

Biogénius

(kit para aulas práticas de Biologia Molecular no Ensino Secundário)

Manual do utilizador



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.



AGÊNCIA NACIONAL
PARA A CULTURA
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

ÍNDICE

| | |
|------------------------------|---|
| Índice | 1 |
| Introdução | 2 |
| Modo de utilização do manual | 3 |
| Conteúdos do kit | 4 |

| | | |
|---|----|-----|
| Índice | | 1 |
| Introdução | | 2 |
| Modo de utilização do manual | | 3 |
| Conteúdos do kit | | 4 |
| Experiência 1 | | 5 |
| Parte 1 - Extracção de DNA genómico | | 5 |
| Introdução | | |
| 5 | | |
| Material necessário | | 5 |
| Material | | |
| Opcional | 5 | |
| Protocolo | | |
| experimental | 6 | |
| Proposta de Experiência | | 8 |
| Experiência 2 (Conformação de Plasmídeos) | | 10 |
| Introdução | | |
| 10 | | |
| Material necessário | | 11 |
| Protocolo | | |
| experimental | 11 | |
| Resultados | | |
| Esperados | 11 | |
| Experiência 3 (CSI: Fraude canina?) | | 13 |
| Introdução | | |
| 13 | | |
| Material | | |
| Biológico | 14 | |
| Protocolo | | |
| Experimental | 14 | |
| Resultados | | |
| 14 | | |
| Perguntas | | 1 |
| 5 | | |
| Electroforese em gel de agarose | | 16 |
| Material Necessário | | 16 |
| Preparação | | da |
| Electroforese | 16 | |
| a) Preparação das Soluções | | 16 |
| b) Preparação do Gel | | 18 |
| c) Aplicação | | das |
| Amostras | 19 | |
| d) Condições | | de |
| Electroforese | 20 | |
| e) Coloração | | do |
| Gel | 21 | |
| Figuras | | 22 |
| Créditos e Contactos | | 32 |

Introdução

O kit Biogénus é o resultado de uma colaboração longa e frutuosa entre professores de Biologia do ensino secundário e investigadores da área da biologia molecular de diversas instituições, no âmbito de uma parceria com a Ordem dos Biólogos.

O principal objectivo foi o de fazer chegar aos professores um conjunto de materiais que lhes permitam realizar aulas práticas

O kit Biogénius é o resultado de uma colaboração longa e frutuosa entre professores de Biologia do ensino secundário e investigadores da área da biologia molecular de diversas instituições, no âmbito de uma parceria com a Ordem dos Biólogos.

O principal objectivo foi o de fazer chegar aos professores um conjunto de materiais que lhes permitam realizar aulas práticas direccionadas para o programa de Biologia do 12º ano, nomeadamente no capítulo da Biotecnologia, que sejam didácticas, motivadoras e que permitam a participação activa de todos os alunos.

A principal preocupação foi a de fazer chegar esse material a todas as escolas do país, permitindo que um docente possa realizar estas experiências independentemente de existirem ou não infraestruturas laboratoriais disponíveis (laboratórios, bancadas, equipamento, material descartável, etc.). Na realidade, para a realização de todas as experiências deste kit, um professor necessita apenas de água destilada e de um forno microondas ou pequeno fogão para banho-maria.

Adicionalmente, foi um objectivo deste projecto conceber um kit que proporcionasse à escola uma base de equipamento simples, eficaz e pouco dispendioso que possa ser utilizado ano após ano, num sistema aberto que possa ser utilizado com recargas disponíveis de reagentes ou material biológico preparado pelos professores.

O presente manual disponibiliza toda a informação para a realização das experiências. Para qualquer informação adicional desejada são disponibilizados contactos que podem funcionar como uma "help desk" para os docentes e formadores.

Este material foi testado em Escolas Secundárias de todo o país nos últimos dois anos por professores e alunos de Vinhais a Almodôvar, de Bragança a Faro. A todos os envolvidos, os nossos agradecimentos. Aos novos utilizadores, os nossos votos de sucesso.

José Matos
(coordenador do Projecto)

Modo de utilização do Manual

O presente kit inclui 3 experiências diferentes:

Experiência 1:

Parte 1 - Extracção de DNA genómico

Parte 2 - Proposta de Experiência: "O DNA parte-se?"

Experiência 2:

Conformação de plasmídeos

Experiência 3:

CSI: Fraude canina?

Experiência 3:

CSI: Fraude canina?

Para cada experiência são fornecidos protocolos detalhados que podem ser fornecidos directamente aos alunos ou adaptados pelo professor ao calendário de aulas particular.

Todas as experiências incluem um passo de electroforese em gel de agarose. A preparação do gel de agarose, soluções tampão, marcadores, coloração do gel, etc. são passos comuns a todas as experiências, pelo que é apresentada em separado.

Nas figuras são apresentadas diversas fotos ilustrativas dos vários processos, que podem auxiliar a compreensão das experiências.

São ainda fornecidas propostas de questionários para os alunos que, igualmente, poderão ser utilizadas como tal ou adaptadas às necessidades particulares.

