



**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:**

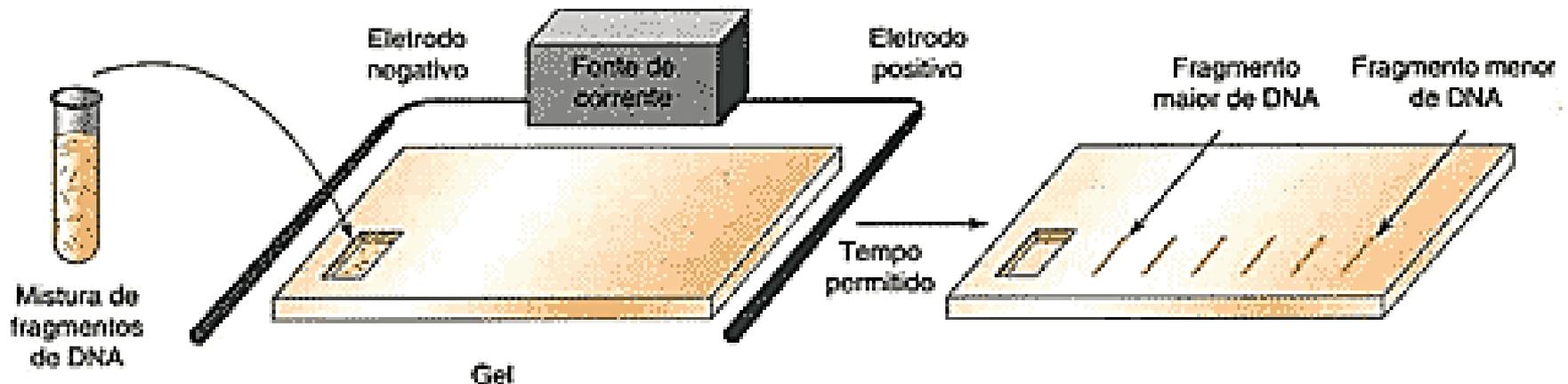
**Mónica Sebastiana  
Fernando Dias  
Susana Serrazina  
Susana Martins  
Rita Santos**

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

# 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.”

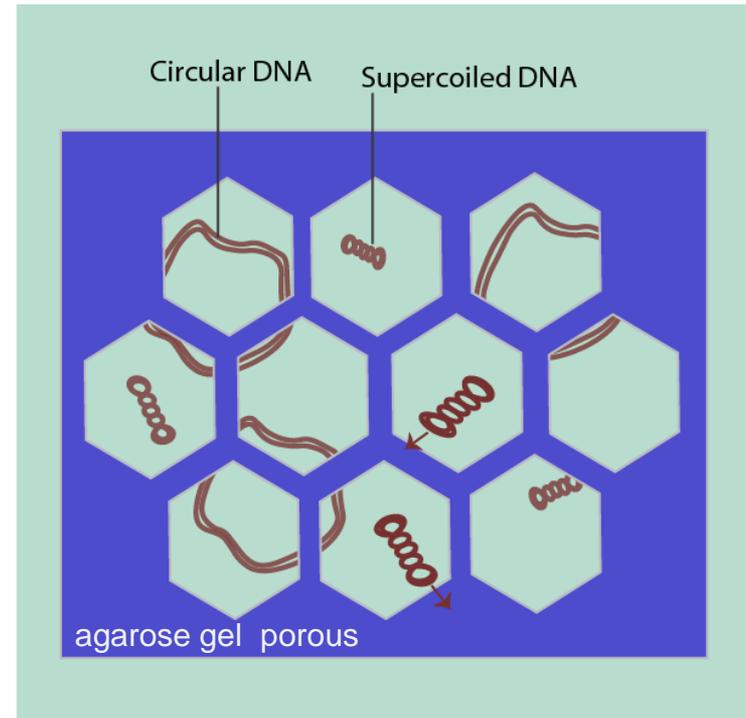
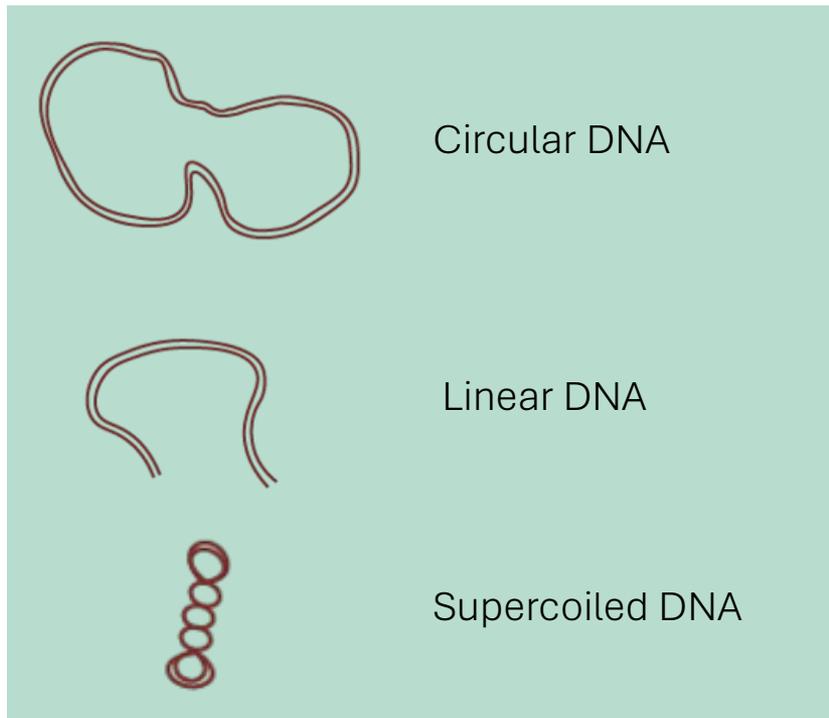


