



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:

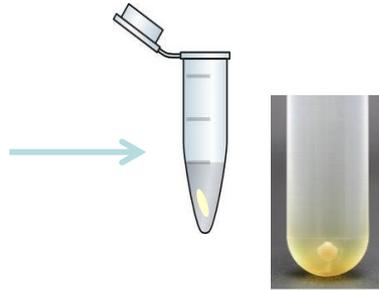
Mónica Sebastiana
Fernando Dias
Susana Serrazina
Susana Martins
Rita Santos

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

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

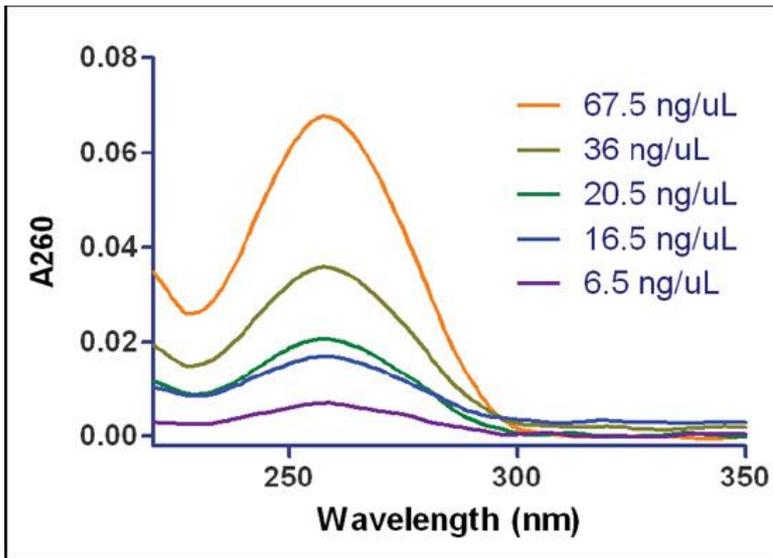
Congelar a
-20 °C

Quantificação DNA plasmídico

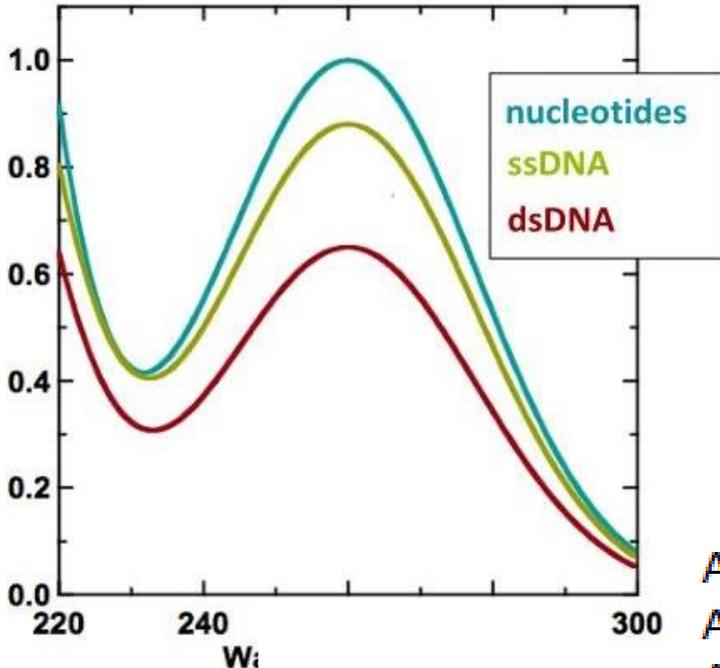


Nanodrop: aparelho que utiliza o princípio da espectrofotometria mas necessita apenas de um pequeno volume de amostra (1-2 μ l)