CONTEÚDOS DO KIT:

- 1 Tubo com etanol (~20 mL)
- 1 Tubo com agarose (~4 g, suficiente para 400 ml, cerca de 16 géis de electroforese)
- 1 Tubo tampão TBE 10X (~40 mL, suficiente para 400 mL de solução 1X)
- 1 Saco de pontas de pipeta amarelas
- 1 Saco de microtubos tipo eppendorf
- 1 Seringa
- 5 Pilhas de 9V
- 1 Placa de Petri
- 1 Tina de electroforese
- 1 Pente para a tina
- 1 Tabuleiro para a tina
- 2 Cabos de ligação (preto e vermelho)
- 1 CD (com Manual de Instruções)
- 1 Caixa de reagentes contendo:

1 tubo de células bacterianas

- 2 Cabos de ligação (preto e vermelho)
- 1 CD (com Manual de Instruções)
- 1 Caixa de reagentes contendo:
 - 1 tubo de células bacterianas
 - 1 tubo Marcador (transparente, 50 µL)
 - 1 tubo DNA plasmídico digerido (verde, 35 µL)
 - 1 tubo DNA plasmídico (transparente, 35 µL)
 - 1 tubo DNA da mãe (cor-de-rosa; 35 µL)
 - 1 tubo DNA pai possível 1 (azul, 35 µL)
 - 1 tubo DNA pai possível 2 (amarelo; 35 µL)
 - 1 tubo DNA filho (verde; 35 µL)
 - 1 tubo corante (30 mg)
 - 1 tubo SDS 10% (em água; 800 µL)
 - 1 tubo tampão de aplicação (50 µL)

Experiência 1:

Parte 1 - Extração de DNA genómico

Introdução:

Nesta experiência os alunos terão possibilidade de visualizar DNA genómico com um grau de pureza substancialmente mais elevado do que aquele que normalmente fazem nas aulas, vulgarmente a partir de extractos de cebola, morango ou kiwi. Além disso, esta experiência não termina com a visualização do DNA. Os alunos poderão, posteriormente, analisar, manipular e visualizar o DNA através de electroforese em gel de agarose, utilizando este kit.

Para esta experiência foi utilizada uma estirpe de bactérias *E. coli*, (obviamente não patogénica), cultivada em meio líquido rico, com agitação moderada a 37 °C. Após 24 horas a cultura foi centrifugada a 10 000 rpm durante 10 minutos. As células recolhidas no fundo do tubo estão incluídas no kit (tubo "células bacterianas"). A extração poderá ser realizada previamente ou durante as aulas com os alunos.

(**Nota:** a segunda parte desta experiência pode ser também realizada com DNA extraído a partir de qualquer outro material biológico e/ou com métodos de isolamento alternativos, por exemplo o DNA extraído a partir de morango ou kiwi, pelos métodos rudimentares convencionais.)

Material necessário (enviado no kit):

- Tubo com "**Células bacterianas**" (tubo tipo Falcon de cerca de 20 mL)
- **SDS 10%** (sodium dodecil sulphate, dodecil sulfato de sódio, em água)
- **Tampão TE** (Tris-EDTA, Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0; EDTA a 1 mM)
- **Etanol** (EtOH)

Material opcional:

- Placa de Petri (enviada)
- Ponta de pipeta amarela (enviada)
- Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf (enviado)
- Pipeta de Pasteur de vidro (não enviada)

Protocolo experimental:

1. Recuperar as células em 2.5 mL do tampão TE

Material opcional:

- Placa de Petri (enviada)
- Ponta de pipeta amarela (enviada)
- Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf (enviado)
- Pipeta de Pasteur de vidro (não enviada)

Protocolo experimental:

1 - Ressuspender as células em 2,5 mL de tampão TE

Pipetar cerca de 2,5 mL de tampão TE para dentro do tubo (pode utilizar uma pipeta normal do laboratório ou medir com um copo de vidro pequeno, ou simplesmente verter metade do volume fornecido (~5 mL)), fechar o tubo com a tampa e ressuspender por inversão do tubo na mão várias vezes (alguns minutos) suavemente, até a suspensão ficar homogênea (Não agitar vigorosamente, o que provoca formação de espuma)

2 - Adicionar 300 µL de SDS

Utilizar a seringa e uma ponta amarela. Inverter como no passo anterior e deixar a incubar durante cerca de 20 minutos à temperatura ambiente, com agitação ocasional do tubo.

3 - Adicionar 5 mL de álcool

Adicionar etanol no dobro do volume do tampão TE (2 x 2,5 mL = 5 mL), agitar suavemente invertendo o tubo algumas vezes. Imediatamente se verá o DNA precipitado, de cor branca e aspecto viscoso.

NOTA: No passo de adicionar o etanol convém que todos os alunos prestem atenção, porque o surgimento do DNA precipitado é imediato. Se as células forem frescas, o DNA aparece num novelo. De as células forem velhas (mais de 1 mês) provavelmente o DNA aparece em flocos brancos dispersos.

4 - Retirar o DNA precipitado no tubo

O DNA deverá ser retirado do tubo com um material estéril. Ou com uma ponta de pipeta amarela (fornecida) ou com uma pipeta de Pasteur de vidro com a ponta previamente dobrada em forma de anzol num bico de Bunsen/lamparina (por exemplo).

Alternativamente, o conteúdo do tubo pode ser vertido para dentro da placa de Petri (fornecida) e daí retirado para um tubo de microcentrífuga novo.

5 – Evaporar o etanol ao ar

Já no tubo novo, este deve ser mantido aberto para deixar evaporar o etanol. Quando o DNA estiver seco, ressuspender em cerca de 100-250 µL de tampão TE e agitar suavemente até o DNA ficar totalmente dissolvido no tampão (a solução ficará bastante viscosa, tanto mais viscosa quando maior for a quantidade de DNA extraído).

Esse DNA pode ser recuperado do tubo e utilizado para um variado número de experiências. Aqui, em seguida, é proposta uma delas.

Parte 2 - Proposta de Experiência: "O DNA parte-se?"

