

Synenergene

Kit de Atividades

Atividades experimentais

A biologia sintética pode ser definida como uma abordagem multidisciplinar da biologia, da engenharia e de outras áreas da ciência para construir novos produtos biológicos ou novas utilizações e funções diferentes de produtos biológicos já conhecidos.

A biologia sintética tem sido utilizada para modificar ou reconstruir organismos vivos com o objetivo de produzirem compostos úteis nas mais variadas indústrias, desde a farmacêutica à têxtil.

As descobertas na década de 70 do século XX, de enzimas com a capacidade de modificar as moléculas de DNA (como as endonucleases de restrição e a ligase de DNA), vieram abrir o caminho para aquilo que é hoje a biologia sintética. Muitos dos novos produtos são derivados de modificações do DNA, embora não exclusivamente.

Os jovens estudantes têm hoje acesso a uma informação global, atual e generalizada. Através de séries de televisão ou de notícias diárias veiculadas pelas redes sociais, rapidamente tomam conhecimento dos avanços da ciência, das novas tecnologias. Todavia, nem sempre essa informação é a mais correta e está afastada da experimentação.

Neste kit, são fornecidos os meios para que o professor(a)/formador(a) possa realizar, em laboratório ou sala de aula, experiências com procedimentos biológicos que fazem parte da rotina da investigação e desenvolvimento na área da biologia sintética. Os estudantes vão poder manipular DNA, cortar moléculas de DNA, ligar fragmentos de DNA, construir mapas de restrição e utilizar bases de dados de sequências de DNA para trabalhar com DNA *in silico*.

Este *kit* contém componentes e instruções para realizar 3 experiências:

- A • Mapa de restrição
- B • Modificação de DNA com enzimas de restrição
- C • Bioinformática

Material destinado às atividades experimentais:

- 1 Tina de eletroforese
- 1 Carregador
- 1 Tabuleiro para géis
- 1 Pente
- 1 Seringa para pipetar
- Pontas amarelas
- Tubos estéreis
- Caixas de reagentes (DNA de plasmídeo, enzimas de restrição, ligase de DNA, tampão de aplicação, corante para o gel, tampões das enzimas)
- Frasco com agarose
- Frasco com tampão TBE 5x

A. Construção de um mapa de restrição

Introdução:

Um mapa de restrição corresponde num esquema visual que indica os locais de “corte” (restrição), conhecidos dentro de uma determinada sequência de ADN. A construção de um mapa de restrição consiste na digestão de uma molécula de DNA com diferentes enzimas de restrição. A análise dos fragmentos obtidos é depois realizada através de uma eletroforese em gel de agarose, permitindo identificar os locais onde cada enzima “corta” o DNA. O mesmo procedimento pode ser usado também para identificar a molécula inicial.

Material:

- 1 Tubo com um plasmídeo pBR322
- 2 Enzimas de restrição diferentes *AvaI* e *HincII*
- 1 tubo com tampão para as duas enzimas de restrição
- 1 tubo com marcador de Peso Molecular
- Material para eletroforese
- Tubos estéreis
- Seringa para pipetar
- Estufa ou banho a 37 °C
- Tubos com água estéril

Procedimento:

1 · Coloque os seguintes volumes de plasmídeo em 4 tubos diferentes:

Tubo 1 – 2,5 µL; Tubo 2 – 4 µL; Tubo 3 – 8 µL; Tubo 4 – 2,5 µL

2 · No primeiro tubo adicione 1,5 µL de tampão de enzima de restrição e 2 µL de *AvaI*.

3 · No segundo tubo, adicione 1,5 µL de tampão da enzima de restrição e 2 µL de *HincII*.

4 · No terceiro tubo, adicione 1,5 µL de tampão da enzima de restrição, 2 µL de *AvaI* e 2 µL de *HincII*.

5 · No quarto tubo (controlo) adicione 2,5 µL de água estéril.