# Eletoforese em gel de agarose

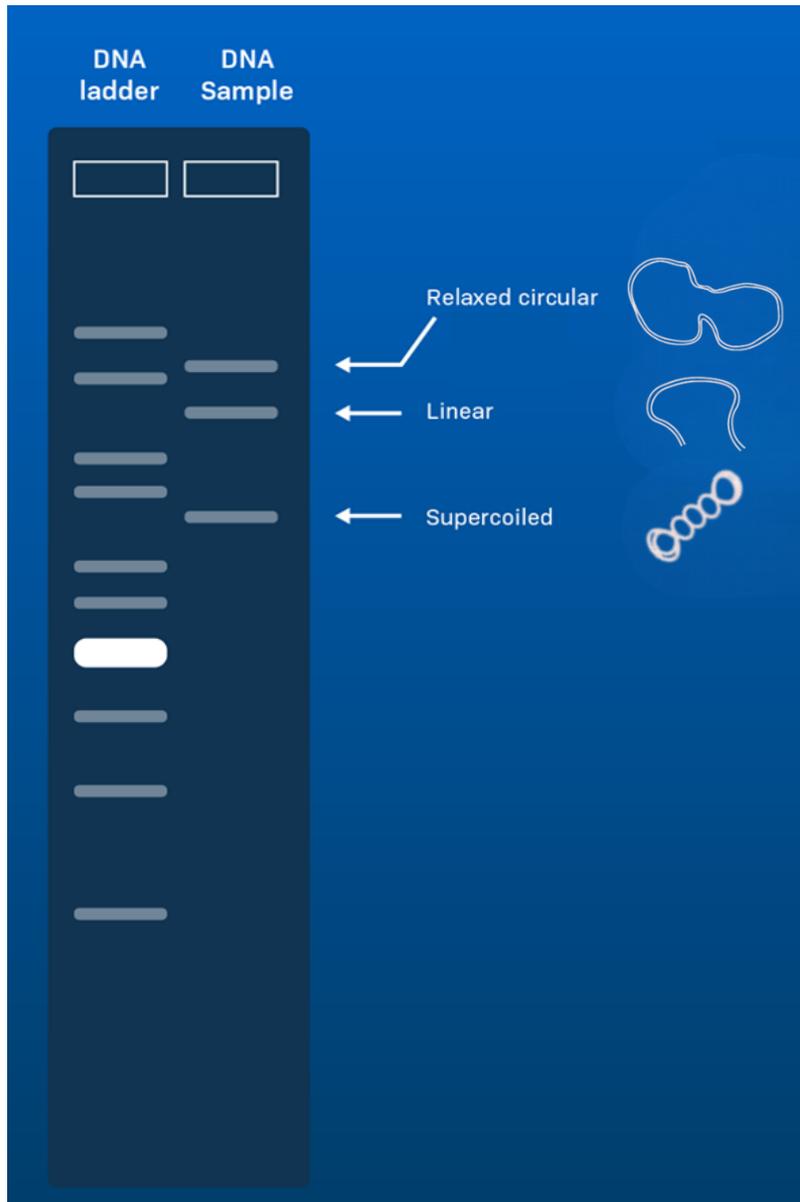
Técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas numa matriz semi-sólida durante a aplicação de uma diferença de potencial.