Introdução

Esse DNA pode ser recuperado do tubo e utilizado para um variado número de experiências. Aqui, em seguida, é proposta uma delas.

Parte 2 - Proposta de Experiência: "O DNA parte-se?"

Introdução

O objectivo desta experiência é o de sujeitar o DNA a diferentes condições de armazenamento e analisar o seu efeito na integridade da molécula de DNA.

Material necessário:

- DNA extraído no passo anterior
- Tubos tipo eppendorf
- seringa
- pontas amarelas
- tampão de aplicação

Protocolo experimental:

O DNA recolhido no passo anterior deverá ser dividido por vários tubos, cada um distribuído a um grupo de alunos, ficando um dos tubos no laboratório da escola (por exemplo 5 grupos formados, dividindo o DNA extraído por 6 tubos, cada um com 30-50 µL cada um).

Cada grupo deverá levar o seu tubo de DNA para casa sujeitando-o a diferentes condições de armazenamento. Por exemplo:

- Grupo 1:** Armazenar o DNA no frigorífico a 4 °C
- Grupo 2:** Armazenar o DNA no congelador a -20 °C
- Grupo 3:** Abrir o tubo e adicionar-lhe umas gotas de saliva
- Grupo 4:** Submeter o DNA a alguns segundos no microondas
- Grupo 5:** Ferver o DNA durante alguns minutos em banho-maria

Alternativas:

- congelar e descongelar várias vezes;
- macerar um pouco do precipitado de DNA antes de o colocar em suspensão;
- ferver e depois colocar no gelo (versus ferver e não colocar no gelo).

NÃO ESQUECER: Deixar uma amostra de DNA no laboratório, sem submeter a qualquer processo, para utilização como controlo negativo.

Na aula seguinte, os alunos deverão trazer o seu tubo e identificar qual o "mau-tratamento" a que submeteram a amostra.

- 1 - De todas as amostras (aquelas trazidas de casa e o controlo) deve ser retirada uma fracção de cerca de 10 µL para um novo tubo e adicionado cerca de 5 µL de **tampão de aplicação** (líquido azul) para dar densidade e permitir a sua visualização, para posterior análise em electroforese em gel de agarose

(Ver Protocolo de: Electroforese em gel de agarose)

Resultados esperados: O DNA genómico, quando aplicado em

controle) deve ser retirada uma fração de cerca de 10 µL para um novo tubo e adicionado cerca de 5 µL de **tampão de aplicação** (líquido azul) para dar densidade e permitir a sua visualização, para posterior análise em electroforese em gel de agarose

(Ver Protocolo de: Electroforese em gel de agarose)

Resultados esperados: O DNA genómico, quando analisado em gel de agarose, aparece com um aspecto de "cauda de cometa", sendo a cauda tanto mais comprida e tanto mais baixa quanto maior for o grau de degradação do DNA. Assim, tratamentos mais violentos para o DNA irão desnaturá-lo e/ou fracturar a sua molécula em fragmentos mais pequenos, originando uma cauda que corre mais baixo no gel.

Experiência 2:

Conformação de plasmídeos

Introdução:

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular fechado, que se encontram em células de microrganismos (por exemplo bactérias e leveduras) e que têm capacidade de replicação autónoma (independente da replicação do DNA cromossómico do organismo). O seu tamanho é variável, podendo atingir centenas de milhares de bases (megaplasmídeos). Todavia, os plasmídeos que são utilizados como vectores de transporte de inserções de DNA estranho ("foreign DNA") para o interior das células têm normalmente uma dimensão muito pequena para facilidade de manipulação (2-5 kpb).

As três características principais de um plasmídeo para poder ser utilizado como vector são:

- Possuir uma origem de replicação que lhe permita replicar autonomamente (podem existir centenas de cópias de um plasmídeo numa célula).
- Possuir uma sequência única que seja reconhecida por uma dada enzima de restrição (para que seja possível cortar o DNA num único local, permitindo a linearização do DNA circular e posterior inserção do DNA estranho)
- Possuir um gene de selecção que permita diferenciar as células que incorporaram o plasmídeo daquelas que não o fizeram (normalmente um gene de resistência a um antibiótico. Deste modo, após a transformação, as células são plaqueadas em meio contendo esse antibiótico e apenas aquelas que se desenvolverem em colónias nesse meio terão incorporado o vector que lhes conferiu resistência)

Nesta experiência vamos utilizar, alternativamente, um de dois plasmídeos muito comuns em Biologia Molecular: pUC18 (ver mapa, Figuras 2 e 3) com 2686 pb (pares de bases) de comprimento OU pCR2.1 (ver mapa, Figura 4) com 3900 pares de bases.

Material necessário

- DNA plasmídico (tubo transparente)
- DNA plasmídico digerido (tubo verde)
- Marcador (tubo transparente)

Protocolo experimental:

São fornecidos no kit amostras de plasmídeo normal (DNA plasmídico, tubo branco) e plasmídeo digerido (DNA plasmídico digerido) tubo verde.

- Marcador (tubo transparente)

Protocolo experimental:

São fornecidos no kit amostras de plasmídeo normal (DNA plasmídico, tubo branco) e plasmídeo digerido (DNA plasmídico digerido) tubo verde.

A experiência consiste em calcular o tamanho aproximado do plasmídeo e analisar a sua conformação através de electroforese em gel de agarose (Ver abaixo: Electroforese em gel de agarose).