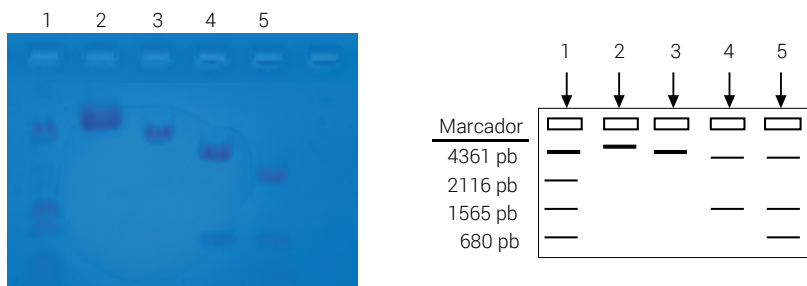
6 · Incube todos os tubos a 37 °C durante pelo menos uma hora, sendo recomendável 2 horas.

7 · Prepare um gel de eletroforese, de acordo com as instruções do Anexo I.

8 · Adicione a cada tubo 2 µL de tampão de aplicação e introduza cada uma das quatro amostras num poço diferente do gel.

9 · Realize a separação dos fragmentos por eletroforese e core o gel, de acordo com o Anexo I.

10 · Registe o tamanho relativo das bandas e tente identificar qual o plasmídeo que utilizou, a partir do mapa de restrição.



1 · Marcador 2 · Plasmídeo não digerido 3 · Plasmídeo digerido com *Ava* I

4 · Plasmídeo digerido com *Hinc* II (um fragmento com 3254 e 1 fragmento com 1107 pb)

5 · Plasmídeo digerido com *Ava* I/*Hinc* II (1 fragmento com 2482, 1 fragmento com 1107 e 1 fragmento com 772 pares de bases).

B. Modificação de DNA com enzimas de restrição

Introdução:

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular que se encontram em muitos microrganismos (na maior parte das bactérias) e que possuem capacidade de replicação autónoma (ou seja, podem replicar-se dentro da célula sem necessidade de recorrer ao DNA cromossómico da bactéria). Dadas as suas características de pequenas dimensões, facilidade de incorporação nas bactérias e capacidade de autorreplicação, os plasmídeos constituem um vetor útil para incorporar DNA estranho em bactérias. Para tal, é necessário “cortar” o plasmídeo com uma enzima de restrição que permite linearizar a molécula, e posteriormente ligar um fragmento estranho que se irá inserir no plasmídeo. Esta ligação é realizada com o auxílio de uma enzima que permite ligar moléculas de DNA, a DNA ligase.

Nesta experiência vamos linearizar um plasmídeo com uma enzima de restrição, religar esse plasmídeo, e monitorizar estas reações através de uma eletroforese em gel de agarose.

Material:

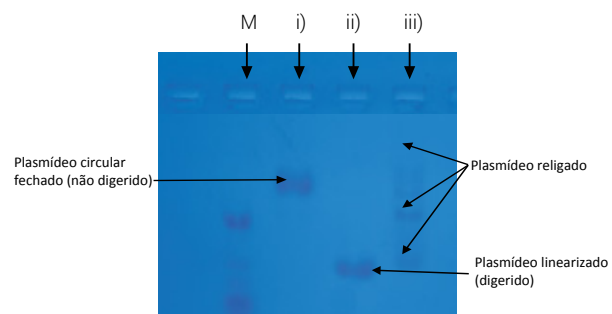
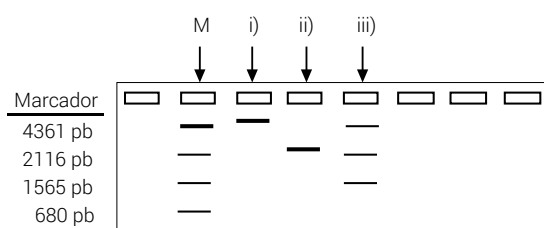
- 1 Tubo com um plasmídeo pUC18
- 1 Tubo contendo enzima de restrição *Bam*HI
- 1 Tubo contendo tampão da enzima de restrição *Bam*HI
- 1 Tubo contendo DNA ligase
- 1 Tubo contendo tampão da DNA ligase
- 1 Tubo contendo marcador de peso molecular (M)
- Material para eletroforese
- Tubos estéreis
- Água estéril (fornecida em tubos)
- Seringa
- Estufa ou banho a 37 °C (não fornecido)

Procedimento:

- 1 · Retire 30,0 µL de plasmídeo para um tubo novo.
- 2 · Adicione a esse tubo 3,0 µL de tampão da enzima de restrição.
- 3 · Adicione 1,5 µL da enzima de restrição *Bam*HI.

