



Ciências
ULisboa
Faculdade
de Ciências
da Universidade
de Lisboa



2019/2020

FUNDAMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

PRÁTICAS LABORATORIAIS

Departamento de Biologia Vegetal
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Docentes:

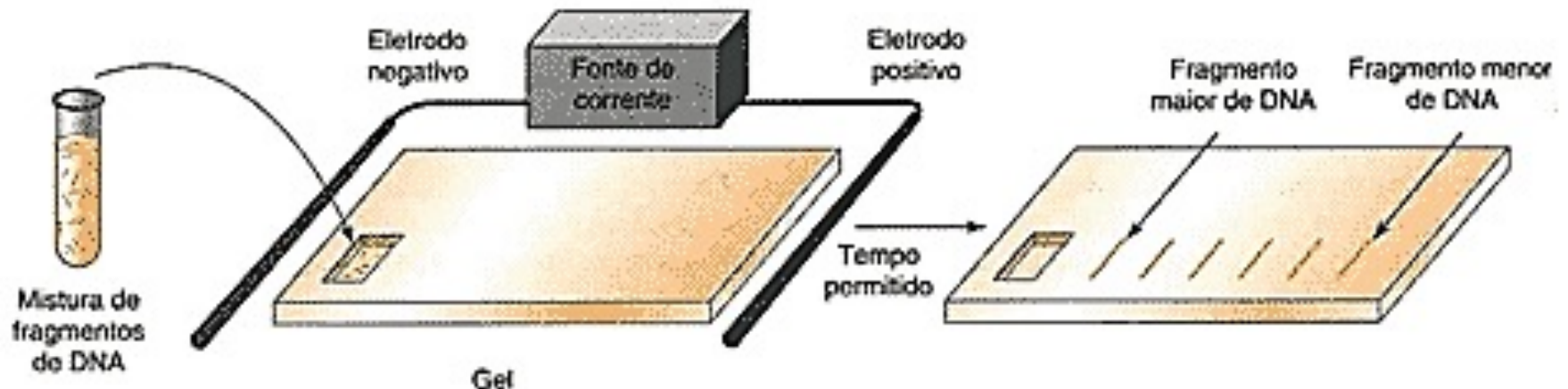
Mónica Sebastiana
Rita Santos
Filipa Monteiro
Fernando Dias
Susana serrazina

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

Eletrforese em gel de agarose

Eletrforese na análise de ácidos nucleicos:

“A eletrforese 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.”

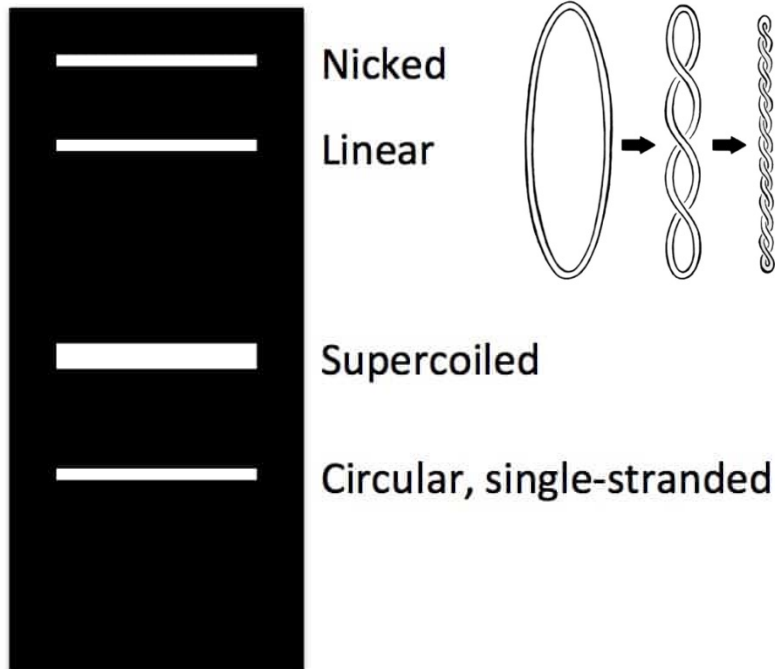


Eletróforese em gel de agarose

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

A eletróforese 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: poliacrilamida