Para tal, os alunos terão que

- 1 -** Preparar uma electroforese em gel de agarose (ver protocolo)
- 2 -** Aplicar uma amostra de cada um dos plasmídeos (digerido e não digerido) em pistas diferentes e uma amostra de marcador num poço adjacente
- 3 -** Separar os fragmentos por electroforese
- 4 -** Corar o gel
- 5 -** Avaliar o peso molecular do plasmídeo por comparação com o peso molecular das bandas (conhecidas) do marcador (ver figuras 5 e 19).
- 6 -** Explicar a existência de várias bandas no plasmídeo não digerido

Resultados esperados:

Marcador:

O marcador é constituído por 3 bandas (ver foto 5) de 3000, 1000 e 500 pares de bases, respectivamente. Em alguns casos será ainda visível uma 4 banda de cerca de 2000 pares de bases.

O DNA plasmídico digerido (linearizado) apresentará uma banda única situada entre as bandas do marcador de 3000 e de 1000 pb, revelando que o plasmídeo terá um tamanho próximo dos 2500 (caso o kit contenha pUC18) OU acima da banda de 3000 pb, revelando que o plasmídeo terá um tamanho próximo dos 4000 (caso o kit contenha pCR2.1). Numa versão mais sofisticada poderão medir as distâncias de migração das bandas do marcador, fazer uma representação gráfica em papel semi-logarítmico entre os pesos moleculares e a distância de migração, calcular a distância de migração do plasmídeo e extrapolar o seu tamanho de uma forma mais aproximada.

Todavia, o plasmídeo "normal" (não digerido) apresentará várias bandas, nenhuma delas próximo da banda respectiva do plasmídeo linearizado (2600 pb/4000 pb). Uma(s) estarão mais acima, outra(s) mais abaixo. Porquê?

A razão tem a ver com o facto de o plasmídeo não digerido não se comportar no gel de modo igual a um fragmento linearizado. Na verdade, o plasmídeo (DNA circular fechado) pode tomar várias conformações distintas, desde a sua forma mais relaxada até à forma enrolada ou super-enrolada (supercoiled). (Ver figura 19). Na forma relaxada terá mais dificuldade de atravessar a malha da agarose, por isso formará uma banda mais acima do gel (mais próxima do poço). Na conformação super-enrolada, migrará mais facilmente do que a forma linearizada, originando banda(s) mais abaixo.

A razão tem a ver com o facto de o plasmídeo não agindo não se comportar no gel de modo igual a um fragmento linearizado. Na verdade, o plasmídeo (DNA circular fechado) pode tomar várias conformações distintas, desde a sua forma mais relaxada até à forma enrolada ou super-enrolada (supercoiled). (Ver figura 19). Na forma relaxada terá mais dificuldade de atravessar a malha da agarose, por isso formará uma banda mais acima do gel (mais próxima do poço). Na conformação super-enrolada, migrará mais facilmente do que a forma linearizada, originando banda(s) mais abaixo.

Experiência 3:

CSI: Fraude canina?

Introdução:

Esta experiência pretende ser uma introdução à área do "DNA fingerprinting" e da utilização de marcadores genéticos em ciências forenses, através dos quais é possível identificar/excluir um potencial suspeito.

Aproveitando a popularidade das séries televisivas norte-americanas CSI Miami/CSI NY, etc., podem designar este trabalho como CSI Lisboa, CSI Mogadouro, etc.

Tentando afastar a utilização de casos (hipotéticos) humanos, foi criada a seguinte situação:

O Sr. Alão comprou um cão a um criador de uma raça muito apreciada. Querendo um animal de grande qualidade, sem olhar a custos, pediu ao criador que lhe vendesse o melhor cão da sua exploração.

O criador vendeu-lhe um cão garantindo que o pai era um cão da sua exploração, campeão nacional em exposições.

Imensamente feliz, o Sr. Alão levou para casa um belo cachorro que em breve se desenvolveu num cão adulto nada parecido com o seu pai, sem aquele porte altivo nem características de campeão.

Admitindo a hipótese de ter sido ludibriado, o Sr. Alão voltou à exploração, recolheu amostras de pêlo da mãe, do alegado pai, campeão, mas também de um outro macho adulto daquela raça que partilhava o canil, e que poderia muito bem ser ele o verdadeiro pai, pois não partilhava as características de porte e pujança do afamado cão e tinha fortes semelhanças com o animal adquirido.

Tendo assim amostras de pêlo dos dois putativos pais, da mãe e do filho (o seu próprio cão), o Sr. Alão pediu a um geneticista molecular que corresse uma bateria de testes com marcadores genéticos, que permitissem identificar a paternidade do seu animal.

No laboratório, os técnicos extraíram DNA dos pêlos de cada um dos animais (em extracções totalmente separadas, de modo a evitar cruzamento das amostras), e amplificaram, pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction/Reacção da Polimerase em Cadeia) um fragmento específico de canídeos (e bastante polimórfico) que pode originar dois alelos diferentes (heterozigotia) ou iguais (homozigotia) em cada um dos indivíduos.

Os produtos dessas amplificações estão agora nas vossas mãos para poderem analisar por electroforese em gel de agarose (ver protocolo: Electroforese em gel de agarose) a eventual paternidade dos indivíduos analisados.

Material biológico:

em cada um dos indivíduos.

Os produtos dessas amplificações estão agora nas vossas mãos para poderem analisar por electroforese em gel de agarose (ver protocolo: Electroforese em gel de agarose) a eventual paternidade dos indivíduos analisados.