- 4 · Adicione 5,5 µL de água estéril.
- 5 · Incube durante duas horas a 37 °C.
- 6 · Retire 20 µL do volume de reação para novo tubo, adicione 5,0 µL de água, 2,0 µL de tampão de ligase e 3,0 µL de DNA ligase.
- 7 · Prepare um gel de eletroforese, de acordo com as instruções do Anexo I.
- 8 · Adicione 5,0 µL do tampão de aplicação (corante azul) a cada amostra e misture.
- 9 · Aplique no gel cada uma das 3 amostras, uma em cada poço:
 - i) 10 µL de Plasmídeo sem tratamento;
 - ii) 10 µL de Plasmídeo cortado;
 - iii) 30 µL Plasmídeo religado. Aplique também, noutro poço do gel, 10 µL de marcador de peso molecular (M).

O esquema seguinte do gel de agarose, ilustra como devem ser dispostas as amostras.



10 – Observe as diferenças.

Notas explicativas: O plasmídeo circular fechado (i) surge como uma banda acima da banda das 4361 pares de bases do marcador apesar do plasmídeo apenas possuir um comprimento de 2686 pares de bases. Isto deve-se ao facto de o plasmídeo circular fechado migrar na malha do gel com uma velocidade inferior às moléculas de DNA lineares (como as bandas do marcador ou o plasmídeo linearizado em ii)). Na verdade, não é possível avaliar o tamanho de uma molécula de DNA por eletroforese em gel de agarose se esta estiver numa conformação de DNA circular fechado. Em ii), o plasmídeo foi linearizado e por isso surge na posição esperada, isto é, acima da banda do marcador que possui um comprimento de 2116 pares de bases. Em iii) o DNA pode surgir com várias bandas correspondentes a várias hipóteses de ligação do plasmídeo. Há moléculas que simplesmente se religaram e portanto surgem na mesma posição que i), há outras que formaram cadeias de múltiplas moléculas de plasmídeo ligadas umas às outras e por isso podem surgir em diferentes locais do gel.

Pergunta: Se pretendêssemos impedir que as moléculas de plasmídeo linearizado se religassem formando novamente moléculas de DNA circular fechado (e quiséssemos que se ligassem apenas, por exemplo, a um DNA estranho formando um plasmídeo híbrido), como deveríamos proceder?

(Sugestão: veja qual a ação da enzima fosfatase alcalina...)

C. Bioinformática

Introdução:

Esta atividade permitirá aprender as operações mais simples de biologia sintética *in silico*. Os estudantes poderão ligar-se, através de um computador normal com ligação a uma rede, a bases de dados de DNA (de acesso gratuito), identificar sequências de DNA de um dado gene e encontrar regiões comuns a esses genes, por emparelhamento.

Atividade C1 · Encontrar uma sequência de DNA de interesse numa base de dados

- 1 · Ligue o seu computador à base de dados do NCBI
(National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov (Figura1)).
- 2 · Na linha de cima escreva a expressão "*phytoene synthase*" e clique em "*search*".
- 3 · Observe e registe o número de sequências que existem na base de dados sobre a fitoeno sintase, uma enzima envolvida na biossíntese dos carotenoides.
- 4 · Como são muitas sequências, repita a análise restringindo com as seguintes frases:
 - *phytoene synthase triticum turgidum*
 - *phytoene synthase triticum turgidum psyA*
- 5 · Registe o número de sequências.
- 6 · Repita a pesquisa com outros genes de interesse (e.g. *oncogenes*; *human growth hormone*)

Atividade C2 · Pesquisar semelhanças entre sequências

Este programa tem várias funções de pesquisa de semelhanças entre sequências. A pesquisa de semelhanças é muito útil porque duas sequências muito semelhantes podem indicar uma função conservada, em termos evolutivos. Para que possamos comparar sequências, elas devem estar no formato *FASTA*, como poderá encontrar na *pendrive* fornecida neste kit.