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.



# Eletróforese em gel de agarose



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

Moléculas de DNA circulares, migram mais lentamente que as moléculas lineares ou superenroladas de mesmo peso molecular.

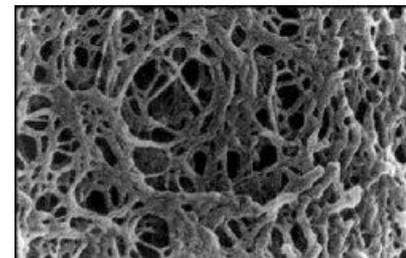


# Componentes

“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

**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. “*

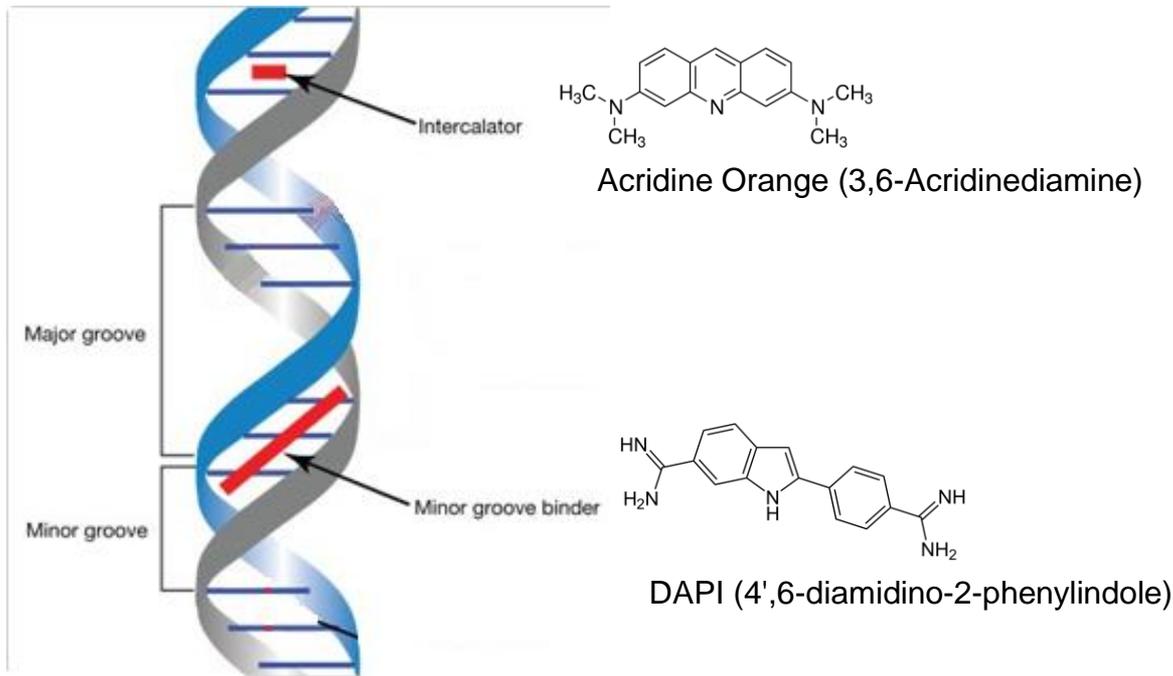
Tipos de tampões:

- 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

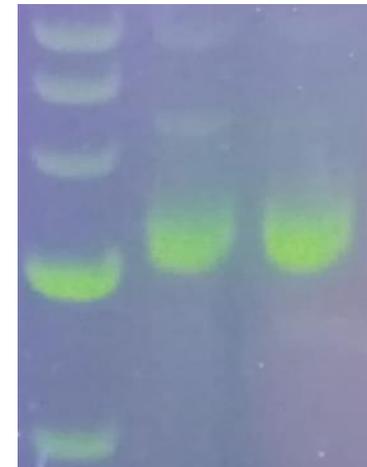
# Componentes

## 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 ( $\approx 270$  nm e  $\approx 290$  nm).

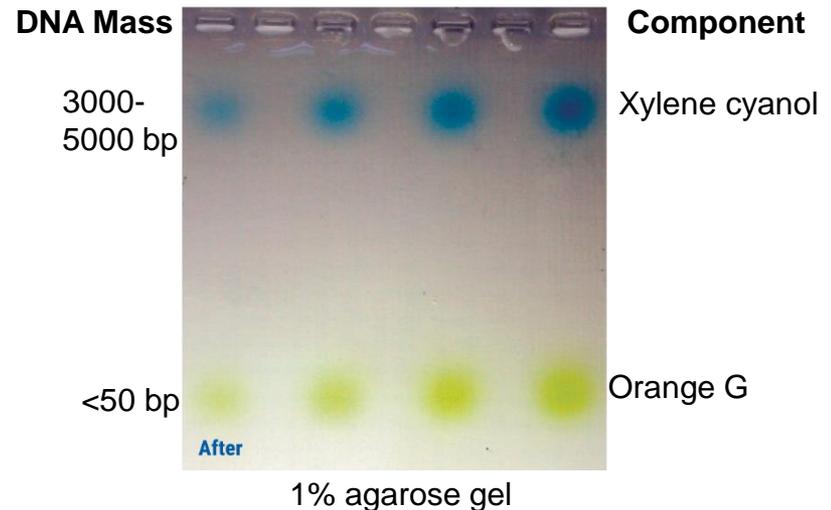


# Componentes

## 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**



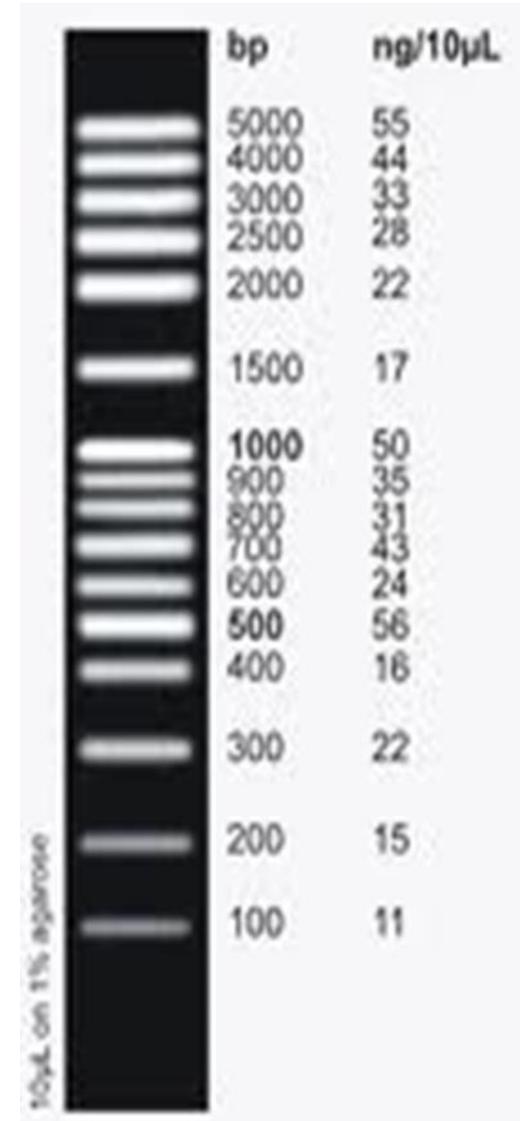