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

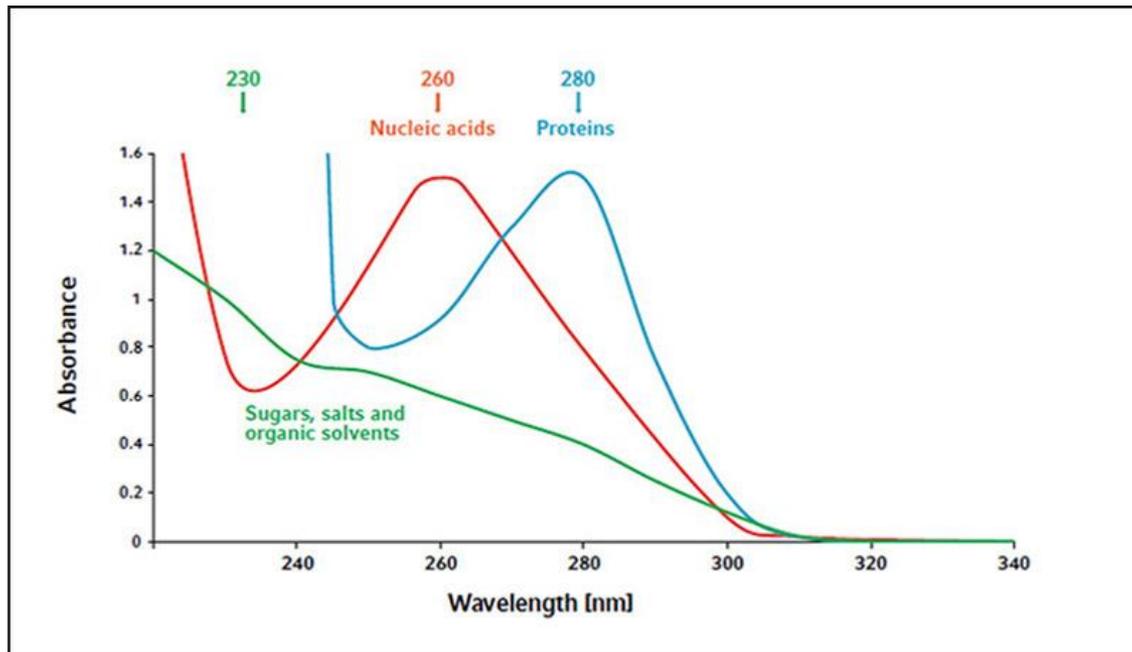
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 33 \mu\text{g/ml ssDNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 40 \mu\text{g/ml ssRNA}$
$A_{260} = 1$ unidade	$\Rightarrow 20 - 30 \mu\text{g/ml oligonucleotido}$

Cálculo das concentrações de DNA e RNA:

- $[\text{DNA } \mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$
- $[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$

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 absorvância.