- 1 · Ligue o seu computador à base de dados do NCBI
(National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov (Figura1)).
- 2 · Selecione "*Analyze*".
- 3 · Selecione "*BLAST*".
- 4 · Selecione "*Nucleotide Blast*".
- 5 · Para a janela de cima copie a sua sequência em formato *FASTA* e clique "*Blast*".
- 6 · Qual a % de semelhança da sua sequência com aquelas encontradas na base de dados?

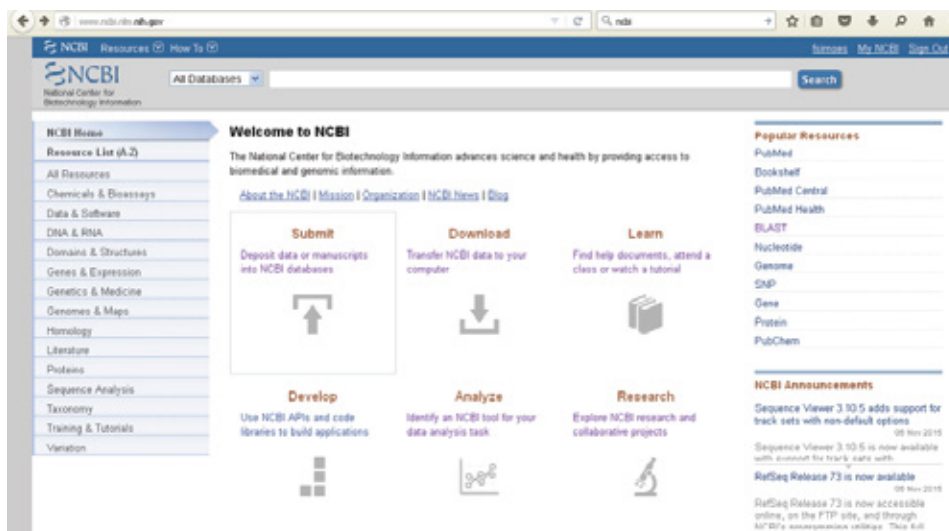


Figura 1: National Center for Biotechnology Information homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O resultado da pesquisa é apresentado de três modos diferentes:

(NOTA: De um dia para o outro, os resultados podem ser diferentes, já que a base de dados pode incorporar novas sequências a cada duas horas, o que significa que o universo de sequências na base de dados hoje será diferente do de ontem e daquele de amanhã).

- 1 É apresentado um quadro com linhas vermelhas e de outras cores. Cada linha representa uma sequência da base de dados, sequência essa que foi identificada como tendo uma semelhança significativa com a sequência que nós quisemos analisar. O tamanho da linha e a sua cor representam o número de nucleótidos que têm um emparelhamento substancialmente igual com a nossa sequência em análise. Por exemplo, cor vermelha significa mais 200 nucleótidos alinhados, enquanto a cor rosa significa entre 80 e 200.



- 2 Descendo no ficheiro, encontramos a lista dos ficheiros das sequências, pela mesma ordem que estão representados na figura abaixo. Assim, se eu clicar no nome do ficheiro, poderei saber mais informações sobre aquela sequência.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download View Graphical Overview View of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccum strain CBS-1084-MTP-2218 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1072	1072	100%	0.0	99%	EF115022.1
☐	Triticum turgidum subsp. durum cultivar Kola phytoene synthase 2-2 (Pta2-2) gene, partial cds	1072	1072	100%	0.0	99%	DQ942445.1
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccoides strain CBS-1084-MTP-2295 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1066	1066	100%	0.0	99%	EF115080.1
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccoides strain CBS-1084-MTP-2295 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1066	1066	100%	0.0	99%	EF115058.1
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccoides strain CBS-1084-MTP-2228 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1066	1066	100%	0.0	99%	EF115031.1
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccoides strain CBS-1084-MTP-2221 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1066	1066	100%	0.0	99%	EF115025.1
☐	Triticum turgidum subsp. dicoccum strain CBS-1084-MTP-2209 phytoene synthase (PtaA) gene, partial cds	1066	1066	100%	0.0	99%	EF115033.1

- 3 Se continuar a descer no ficheiro, vão surgir, pela mesma ordem, as imagens que obteremos se clicarmos em cada uma das sequências acima. Por exemplo Em cuja imagem temos a sequência que nós introduzimos (Query = pesquisa) e a sequência da base de dados que se revelou muito próxima desta. Os traços verticais indicam que naquela posição o nucleótido é o mesmo em ambas as sequências. A ausência do traço significa que nessa posição a base é diferente. Na legenda podemos verificar que existe 99% de semelhança entre as duas sequências (592 semelhanças em 598).