Material biológico:

| | |
|-----------------------|---------------------|
| DNA da mãe | (tubo cor-de-rosa) |
| DNA do pai possível 1 | (tubo azul) |
| DNA do pai possível 2 | (tubo amarelo) |
| DNA do filho | (tubo verde) |
| Marcador | (tubo transparente) |

NOTA: Os DNAs já vêm com tampão de aplicação (azul) pelo que só é necessário aplicar as amostras no gel, a partir dos tubos indicados acima.

Protocolo experimental:

- 1** - preparar uma electroforese em gel de agarose (ver protocolo)
- 2** - aplicar uma amostra (10 μ L) de cada um dos materiais biológicos fornecidos (Mãe, pai 1, pai 2, filho) em pistas diferentes e uma amostra de marcador num poço adjacente
- 3** - Separar os fragmentos por electroforese
- 4** - Corar o gel
- 5** - Registar as bandas.
- 6** - Analisar os resultados

Resultados:

Para facilidade, diremos que tanto a mãe como um dos pais putativos são homozigóticos para este marcador, pelo que só apresentam uma banda. O filho será heterozigótico, apresentando duas bandas. Uma vinda da mãe e outra do pai. Como há certeza sobre a mãe, uma das bandas do filho será automaticamente identificada. O outro alelo (a outra banda) terá que vir do pai. Falta então identificar qual dos potenciais pais possui um alelo igual ao do filho.

Tendo a mãe dois alelos de 1000 pares de bases (homozigótica), o filho terá obrigatoriamente esse fragmento. O filho terá outro fragmento de 600 pb. Como apenas um dos possíveis pais possui a banda de 600 pb, esse pai é compatível com a paternidade. O outro NÃO pode ser o verdadeiro pai, uma vez que é homozigótico para a banda a 3000 pb, não tendo o filho nenhuma banda desse tamanho.

O professor seleccionará qual das situações deseja contemplar:

Ausência de fraude: o campeão nacional é o pai verdadeiro

Presença de fraude: o campeão nacional não é o pai verdadeiro

Perguntas:

- Dos quatro intervenientes, quais são homozigóticos e quais são heterozigóticos?
- Qual dos dois pais poderá ser excluído?
- Podemos dizer que o outro cão é de certeza absoluta o pai?

- Questões:
- Dos quatro intervenientes, quais são homozigóticos e quais são heterozigóticos?
 - Qual dos dois pais poderá ser excluído?
 - Podemos dizer que o outro cão é de certeza absoluta o pai?
 - Em relação ao animal que foi excluído, podemos dizer que, de certeza absoluta, não é ele o pai?

As questões acima destinam-se a contemplar a seguinte situação, comum a todos os testes de genotipagem:

Se o filho não tem um perfil compatível com a paternidade, então podemos afirmar, com toda a certeza, que aquele possível pai **NÃO PODE** ser o verdadeiro pai.

Todavia, se o filho tem um perfil compatível com a paternidade, é apenas essa afirmação que pode ser feita. Ou seja, que "este animal **PODE SER** pai daquele cão", não sendo possível garantir que o seja, porque qualquer outro cão com aquele perfil compatível poderia ser o verdadeiro pai. Apenas em populações confinadas no espaço (por exemplo peixes num aquário, bovinos numa vacaria, etc.), sem hipóteses de contacto com o exterior e em que tenham sido genotipados **TODOS** os machos em idade de reprodução, apenas nesse caso se poderia afirmar que aquele pai seria o único pai possível.

Electroforese em gel de agarose

NOTA: O tabuleiro e o pente da tina de electroforese estão cobertos por uma película aderente para protecção do plástico (branca com ou sem letras no caso dos tabuleiros e verde no caso dos pentes). Essa película **DEVE SER REMOVIDA** antes da utilização destes componentes)

Material necessário:

Para a tina de electroforese:

Tina (com tampa)
Tabuleiro
Pente
Eléctrodos (fio vermelho e fio preto)
5 pilhas de 9 V
Fita cola (não fornecida)

Para as soluções:

Tampão TBE (10x)
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 (1, 2 e 3)

Preparação da electroforese:

- a) Preparação das soluções

Seringa
Pontas amarelas
DNA das experiências anteriores (1, 2 e 3)

Preparação da electroforese:

a) Preparação das soluções

O gel de agarose tem que ser preparado em tampão TBE a 0,5 x. O tampão fornecido vem concentrado 10 x, portanto terá que ser diluído 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. 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. Mas podem preparar logo uma maior quantidade (por exemplo, 500 mL). Se a água tiver boa qualidade e for estéril, a solução pode manter-se estável durante longos períodos. O tampão enviado está concentrado 10 x. Para uma solução de 0,5 x pode proceder-se à seguinte diluição:

Tampão TBE:

| | |
|-------------------------------|---------------|
| Tampão TBE 10 X | 20 mL |
| <u>Água destilada estéril</u> | <u>380 mL</u> |
| Volume final | 400 mL |

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.

Agarose

A solução de agarose deve ser preparada em tampão TBE 0,5 x (NOTA: não preparar a agarose no TBE 10X fornecido. Diluir primeiro o tampão como acima descrito)

Para os trabalhos presentes a agarose deve ser preparada sempre na concentração de 1%:

1,0% de agarose (p/v) (1 g de agarose/100 mL de tampão TBE 0,5x)

Preparação da solução de agarose a 0,5%

- Pese 1 g de agarose e dissolva em 200 mL de tampão TBE 0,5X num frasco com rolha hermética.
- Agitar para diluir um pouco.
- Colocar no microondas por períodos curtos (15 segundos de cada vez),
- Agitar novamente
- Repetir a operação (15 s no microondas + agitação até a solução ficar TOTALMENTE transparente.