# Componentes

## Marcador de Massas Moleculares:

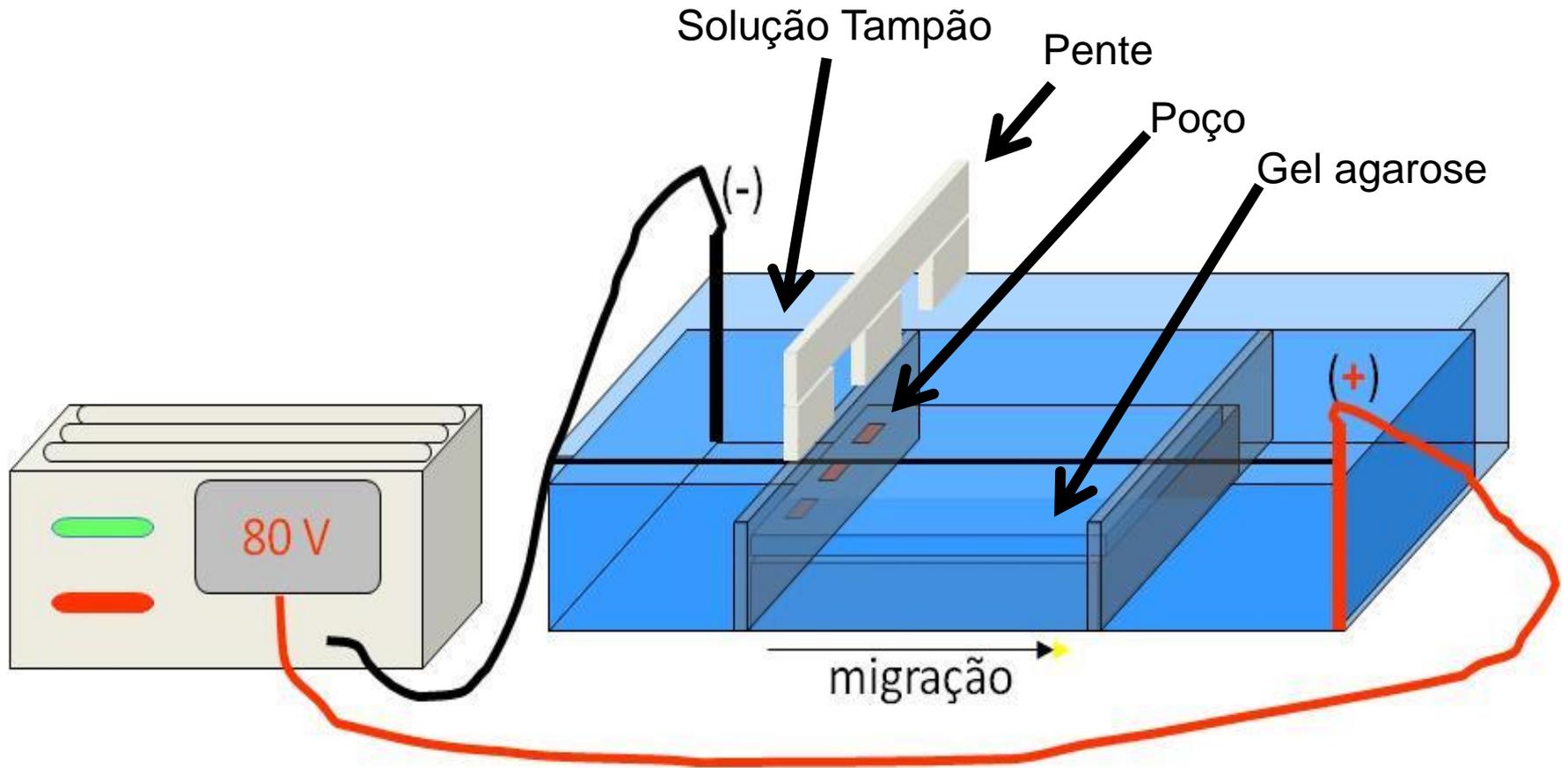
É necessário aplicar em um dos poços o marcador de massas moleculares (*ladder*) para proceder à estimativa visual da dimensão dos fragmentos de DNA

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.

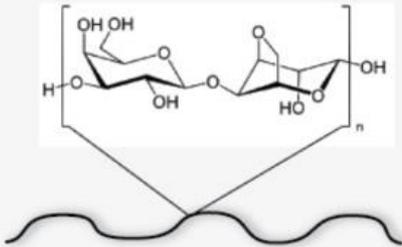


# Montagem

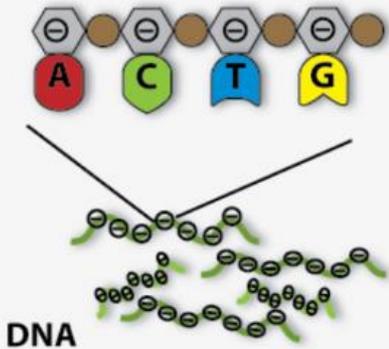
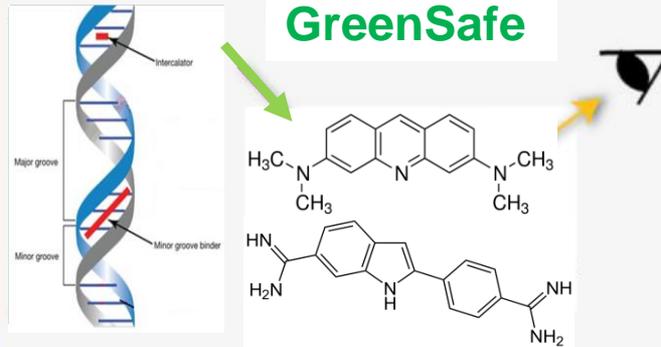