Outros exercícios:

- 1 Identifique a posição das bases que não são iguais.
Resultado: 160, 259, 386, 467, 502 e 505
- 2 O que acha que significa a expressão Plus/Plus por baixo de Strand?
Significa que ambas as sequências estão representadas na sua orientação 5'-3' orientação Plus, ou podem estar representadas na orientação 3'-5' (orientação Minus). Frequentemente, não sabemos em que orientação está o fragmento que sequenciámos e pode existir um emparelhamento Plus-Minus, já que o BLAST testa todas as orientações possíveis.

Anexo 1 · ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Material necessário:

Confirme que tem todo o material necessário à preparação das amostras, soluções e eletroforese do gel de agarose.

Para a tina de eletroforese:

- Tina (com tampa)
- Tabuleiro
- Pente
- Elétrodos (fio vermelho e fio preto)
- Carregador
- Fita-cola (não fornecida)

Para as soluções:

- Tampão TBE (concentrado 5x)
- Agarose
- Água (não fornecida; usar água destilada ou a água mais pura a que tiver acesso)

Para as amostras:

- Tampão de aplicação
- Seringa
- Pontas amarelas
- DNA das experiências anteriores

Preparação das soluções:

O gel de agarose tem que ser preparado em tampão TBE a 0,5x. O tampão fornecido vem concentrado 10x, portanto terá que ser diluído a 1:20 na água mais pura que tiverem (água destilada, água bidestilada, água Mili-Q, etc.). Se não tiverem acesso a água química e bacteriologicamente pura, pode ser utilizada água da torneira, embora com piores resultados.

Para um gel é necessário cerca de 40-50 mL de tampão TBE a 0,5x. Para cobrir o gel de uma tina é necessário cerca de 100 mL, o que significa que por cada experiência necessitarão no máximo de 150 mL de tampão TBE a 0,5x. No entanto, se a água tiver boa qualidade e for estéril, a solução pode manter-se estável durante longos períodos, podendo ser considerada a preparação de uma maior quantidade (e.g. 400 mL) para armazenamento.

1 · Tampão TBE

- O tampão enviado está concentrado 5x. Para preparar, por exemplo, 400 ml uma solução a 0,5x terá de diluir 40 mL de Tampão TBE 5x em 360 mL de água destilada estéril.
- Agitar para homogeneizar a solução (por exemplo colocando a solução num frasco com rolha hermética e invertendo o frasco várias vezes).
- Após utilização, o tampão deve ser mantido em frasco rolhado à temperatura ambiente. Se, após longos períodos sem utilização, a solução ficar contaminada com fungos ou outros microrganismos, descartar e preparar nova solução.

2 · Agarose

- A solução de agarose deve ser preparada em tampão TBE 0,5x (atenção: não preparar a agarose no TBE 5X fornecido.)
- Para os trabalhos presentes a agarose deve ser preparada sempre na concentração de 0,8%:
- Pese 0,8 g de agarose e dissolva em 100 mL de tampão TBE 0,5x num frasco com rolha hermética. Agite para diluir um pouco e coloque no micro-ondas por períodos curtos de tempo (cerca de 15 segundos de cada vez). Volte a agitar e repita a operação até que a solução fique totalmente transparente (se os grãos de agarose não forem totalmente dissolvidos, o gel não ficará homogêneo, prejudicando a separação dos fragmentos de DNA).