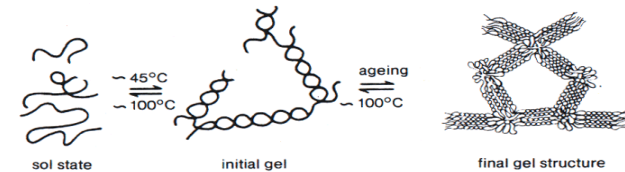
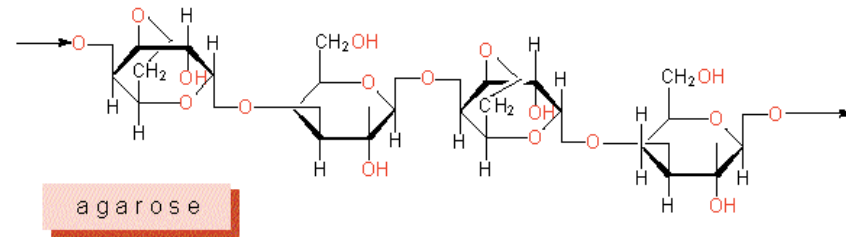


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

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 todas carga elétrica negativa, a migração é limitada pelo **atrito** causado pela malha de agarose”

	Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
Poro maior	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
Poro menor	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:

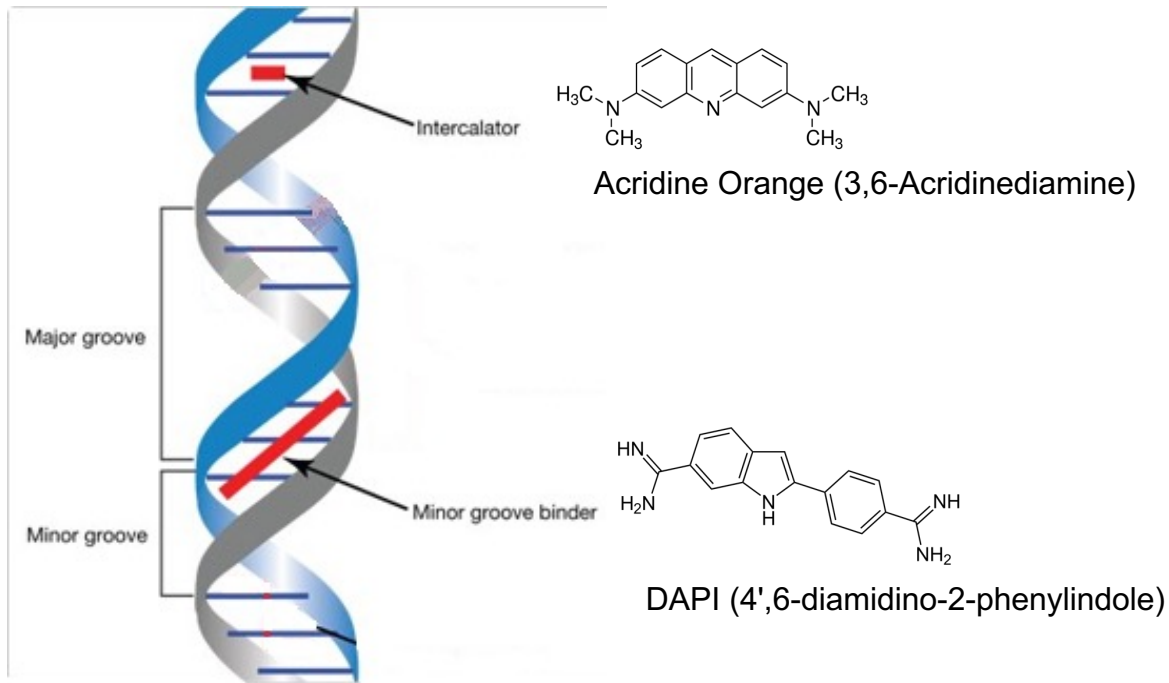
- a) TAE (Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-acetato-EDTA)

- b) TBE (Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer – Tampão de eletroforese-Tris-borato-EDTA)