(NOTA: Se existirem ainda grãos de agarose não dissolvidos, o gel não ficará homogêneo após solidificação, prejudicando a separação dos fragmentos de DNA)

- Colocar no microondas por períodos curtos (15 segundos de cada vez),
- Agitar novamente
- Repetir a operação (15 s no microondas + agitação até a solução ficar TOTALMENTE transparente.

(NOTA: Se existirem ainda grãos de agarose não dissolvidos, o gel não ficará homogêneo após solidificação, prejudicando a separação dos fragmentos de DNA)

Preparação do corante do gel (Nile Blue):

O corante do gel é fornecido em pó dentro de um tubo identificado como "corante". Para se preparar a solução, todo o conteúdo do tubo (40 mg) deverá ser dissolvido em 200 mL de água (a água mais pura disponível, de preferência estéril) (concentração final: 0,02%, ou seja, 0,02 g/100 mL de água).

A solução deverá ser agitada até todo o corante estar bem dissolvido.

A solução DEVE SER OBRIGATORIAMENTE armazenada no escuro (utilizar um frasco de vidro escuro, envolver o frasco com papel de alumínio e guardar num armário com porta), porque o corante se degrada na presença de luz.

A solução corante é reutilizável. Após corar um gel, a solução deverá ser novamente colocada no frasco e armazenada até nova coloração.

b) Preparação do gel:

- Vedar com fita-cola os dois lados abertos do tabuleiro do gel (azul) que vem dentro da tina.
- Colocar o tabuleiro numa bancada plana (certificar que o tabuleiro fica totalmente horizontal, nivelado, para que o gel não fica mais grosso de um lado e mais fino do outro).
- Verter para o tabuleiro cuidadosamente (devagar e sem deixar formar bolhas) cerca de 40 mL de agarose fundida e arrefecida até cerca de 45-50 °C (quando já conseguir segurar o frasco da agarose nas mãos, sem se queimar).
- Colocar imediatamente o pente cerca de 1 cm de distância do fundo do tabuleiro e completamente paralelo ao fundo do tabuleiro (ver figura 7)*.
- Aguardar cerca de 30 minutos, até o gel estar totalmente solidificado.
- Remover o pente para cima, perpendicularmente, com cuidado para não destruir os poços.
- retire cuidadosamente a fita-cola, mantendo o tabuleiro na horizontal, e coloque o gel com o tabuleiro dentro da tina, com os poços para o lado do eléctrodo preto.
- Verter, cuidadosamente, tampão TBE 0,5x para dentro da tina até cobrir todo o gel de tampão e o nível deste atingir cerca de 1 mm acima do gel. NOTA: todos os poços do gel deverão ficar cheios de tampão

*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 mL de gel para dentro do tabuleiro

c) Aplicação das amostras:

NOTA: Antes de aplicar as amostras coloque a tina com o gel no

*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 mL de gel para dentro do tabuleiro

c) Aplicação das amostras:

NOTA: Antes de aplicar as amostras coloque a tina com o gel no local da bancada onde a electroforese vai decorrer. Após a aplicação das amostras a tina não deverá ser tocada nem movida.

O volume das amostras a aplicar não deve exceder 10 μ L por poço, 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. Os poços devem ser numerados de 1 a 8, num esquema no papel.

Exemplo:

1 2 3 4 5 6 7 8

- 1 -
- 2 - Marcador
- 3 - DNA congelado (grupo 1)
- 4 - DNA fervido (grupo 2)
- 5 - DNA armazenado a 4 °C (grupo 3)
- 6 - DNA incubado com saliva (grupo 4)
- 7 - DNA sujeito a microondas (grupo 5)
- 8 -

Se tiver que aplicar 8 amostras, pode utilizar todos os poços. Se possuir apenas até 6 amostras para aplicar, deverá evitar utilizar os poços das extremidades (poços 1 e 8) por serem aqueles em que as amostras migram de forma menos homogénea.

Se tiver um número menor de amostras (por exemplo na experiência dos plasmídeos têm apenas 3 amostras) podem deixar um poço de intervalo entre as amostras, para evitar que uma amostra verta de um poço para o do lado e contamine as amostras dos poços adjacentes.

ATENÇÃO: após a colocação das amostras não deve mover a tina.

d) Condições de electroforese:

Após preparação do gel e colocação das amostras:

- Colocar a tampa na tina
- Ligar os eléctrodos (preto ao pólo negativo das pilhas; vermelho ao pólo positivo)
- Verificar se há passagem de corrente (nos eléctrodos, deverão começar a libertar-se umas pequenas bolhas de gás, mais do lado dos poços que do lado oposto)
- Deixar a electroforese decorrer até à frente azul escura do corante chegar a cerca de 1 cm do final do gel (cerca de 3-8 horas, dependendo da espessura do gel, do estado das baterias e da qualidade da água utilizada)
- Desligar os eléctrodos
- Retirar o gel cuidadosamente e fazê-lo deslizar do tabuleiro da tina para um recipiente adequado, preferencialmente de vidro. Em alternativa utilizar a tampa

- Deixar a electroforese decorrer até à frente azul escura do corante chegar a cerca de 1 cm do final do gel (cerca de 3-8 horas, dependendo da espessura do gel, do estado das baterias e da qualidade da água utilizada)
- Desligar os eléctrodos
- Retirar o gel cuidadosamente e fazê-lo deslizar do tabuleiro da tina para um recipiente adequado, preferencialmente de vidro. Em alternativa utilizar a tampa da tina como recipiente de coloração.