3 · Corante do gel (*Fast Blast*)

- O corante do gel é fornecido no estado líquido, 500x concentrado, dentro de um tubo identificado como "corante". Para se preparar a solução, deverá dissolver todo o conteúdo do tubo (800 µL) em 200 mL de água (a água mais pura disponível, de preferência estéril), e agitar até que todo o corante esteja bem dissolvido. A concentração final será 2x.
- A solução tem de ser, obrigatoriamente, armazenada no escuro porque o corante degrada-se na presença de luz. Utilize um frasco de vidro escuro, envolva o frasco com papel de alumínio e guarde num armário com porta.
- A solução corante é reutilizável. Depois de corar um gel, coloque novamente a solução no frasco escuro e armazene até nova coloração.

Preparação do gel:

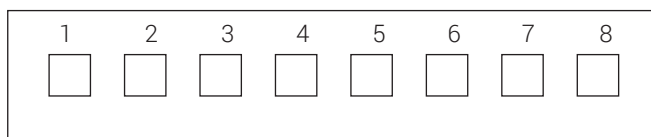
- 1 · Vede com fita-cola os dois lados abertos do tabuleiro do gel (azul) que vem dentro da tina (Figura 1, abaixo).
- 2 · Coloque o tabuleiro numa bancada plana (certifique-se que o tabuleiro fica totalmente horizontal, nivelado, para que o gel não fique mais grosso de um lado e mais fino do outro).
- 3 · Verta cuidadosamente para o tabuleiro, devagar e sem deixar formar bolhas, cerca de 40 mL de agarose fundida e arrefecida até aos 45-50 °C, quando já conseguir segurar o frasco da agarose nas mãos sem se queimar (Figura 2 e 3).
- 4 · Coloque imediatamente o pente a cerca de 1 cm de distância do fundo do tabuleiro e completamente perpendicular ao fundo (Figura 4). Os dentes dos pentes devem ficar submersos no gel cerca de 3 mm. **Se ao colocar o pente verificar que os dentes ficam de fora ou levemente em contacto com o gel, verta mais alguns mililitros de gel para dentro do tabuleiro.**
- 5 · Aguarde cerca de 30 minutos, até o gel estar totalmente solidificado.
- 6 · Remova o pente para cima, perpendicularmente, com cuidado para não destruir os poços (Figura 5).
- 7 · Retire cuidadosamente a fita-cola de ambos os lados, mantendo o tabuleiro na horizontal, e coloque o gel com o tabuleiro dentro da tina, com os poços para o lado do eletrodo preto (polo negativo).
- 8 · Verta cuidadosamente tampão TBE 0,5x para dentro da tina até cobrir completamente todo o gel (Figura 6); garanta que todos os poços do gel estão também cheios de tampão (Figura 7).

Aplicação das amostras:

Antes de aplicar as amostras, coloque a tina com o gel no local da bancada onde a eletroforese vai decorrer. *A tina não deve ser deslocada depois da aplicação das amostras no gel.*

O volume das amostras a aplicar não pode exceder 35 µL por poço (Figura 8), já com o tampão de aplicação (azul) incluído. As amostras devem ser colocadas sequencialmente nos poços e deve ser anotado, imediatamente, qual a amostra que foi colocada em cada poço (Figura 9). Os poços devem ser numerados de 1 a 8, num esquema no papel.

Exemplo:



1 · Marcador; 2 · Plasmídeo não cortado; 3 · Plasmídeo cortado; 4 · Plasmídeo cortado e religado

Condições de eletroforese:

1 · Depois de carregar as amostras nos poços do gel não volte a mexer a tina de eletroforese. Os poços devem estar junto do polo negativo (elétrodo preto).

2 · Coloque a tampa na tina e coloque os fios nos elétrodos de cores correspondentes da tina e ligue à tomada (não importa a posição do carregador na tomada).

3 · Verifique se há passagem de corrente: deverão começar a libertar-se umas pequenas bolhas de gás, no polo negativo (Figura 11).

4 · Deixar a eletroforese decorrer até que a frente azul escura do corante chegue a cerca de 1 cm do final do gel (aproximadamente 2 horas, dependendo da espessura do gel, do estado das baterias e da qualidade da água utilizada).

5 · Desligue o carregador e retire o gel cuidadosamente, fazendo-o deslizar do tabuleiro da tina para um recipiente adequado, preferencialmente de vidro. Em alternativa utilize a tampa da tina como recipiente de coloração.