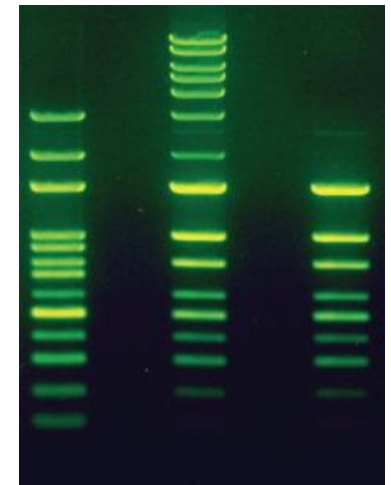
Componentes

Corantes de ácidos nucleicos

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



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

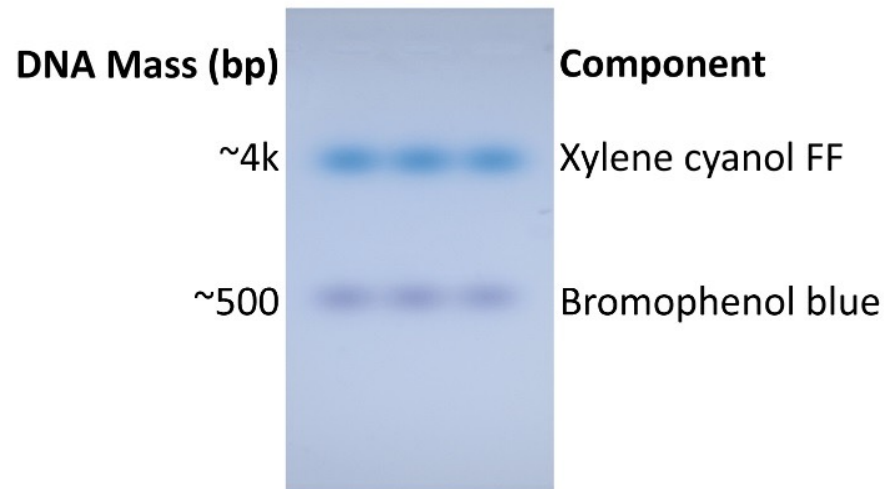


Componentes

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. azul de bromofenol) para acompanhar a migração das amostras no gel, durante a eletroforese.

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



1 % Agarose Gel, 0.5× TAE Buffer

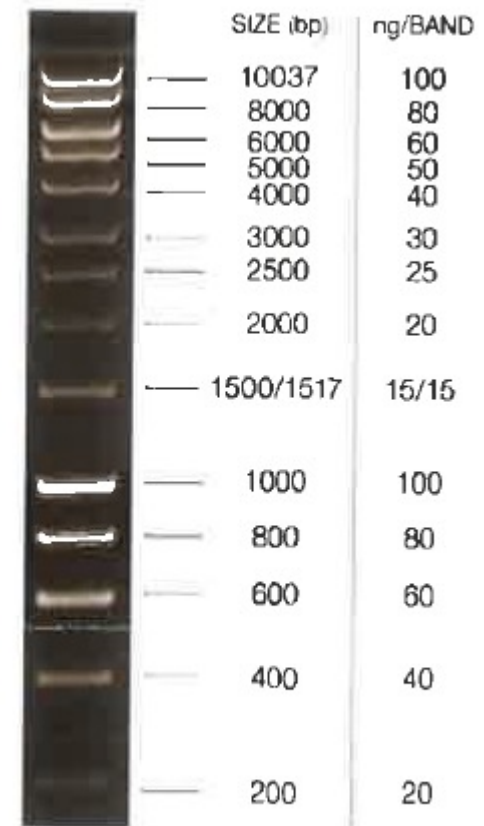
Componentes

Marcador de Massas Moleculares:

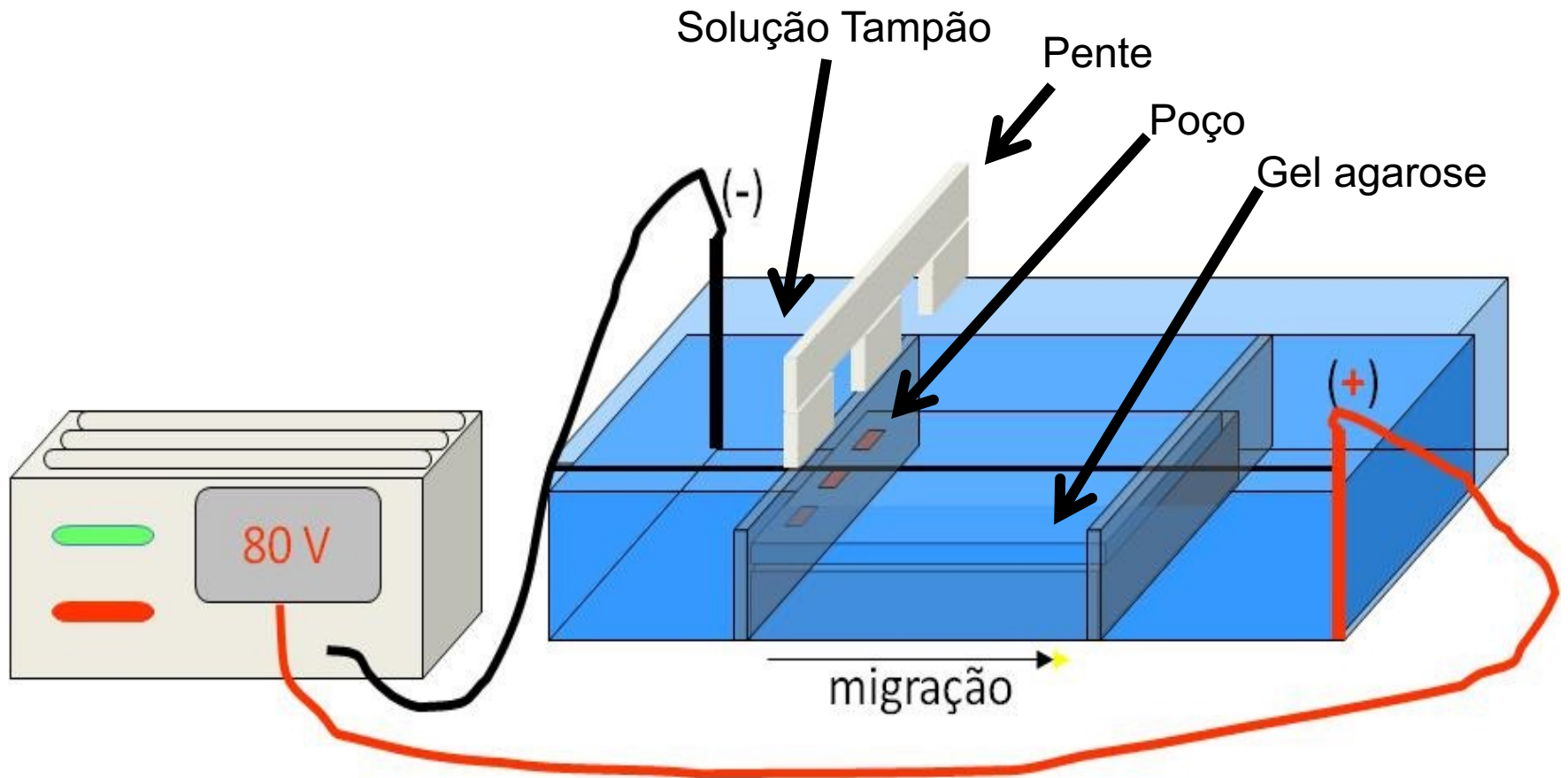
É necessário aplicar em um dos poços o marcador de massas moleculares (*ladder*) para proceder à estimativa visual da dimensão dos fragmentos de DNA

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.

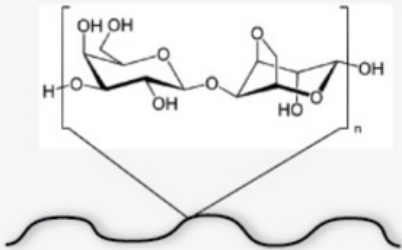


Montagem



Resumo

Agarose



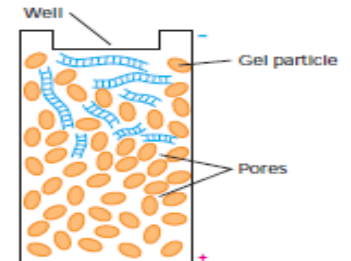
Ethidium Bromide



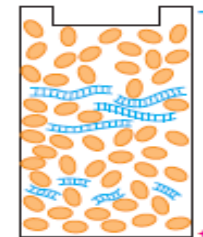
DNA restriction fragments



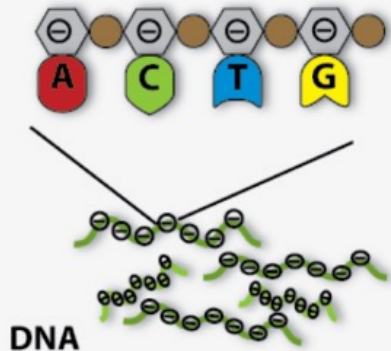
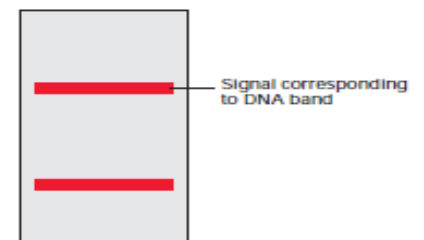
Place mixture in the well of an agarose or polyacrylamide gel. Apply electric field