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

e) Coloração do gel

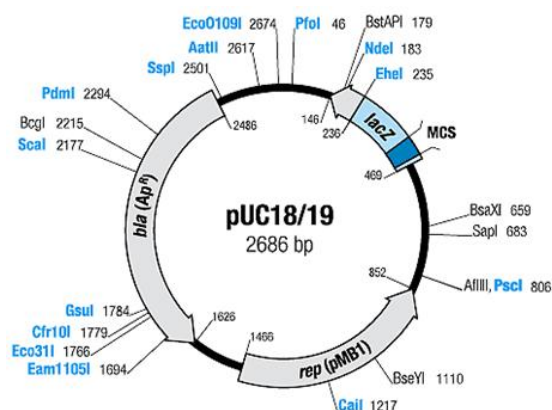
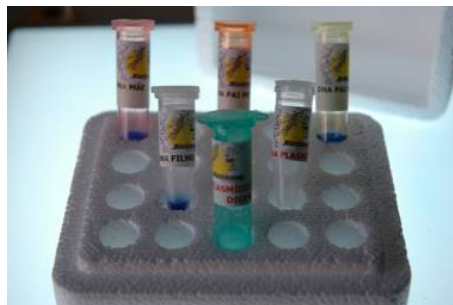
- Colocar o gel num recipiente adequado após electroforese. Preferencialmente, o recipiente deverá ser um tabuleiro de vidro, pouco maior que o gel, mas com uma profundidade que permita cobrir o gel totalmente com o corante.
- Cobrir o gel **TOTALMENTE** com corante (Nile Blue) preparado como descrito anteriormente (ver, Preparação do corante para gel)
- Deixar a corar (mínimo 60 minutos) com agitação ocasional. **(Os melhores resultados são obtidos com coloração durante a noite. Assim, desejavelmente a electroforese deve ser corrida num dia, o gel deixado a corar durante a noite e visualizado no dia seguinte).**
- 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.
- Retirar o corante e vertê-lo novamente para o frasco de armazenamento do corante (o corante é reutilizável. Pode corar muitos géis).
- As bandas são melhor visualizadas colocando o gel sobre um papel branco ou, de preferência, sobre uma superfície branca iluminada por baixo.

Figuras



Figura 1: Composição do kit (Imagem adaptada da revista National Geographic (Portugal), Nº Fevereiro 2008):

- 1 - Pilhas (5 x 9 V = 45 V) para funcionar como fonte de alimentação
- 2 - Células bacterianas para extracção de DNA
- 3 - Tampão TBE/Etanol (ver rótulo)
- 4 - Agarose (em pó)
- 5 - CD com informação e protocolos
- 6 - Pontas amarelas para pipeta
- 7 - Placa de Petri (esterilizada por radiação)
- 8 - Tubos tipo Eppendorf
- 9 - Seringa graduada (para usar como pipeta)
- 10 - Caixa com reagentes (corantes, etc.) e material biológico (DNAs, etc.)
- 11 - Cabos de ligação entre a tina e a fonte de alimentação
- 12 - Tina de electroforese
- 13 - Tabuleiro para o gel (com pente ao centro)



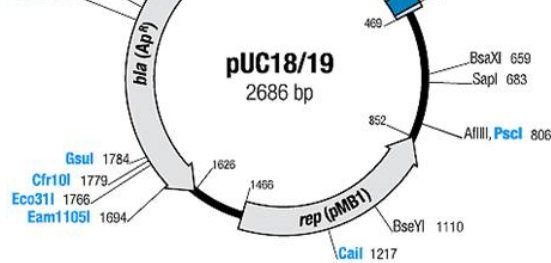


Figura 2: Mapa do plasmídeo pUC18*. O plasmídeo (DNA circular fechado) possui 2686 pares de bases de comprimento. Possui uma origem de replicação (*rep* (pMB1)); um gene de resistência a um antibiótico (ampicilina, *bla* (Ap^R)), e um sítio de clonagem múltiplo (MCS, multiple cloning site, ver pormenor da Figura abaixo).