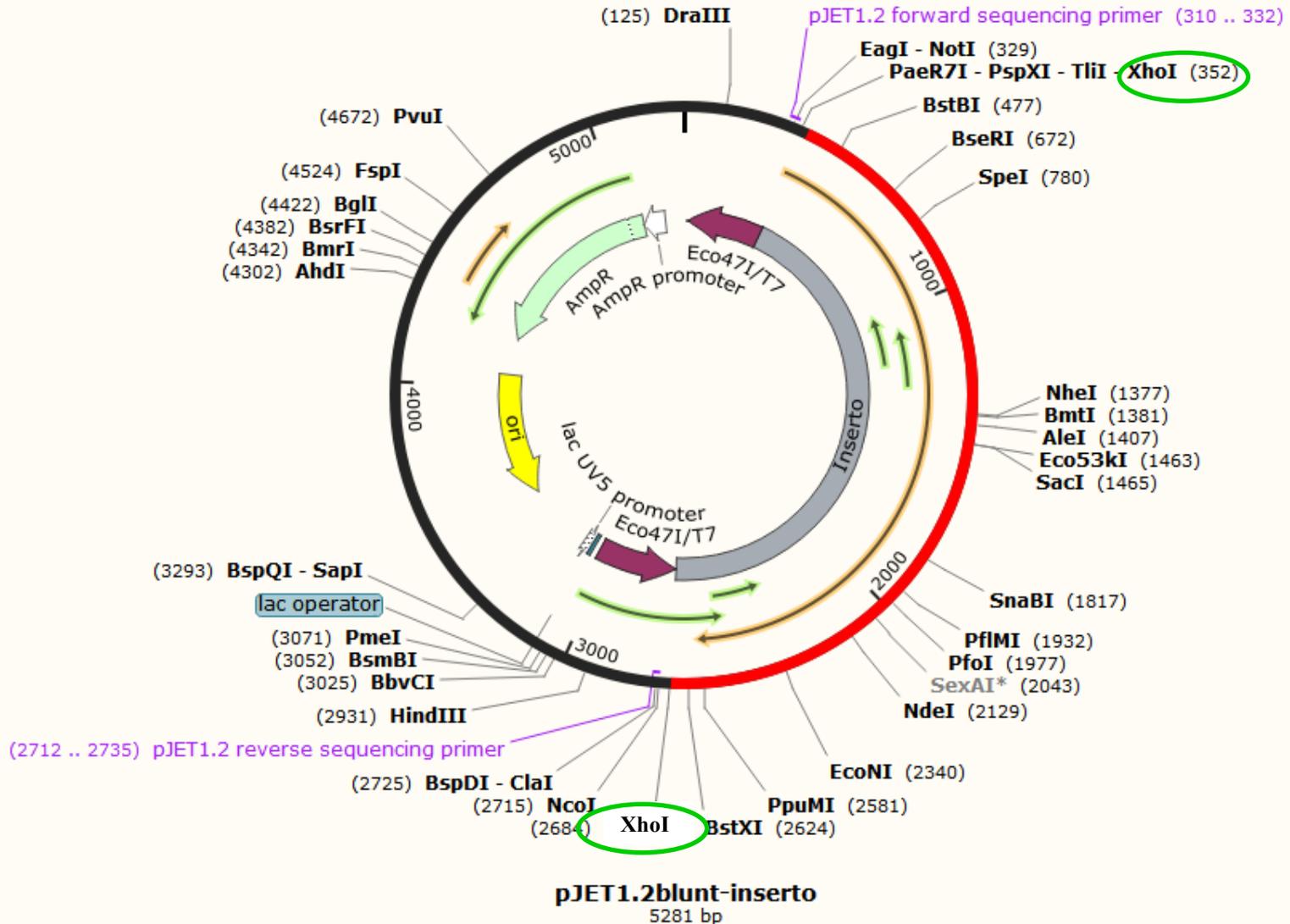
Importante: cálculo das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

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

Plasmídio

pJET 1.2 + inserto 2300 bp



Abordagem experimental

Amplificação do inserto de 2300 bp por PCR

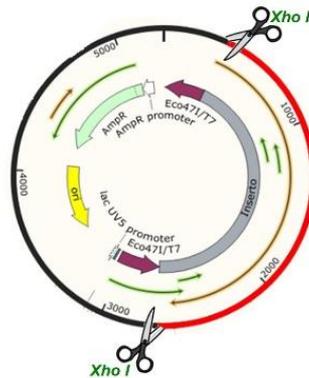
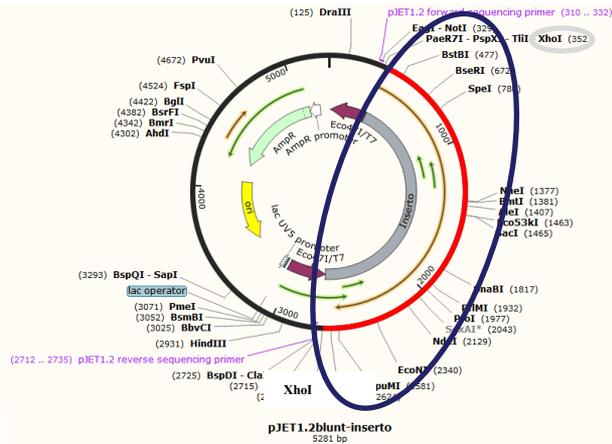


- Tampão [10x]: 2 µl
- MgCl₂ [25 mM]: 2 µl
- Primer PjetFwd [5 pmol µl⁻¹]: 2 µL
- Primer PjetRev [5 pmol µl⁻¹]: 2 µL
- dNTP [5 mM]: 2 µl
- DNA: 20-50 ng de DNA plasmídico
- Taq [1U µL⁻¹]: 1 µl
- ddH₂O: para perfazer 20 µl



