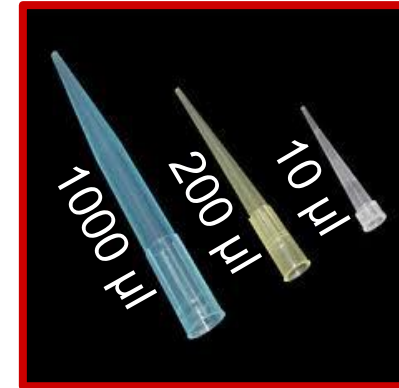
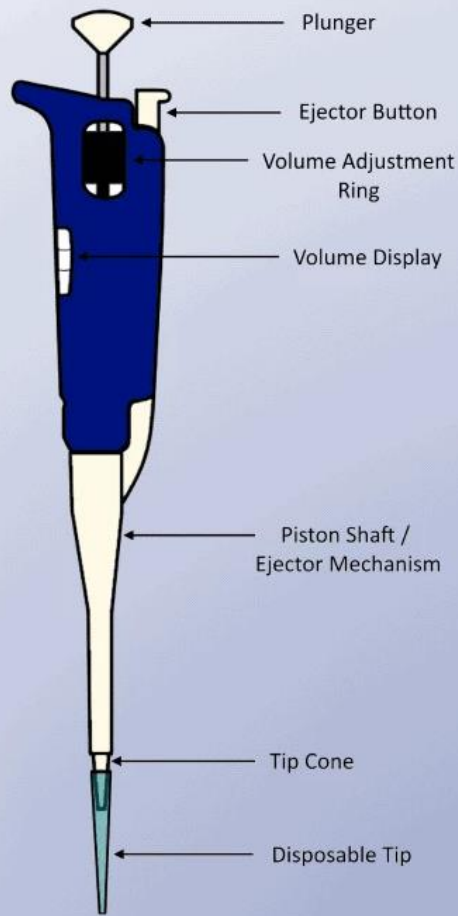
2: Aspirar

3. Verter (2<sup>a</sup> stop)

# Noções básicas de laboratório

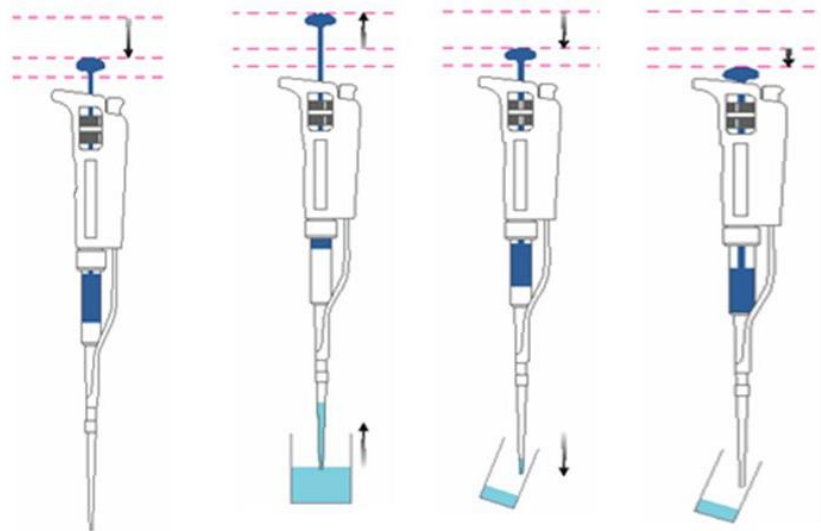
## Práticas laboratoriais de FBM - equipamento

### Knowing Your Micropipette



### 1/ Preparation 2/ Aspiration 3/ Distribution 4/ Purge

Rest position  
First stop  
Second stop or purge





# Noções básicas de laboratório

## Práticas laboratoriais de FBM - equipamentos

Centrifuga :



Nanodrop:



PCR:

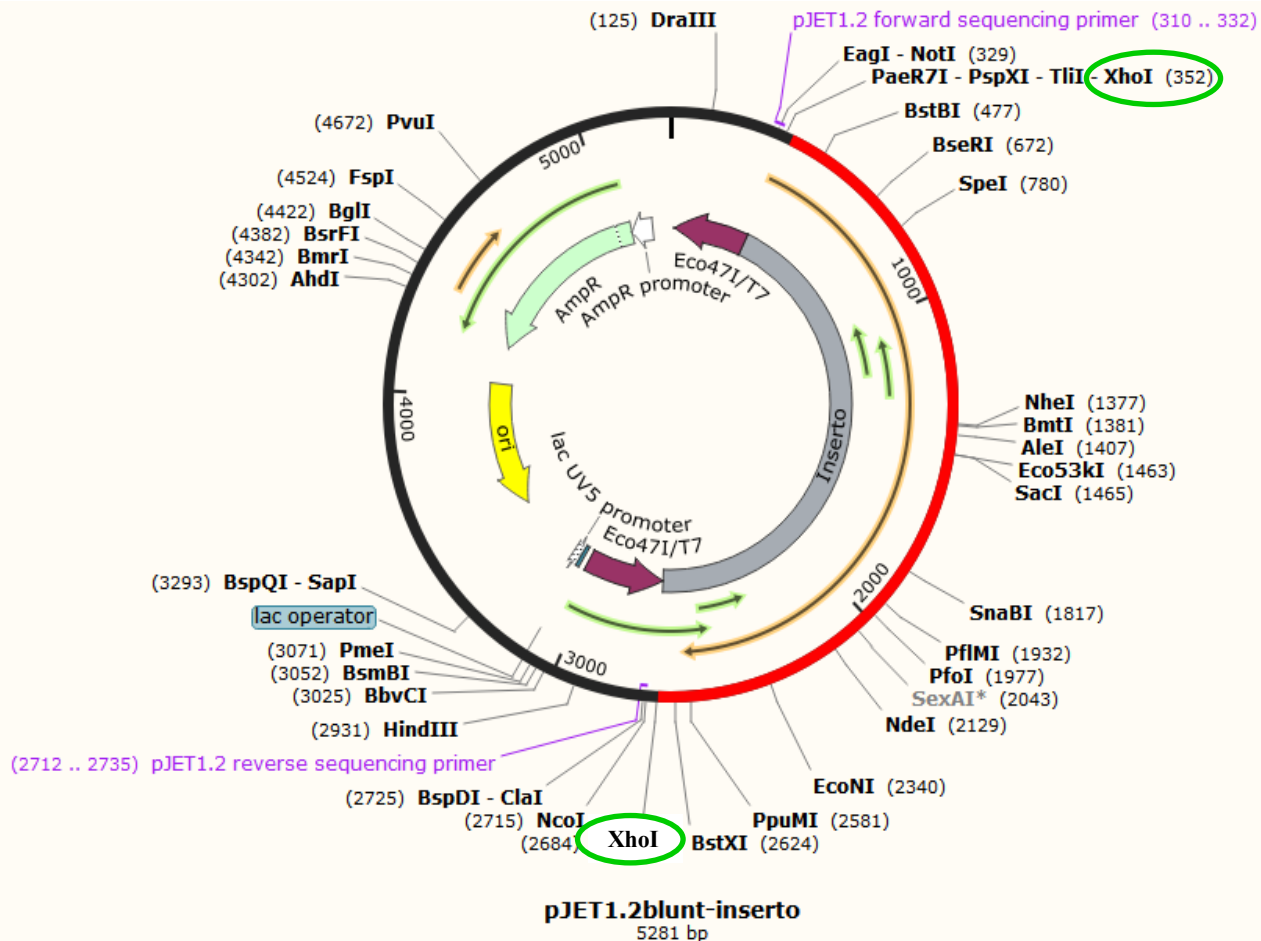


**Verificar as instruções do aparelhos**

**Centrifuga: Equilibrar sempre os pesos!**

# Material biológico – protocolo 1 (DNA plasmídico)

**Plasmídio:** Molécula de DNA circular, presente em bactérias, confere vantagem adaptativa, número de cópias variável



Vetor de clonagem, elevado número de cópias

**pJET 1.2 + inserto 2300 bp**

Replicado em *E. coli* DH5 $\alpha$

# Extração de DNA plasmídico em pequena escala (Miniprep)

**Extração de DNA plasmídico** - extração por lise alcalina (baseado no método de Birnboim & Doly, 1979).

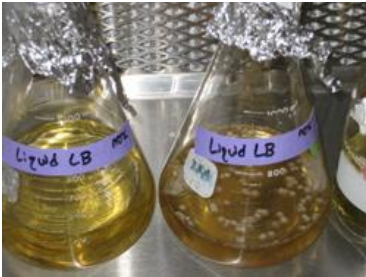
Este método pode ser realizado em diferentes escalas consoante o volume da cultura bacteriana: pequena escala (3 ml – 5 ml, *miniprep*), escala média (até 100 ml); e grande escala (até 500 ml).

***Miniprep*** – método rápido e permite isolar DNA plasmídico de muitas amostras em simultâneo, e em quantidade suficiente para diferentes (ex. clonagem, análise de restrição, sequenciação de clones e transcrição *in vitro*).

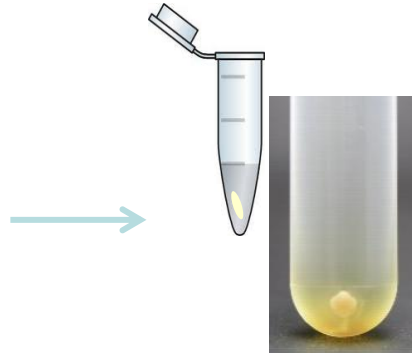
**Este método baseia-se na desnaturação alcalina do DNA e inclui as seguintes etapas:**

- *Lise das células bacterianas,*
- *Desnaturação/renaturação diferencial de DNA plasmídico e DNA genómico,*
- *Precipitação alcoólica do DNA plasmídico.*

# 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

**CUIDADO, não**  
ultrapassar 5 min

## Lise: Solução II

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

**SDS:** detergente (solubiliza  
membrana, desnatura  
proteínas)

5 min, gelo



10 min, 14000g

Recolher  
sobrenadante para  
novo tubo e  
adicionar etanol  
absoluto frio



5 min, 14000g