Molecules move through pores in gel at a rate inversely proportional to their chain length

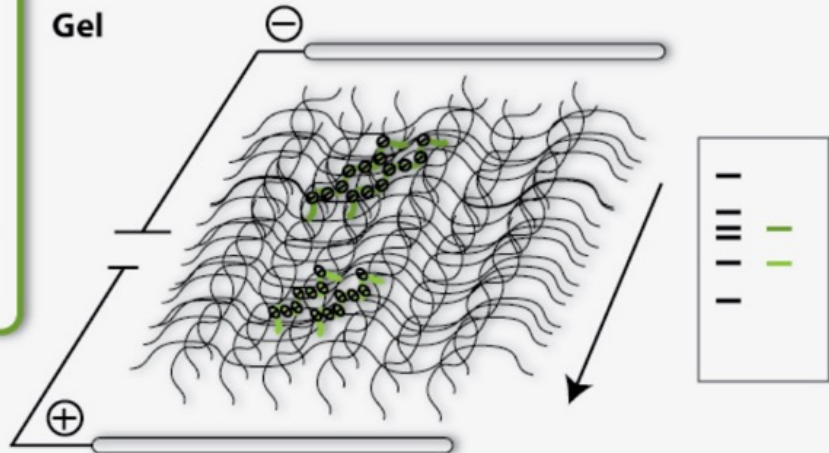


Subject to autoradiography or incubate with fluorescent dye

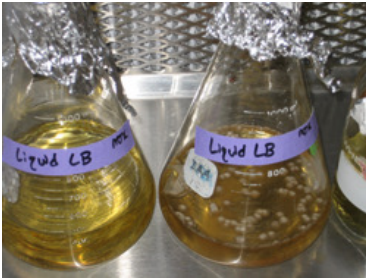


Agarose Gel-Electrophoresis

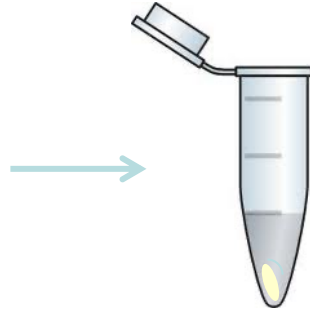
Gel



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



Etiquetar (Turma/data)

Descartar o sobrenadante e secar o *pellet* ao ar

Digestão e PCR

Relembrar: PCR e Restrição

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]: 2 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:

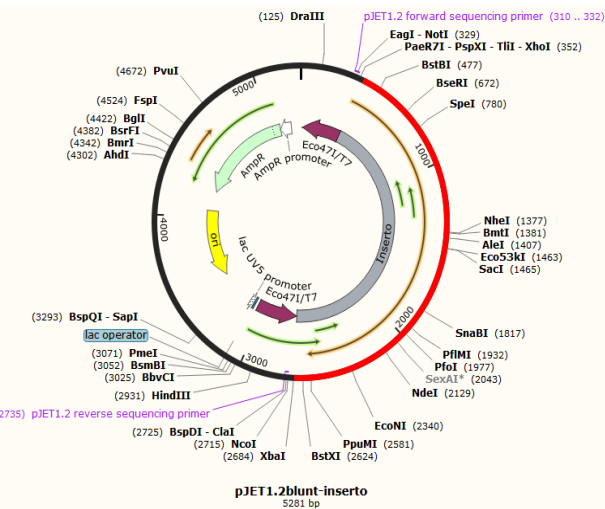
- 94 °C - 2 min.
- 94 °C - 1 min.
- 60 °C - 1 min.
- 72 °C - 3 min
- Repetir os passos de 2 a 4 - 29x
- 72 °C - 10 min
- 4 °C, até retirar do PCR
- Congelar a -20°C até utilização