# Resumo

## Agarose

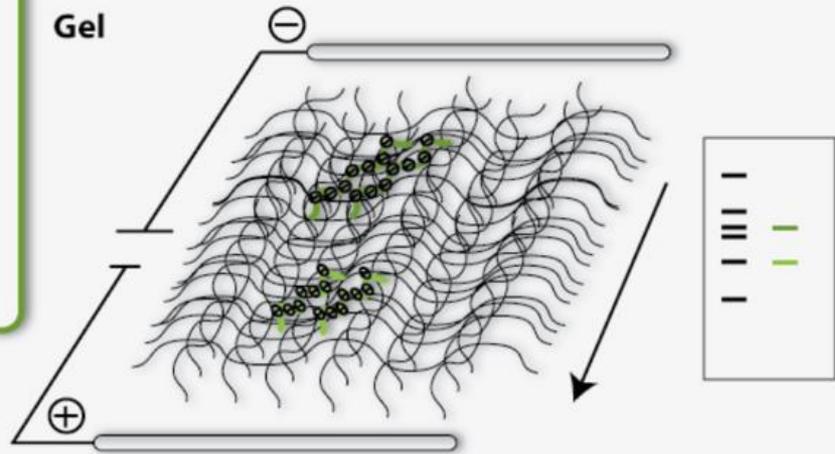


## GreenSafe

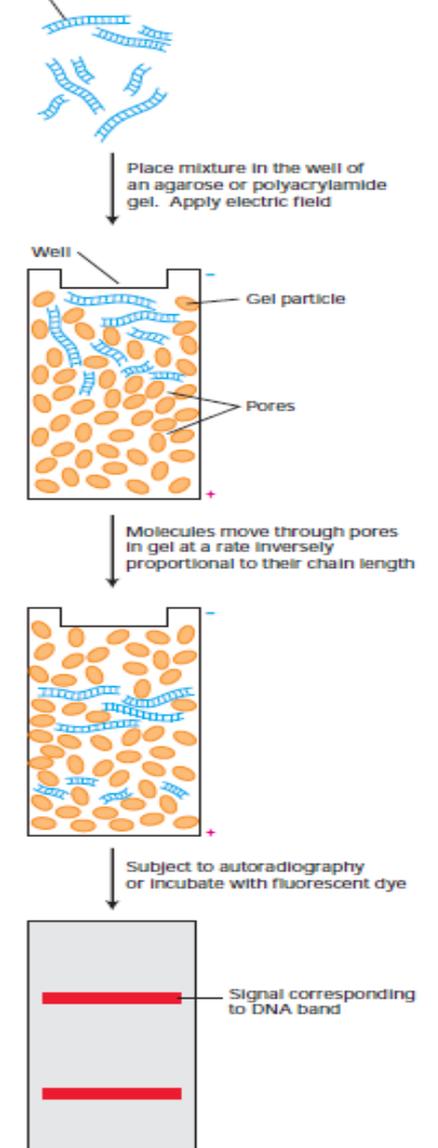


## Agarose Gel-Electrophoresis

## Gel



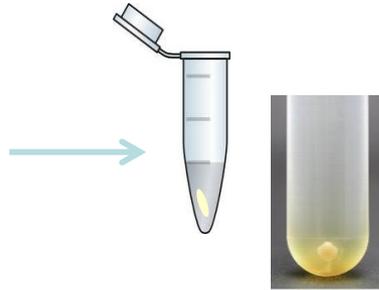
## DNA restriction fragments



# 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

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



5 min, 14000g



Recolher  
sobrenadante e  
adicionar etanol  
absoluto frio



10 min, 14000g

Lavagem  
do *pellet*  
(etanol 70%)



5 min, 14000g

Secar  
*pellet* ao ar

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

Congelar a  
-20 °C

# Relembrar: PCR e Digestão

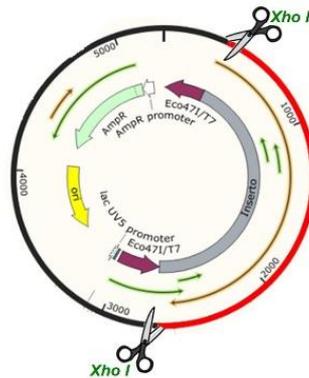
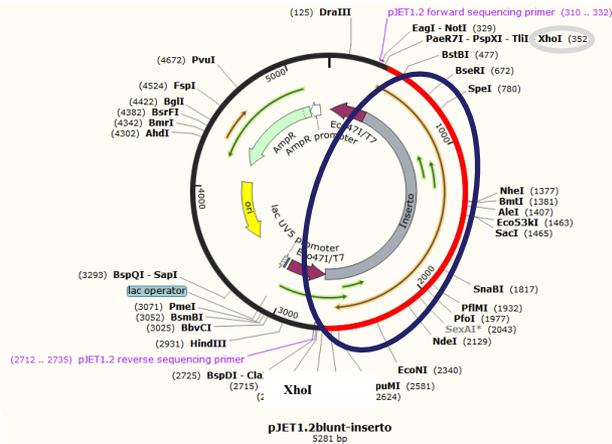
## Amplificação o inserto de 2300 bp por PCR