Nota: Durante o decorrer da eletroforese, é normal depositarem-se cristais de sal ao longo do elétrodo, dentro da tina, formando uma mucilagem a envolver o elétrodo. Esta mucilagem não interfere na separação dos fragmentos e pode ser eliminada no final na eletroforese, eliminando o tampão da tina e esfregando o elétrodo com o dedo ou um esfregão, suavemente, debaixo de água corrente.

Coloração do gel:

1 · Coloque o gel num recipiente adequado após eletroforese. Preferencialmente, o recipiente deverá ser um tabuleiro de vidro, pouco maior que o gel, mas com uma profundidade que permita cobrir o gel totalmente com o corante.

2 · Cubra totalmente o gel com o corante (*Fast Blast*), preparado de acordo com as indicações anteriores (Figura 12).

3 · Deixe a corar durante pelo menos 60 minutos, com agitação ocasional. Os melhores resultados são obtidos com coloração durante a noite. Assim, desejavelmente a eletroforese deve ser corrida num dia, o gel deixado a corar durante a noite e visualizado no dia seguinte.

4 · Quando se começarem a ver as bandas, pode retirar-se o gel e fazer o registo. Posteriormente pode prosseguir-se a coloração

por mais algum tempo.

5 · Retirar o corante e vertê-lo novamente para o frasco de armazenamento do corante (o corante é reutilizável algumas vezes).

6 · As bandas são melhor visualizadas colocando o gel sobre um papel branco ou, de preferência, sobre uma superfície branca iluminada por baixo.

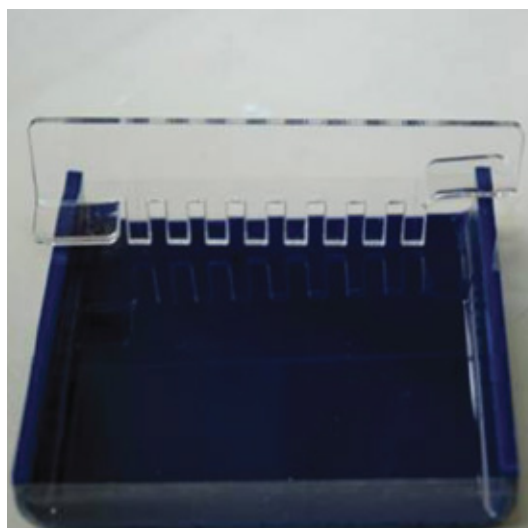


Figura 1
Tabuleiro selado com fita-cola e com o pente colocado na posição correta



Figura 2
Solução de agarose (0,8%) fundida no micro-ondas

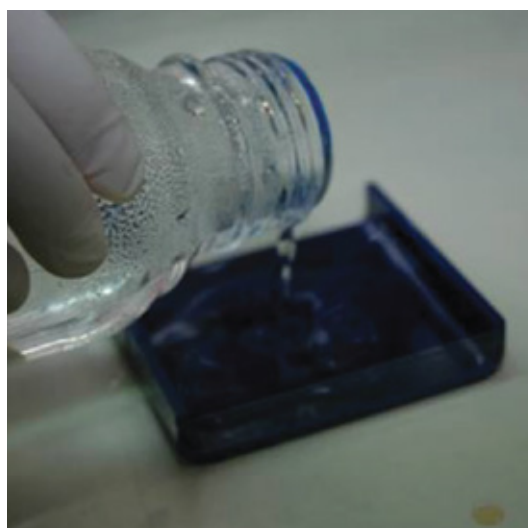


Figura 3
Verter a agarose cuidadosamente no tabuleiro (a agarose foi deixada arrefecer até cerca de 45 °C)