Digestão para isolamento do inserto de 2300 bp

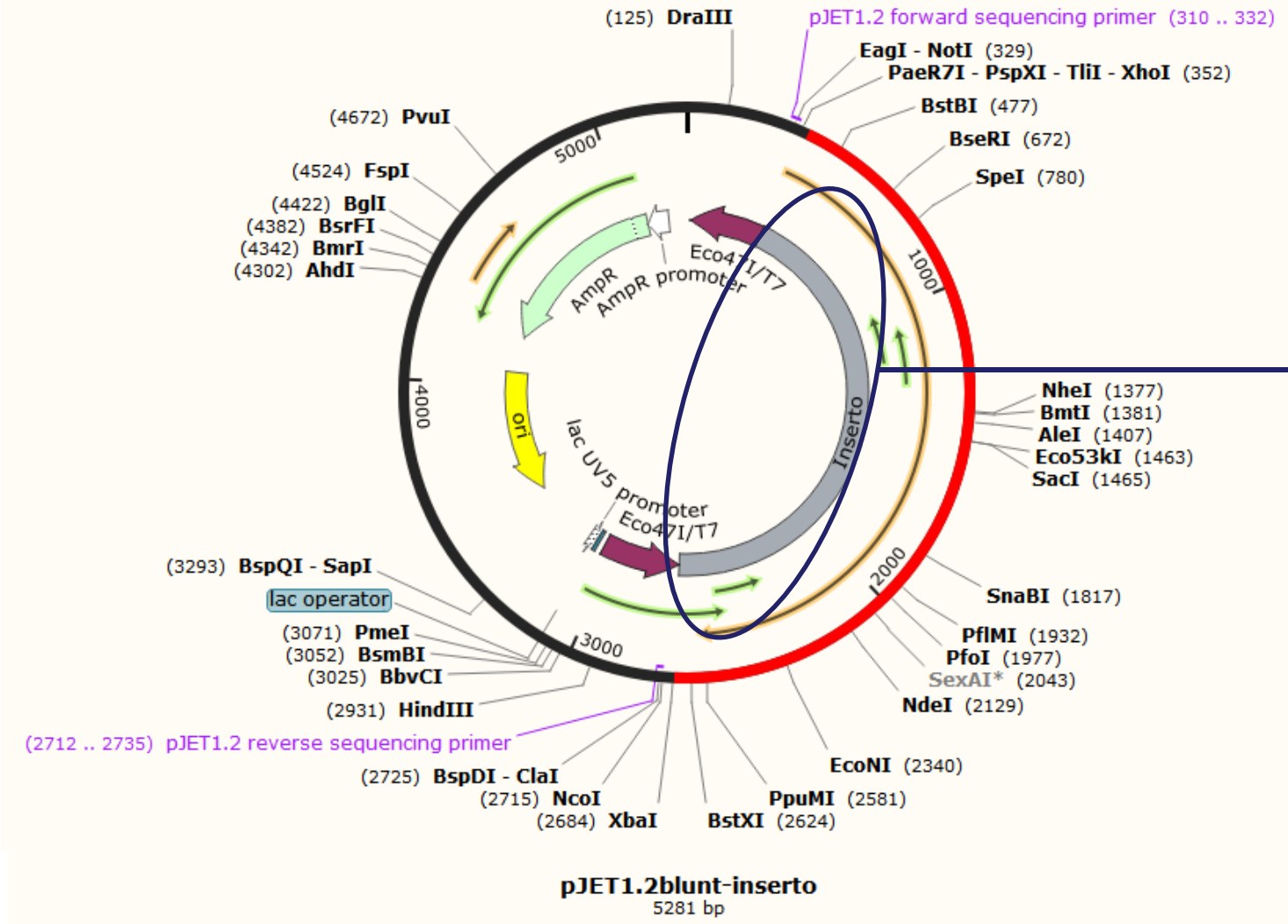


- 250 ng de plasmídeo Pjet1.2sp2300
- enzima *Xho*I: 1 μ L
- tampão de reação [10x]: 2,5 μ L
- ddH₂O até perfazer um volume total de 25 μ L

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



Inserto



Cerca de 2300 bp

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 2,5 mL de Green Safe [10 mg/ml] ficando na concentração final de 0,5 mg/mL
- 3-** Colocar de imediato o pente no molde de espessura e número de dentes adequados ao volume e número de amostras a analisar.
- 4 –** Verter a agarose e esperar que o gel solidifique.
- 5-** Retirar o pente e 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: Produtos de PCR: 10 μ L + 2 μ L tampão de amostra; Digestões enzimáticas: volume correspondente a 100 ng de plasmídeo digerido + volume de tampão de amostra [6x] de forma a que fique aprox. [1x] final.
- 7-** Aplicar as amostras nos poços.
- 8-** Reservar o primeiro poço para o marcador de peso molecular - 2 μ L (já contém tampão de amostra);
- 9-** Pôr a tampa e ajustar a voltagem para 80 V. Correr o gel até pelo menos metade do comprimento.
- 10-** Para visualizar as bandas de DNA Colocar o gel sobre o transiluminador e analisá-lo sob radiação ultravioleta.
- 11 -** Fazer registo fotográfico e discutir os resultados obtidos.