- Tampão [10x]: 2 µL
- MgCl<sub>2</sub> [25 mM]: 2 µL
- Primer PjetFwd [5 pmol µL<sup>-1</sup>]: 2 µL
- Primer PjetRev [5 pmol µL<sup>-1</sup>]: 2 µL
- dNTP [5 mM]: 1 µL
- DNA: 20-50 ng de DNA plasmídico
- Taq [1U µL<sup>-1</sup>]: 0,5 µL
- ddH<sub>2</sub>O: 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



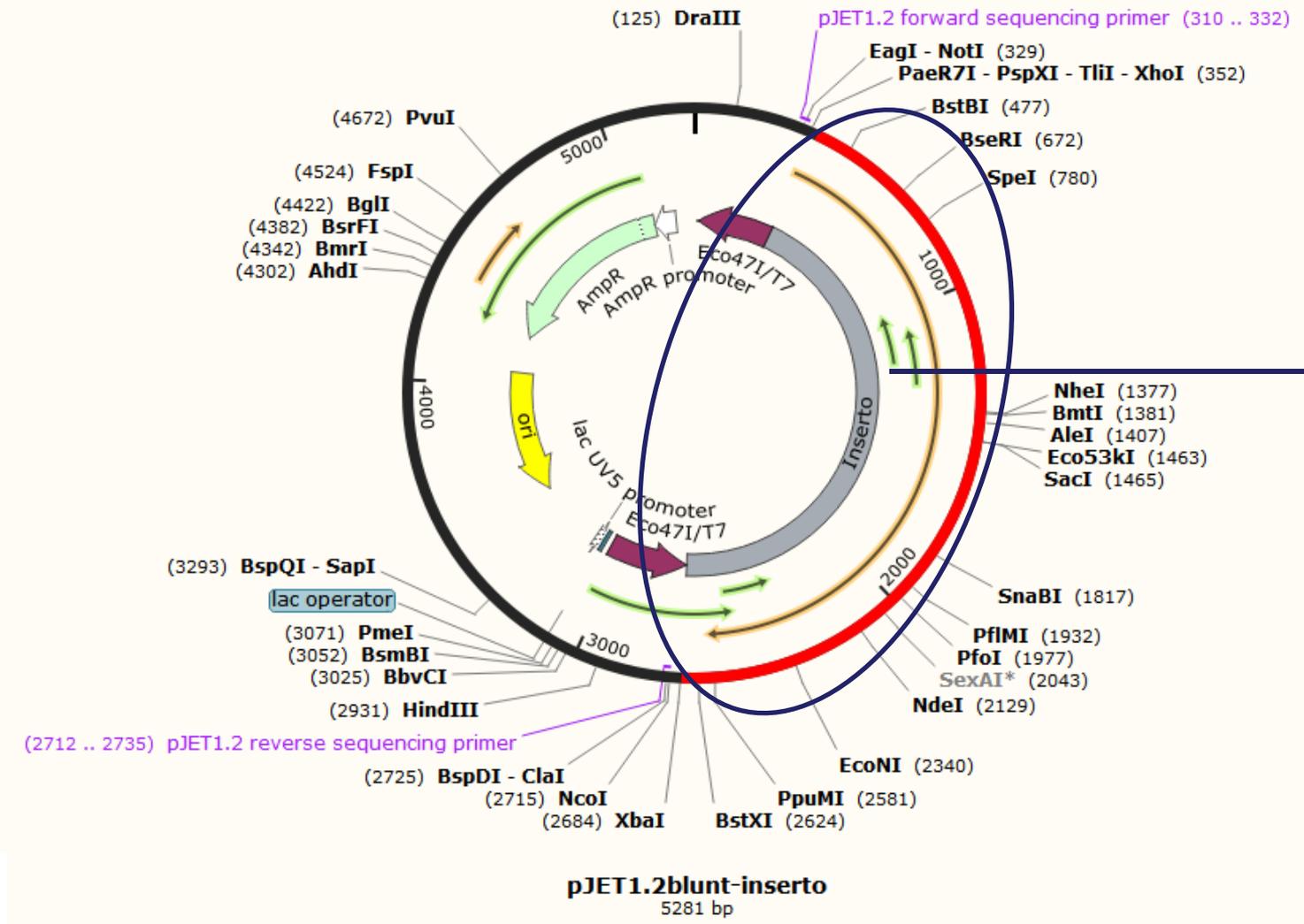
## Digestão para isolamento do inserto de 2300 bp