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

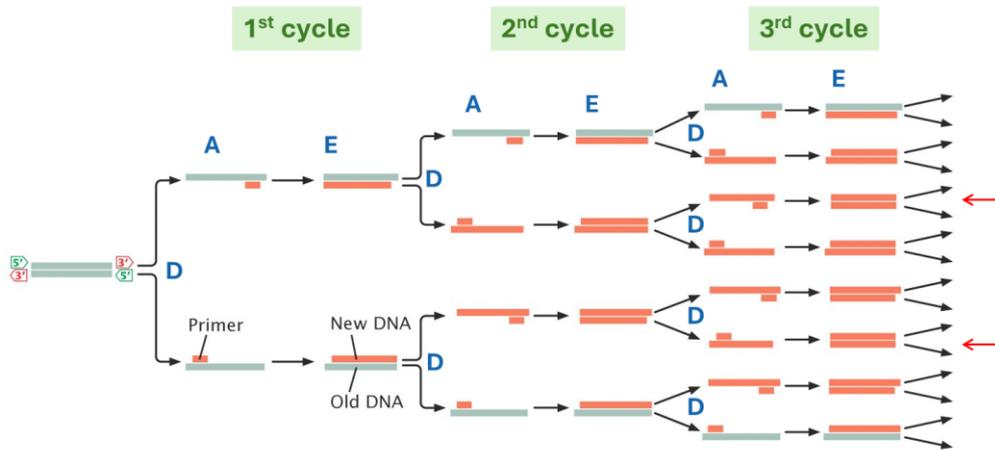
- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300
- enzima *XhoI*: 1µl
- tampão de reação [10x]: 2,5 µl
- ddH₂O até perfazer um volume total de 25µl

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



In each cycle:
D- denaturation
A- annealing
E- extension

$$2^1 = 2$$

$$2^2 = 4$$

$$2^3 = 8$$

No. of copies/each initial molecule = 2^n
n, no. of cycles

http://openwetware.org/wiki/BME100_f2013:W900_Group17_L4

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 ; Mg^{2+})

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.

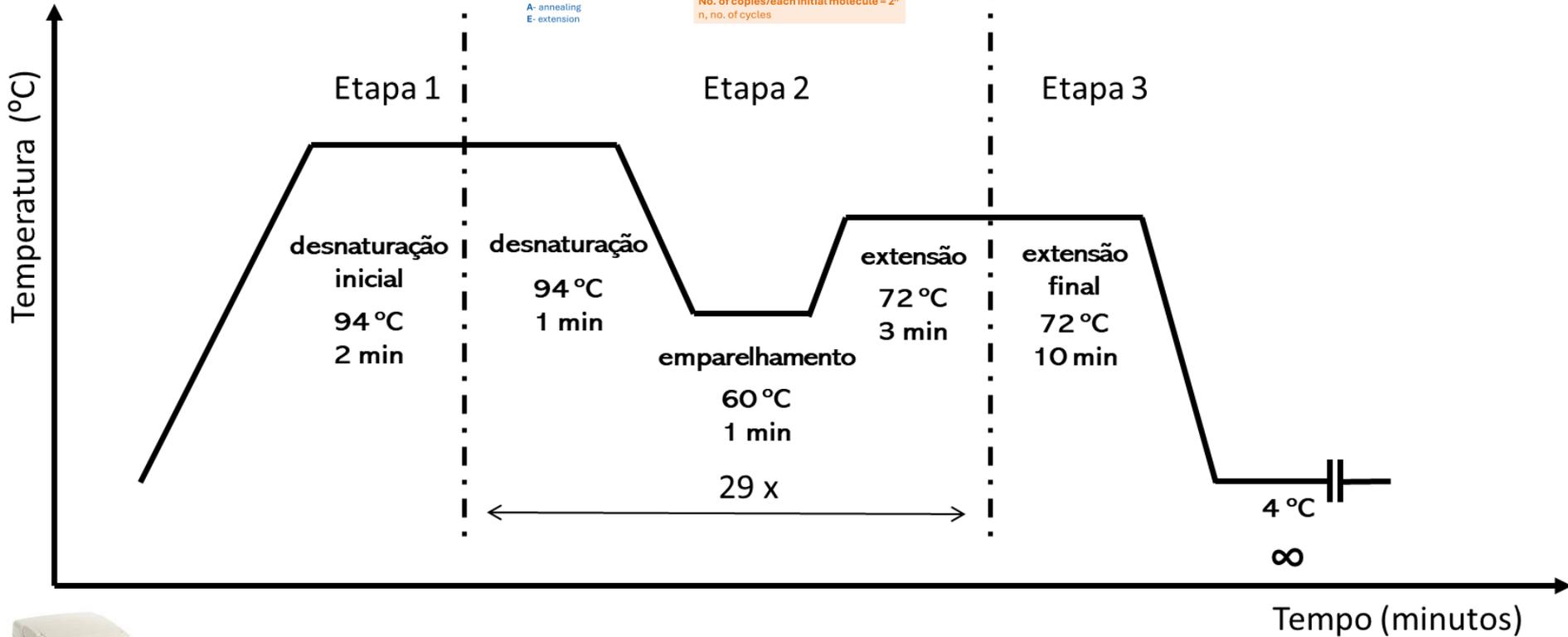
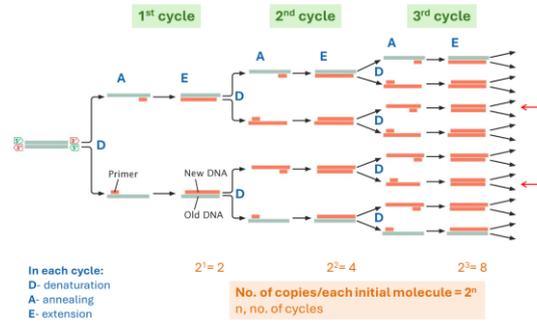
PCR