Lavar o pellet com  
etanol 70 %

# Miniprep



10 min, 14000g

Recolher sobrenadante para novo tubo e adicionar etanol absoluto frio



5 min, 14000g

Lavar o *pellet* com etanol 70 %



5 min, 14000g

Ressuspender em ddH<sub>2</sub>O

Descartar o sobrenadante e secar o *pellet* ao ar



Etiquetar (Turma/data)

Congelar a -20 °C

**Nota: precipitação e lavagem:**

**Etanol absoluto:** precipita DNA plasmídico; **Etanol 70%:** lavagem

# Protocolo

- A partir do pellet congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (o pellet foi obtido a partir de uma centrifugação de 1 min a 14000g) de 1,5 mL de cultura bacteriana transformada com o plasmídeo Pjet1.2 com o inserto sp com cerca de 2300 pares de bases (sp2300).
- Ressuspender o pellet em 100  $\mu\text{L}$  de solução I (50 mM glucose, 25 mM TrisHCl, pH 8 e 10 mM EDTA).
- Incubar 10 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ .
- Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solução II (0.2 M NaOH, 1 % SDS), mexer por inversão até a suspensão clarificar totalmente.
- Incubar 5 min em gelo (Nota: não deixar ultrapassar os 5 min)
- Adicionar 150  $\mu\text{L}$  de solução III (3 M NaAc, pH 4,8), mexendo por inversão. Incubar 5 min em gelo.
- Centrifugar 10 min, a 14000 g.
- Recolher o sobrenadante para um eppendorf contendo 1 mL de etanol absoluto frio, mexer por inversão e deixar precipitar.
- Centrifugar 5 min a 14000 g. **Remover o sobrenadante.**
- Lavar o pellet com EtOH a 70% e centrifugar como anteriormente. Remover o sobrenadante e secar o pellet ao ar.
- Ressuspender o pellet em 20  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O e conservar, devidamente etiquetado (turma/data), a  $-20^{\circ}\text{C}$ .