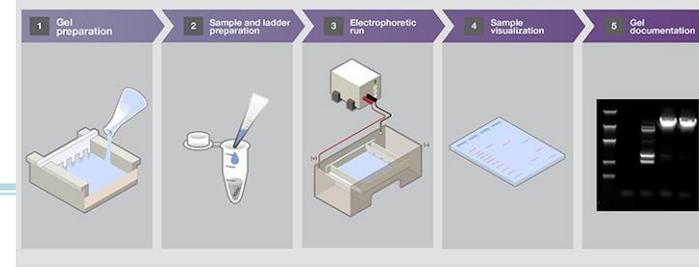
- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300: 2,5 µL
- enzima *XhoI*: 1µL
- tampão de reação [10x]: 2,5 µL
- ddH<sub>2</sub>O até perfazer um volume total de 25µL

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  + 2  $\mu\text{L}$  tampão de amostra;

Digestão enzimática: 10  $\mu\text{L}$  + 2  $\mu\text{L}$  tampão de amostra;

DNA plasmídico: 10  $\mu\text{L}$  + 2  $\mu\text{L}$  tampão de amostra.

**7- Aplicar as amostras nos poços.**

**8- Reservar o primeiro poço para o marcador molecular – 2,5  $\mu\text{L}$  (já contém tampão de amostra);**

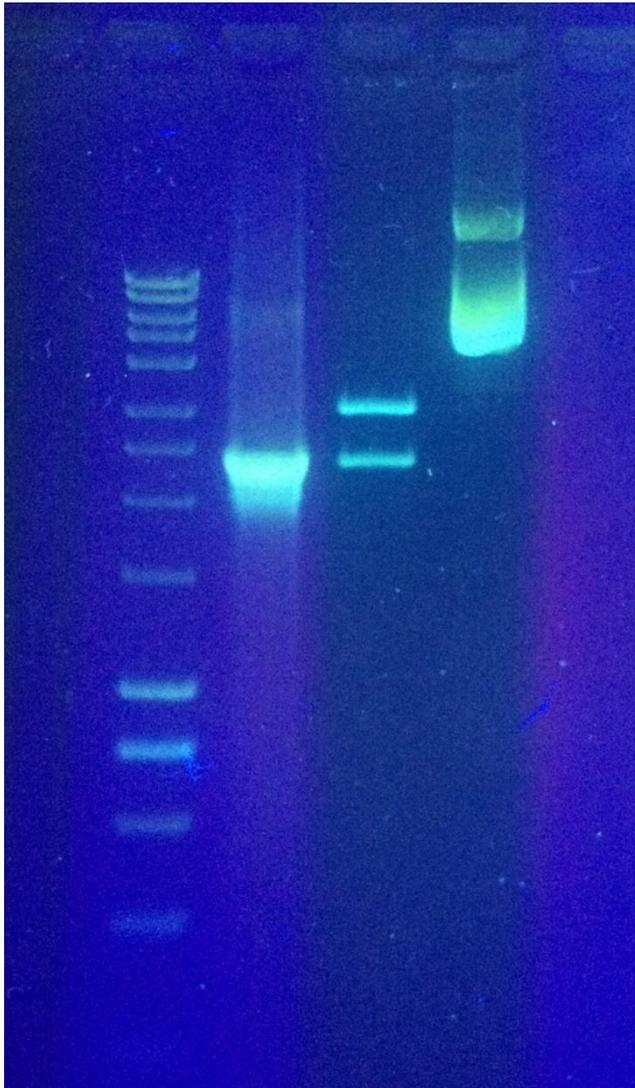
**9- Ajustar a voltagem para 80 V.**

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

**11 - Fazer registo fotográfico e discutir os resultados obtidos.**

# Resultado

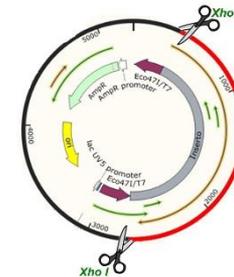
MM 2,5  $\mu$ L  
PCR 10  $\mu$ L  
Dig 10  $\mu$ L  
DNA plasmídico 10  $\mu$ L (500 ng)



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