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: 20-50 ng de DNA plasmídico (Pjet1.2sp2300, concentração inicial 50 ng. μl^{-1})
- *Taq* [1U μL^{-1}] : 1 μl
- ddH₂O: para perfazer 20 μl

PCR

Programa:



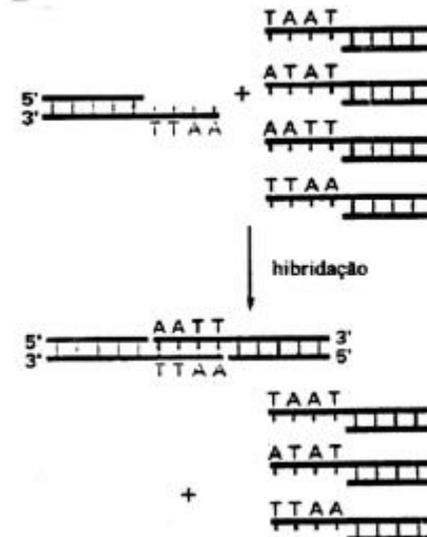
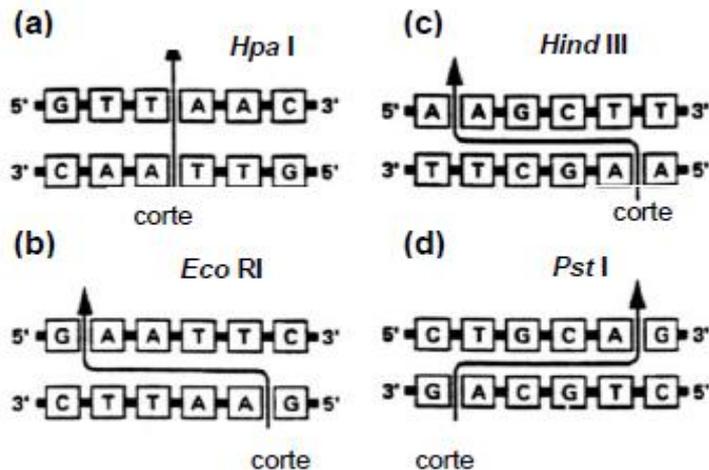
Congelar a -20°C até utilização

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.