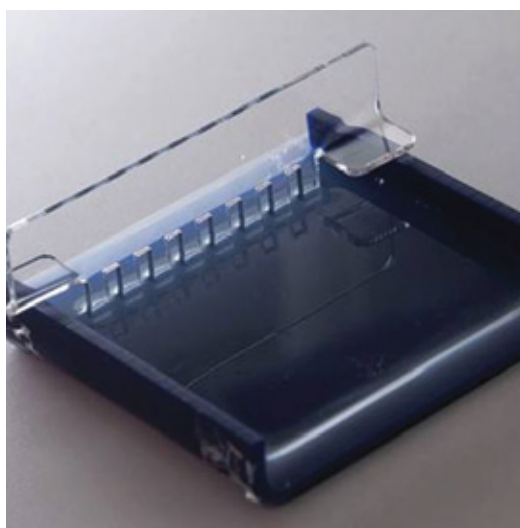


Figura 4
Tabuleiro com a agarose e o pente colocado na posição correta

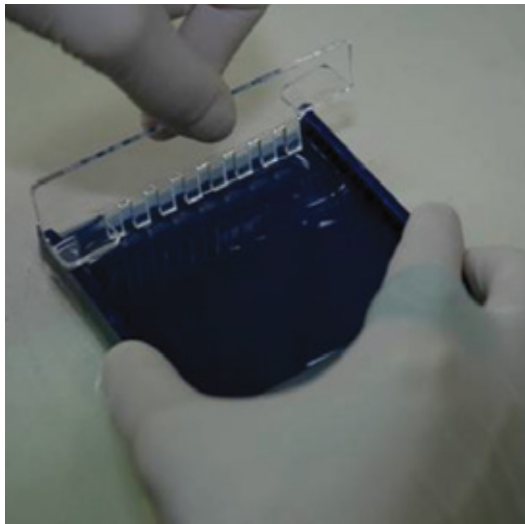


Figura 5
Retirar o pente do gel após solidificação (com uma das mãos segurar o tabuleiro e com a outra puxar o pente para cima, perpendicularmente ao gel).



Figura 6
Verter o tampão cuidadosamente para a tina



Figura 7
Gel totalmente coberto com tampão TBE-

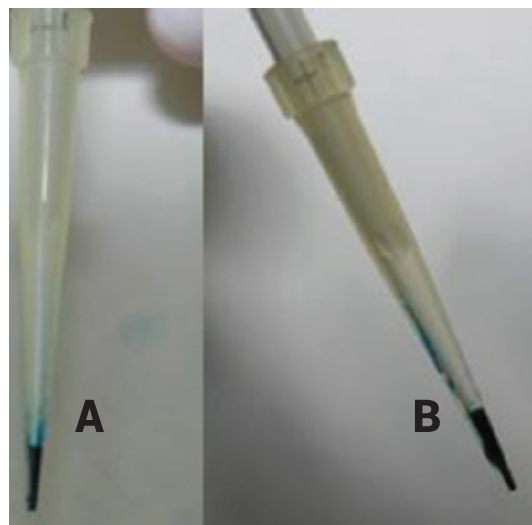


Figura 8
Pipeta com um volume de amostra de 5 μ L (A) e 10 μ L (B)

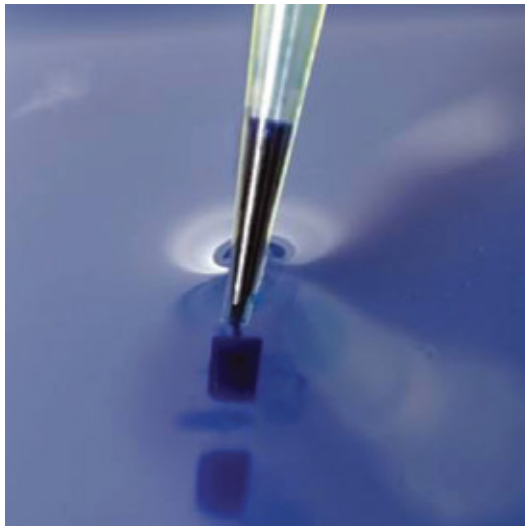


Figura 9
Aplicação da amostra num poço do gel



Figura 10
Ligação dos cabos e carregador à tina de eletroforese



Figura 11
Eletroforese a decorrer. Visualização de bolhas de gás a libertarem-se do eléctrodo.



Figura 12
Coloração do gel (aplicação do corante na tampa da tina). Pode ser feita, preferencialmente, num tabuleiro de vidro.

Nota: Os consumíveis necessários para a repetição das experiências, podem ser adquiridos através da Ordem dos Biólogos (sede.nacional@ordembilogos.pt).