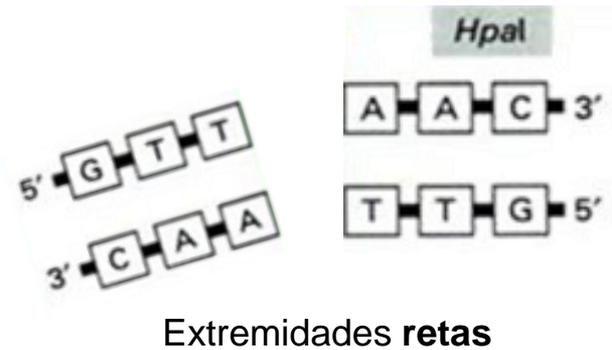
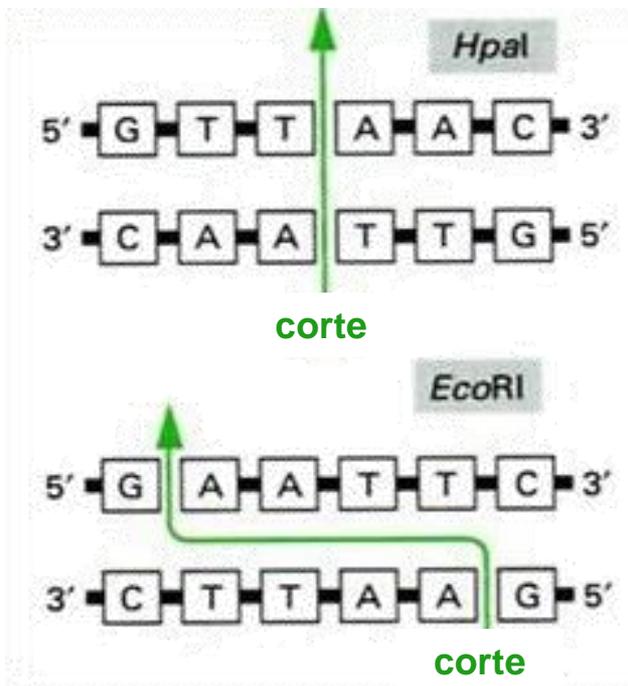
Por outro lado existem enzimas com elevada especificidade – ex. **enzimas de restrição**

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**.



Digestão

No laboratório.....

Tampão: Concentração salina; catiões

(Na⁺, K⁺); 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)

Enzima	Sequência de reconhecimento	Tampão	Temperatura
<i>BamH</i> I	5' G↓GATCC 3' 3' CCTAG↑G 5'	K	30 °C
<i>Bgl</i> II	5' A↓GATCT 3' 3' TCTAG↑A 5'	H	37 °C
<i>Cla</i> I	5' AT↓CGAT 3' 3' TAGC↑TA 5'	M	30 °C
<i>Eco</i> RI	5' G↓AATTC 3' 3' CTTAA↑G 5'	H	37 °C
<i>Eco</i> RV †	5' GAT↓ATC 3' 3' CTA↑TAG 5'	H	37 °C
<i>Hind</i> III	5' A↓AGCTT 3' 3' TTCGA↑A 5'	M	37 °C
<i>Kpn</i> I	5' GGTAC↓C 3' 3' C↑CATGG 5'	L	37 °C
<i>Nde</i> I	5' CA↓TATG 3' 3' GTAT↓AC 5'	H	37 °C
<i>Nhe</i> I	5' G↓CTAGC 3' 3' CGATC↑G 5'	M	37 °C
<i>Pst</i> I	5' CTGCA↓G 3' 3' G↑ACGTC 5'	H	37 °C
<i>Sal</i> I	5' G↓TCGAC 3' 3' CAGCT↑G 5'	H	37 °C
<i>Sma</i> I †	5' CCC↓GGG 3' 3' GGG↑CCC 5'	T	37 °C
<i>Xho</i> I	5' C↓TCGAG 3' 3'GAGCTC↓C 5'	H	37 °C

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: 5 μl se C=50 ng/μl (**calcular!**)
- 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.