ATCC 37253

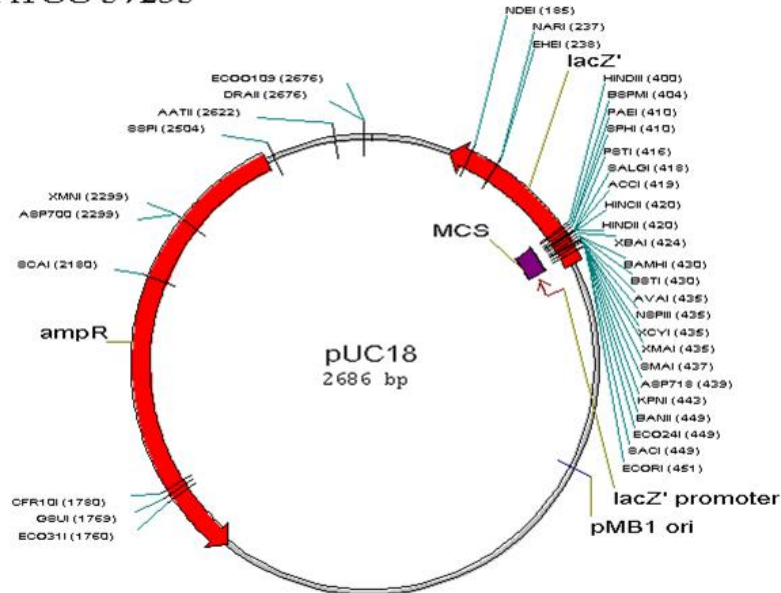
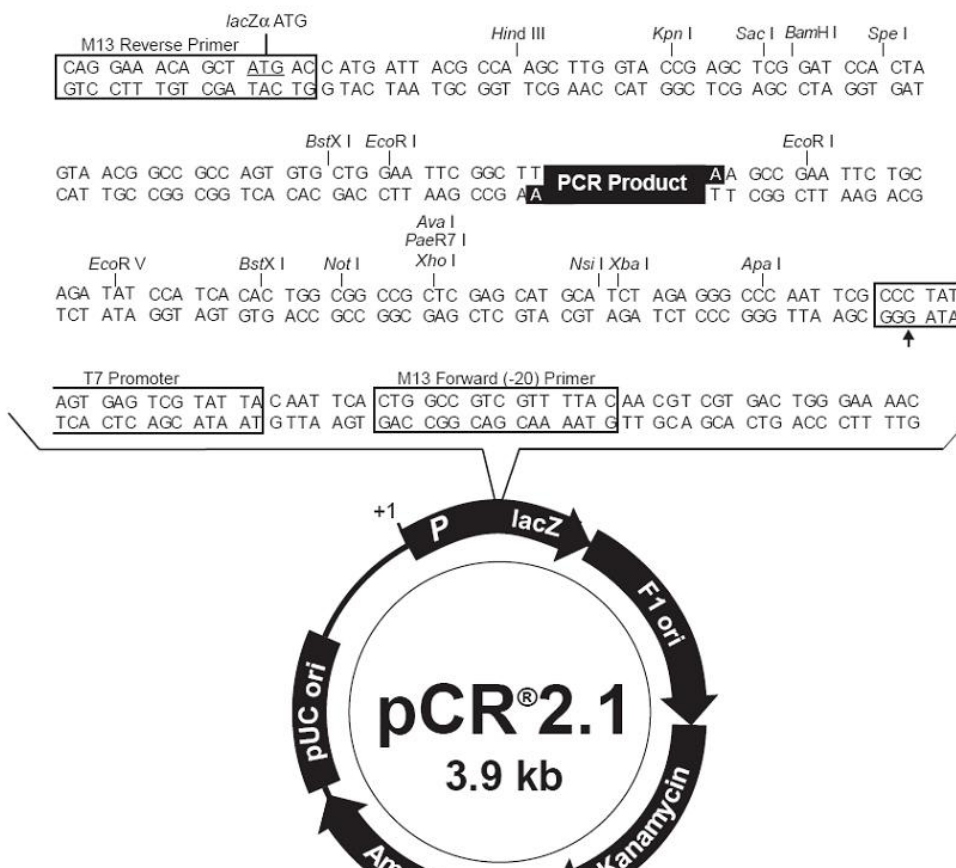
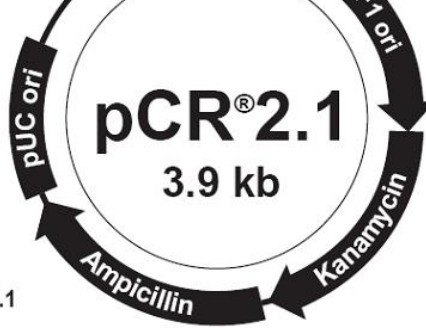


Figura 3: Pormenor do Sítio de Clonagem Múltiplo do plasmídeo pUC18: sequência que é reconhecida por várias endonucleases (*EcoRI*, *HindIII*, etc.) que só clivam o plasmídeo num sítio único (linearizam).

*Normalmente os plasmídeos são sintetizados aos pares (p.ex. pUC18/pUC19, o que significa que o MCS, a zona de clonagem que reconhece várias enzimas de restrição, pode estar na orientação 2'->5' (pUC18) ou na orientação inversa (pUC19).





Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

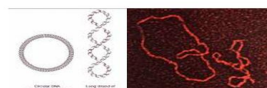
LacZ α gene: bases 1-545
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 T7 promoter: bases 362-381
 M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
 f1 origin: bases 546-983
 Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
 Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
 pUC origin: bases 3134-3807

Figura 4: Mapa do plasmídeo pCR2.1 com 3900 pares de bases de comprimento, possuindo a origem de restrição do pUC, genes de selecção de resistência a dois antibióticos (ampicilina e canamicina) e um sítio múltiplo de clonagem.



Figura 5: Ilustração do marcador fornecido contendo 3 bandas que variam entre 500 e 3000 pares de bases.

(a) 1 2 1 (b) 2



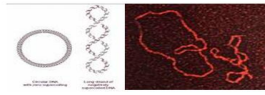


Figura 6: Ilustração esquemática (a) e em microscopia electrónica de varrimento (b) do plasmídeo na sua forma relaxada (1) e super-enrolada (supercoiled) (2).

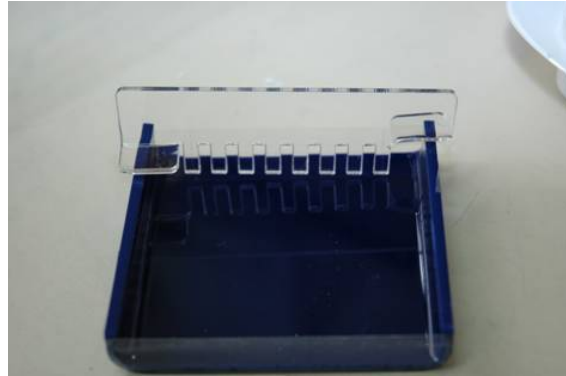


Figura 7: Tabuleiro selado com fita-cola e com o pente colocado na posição correcta



Figura 8: Solução de Agarose (1%) fundida no microondas

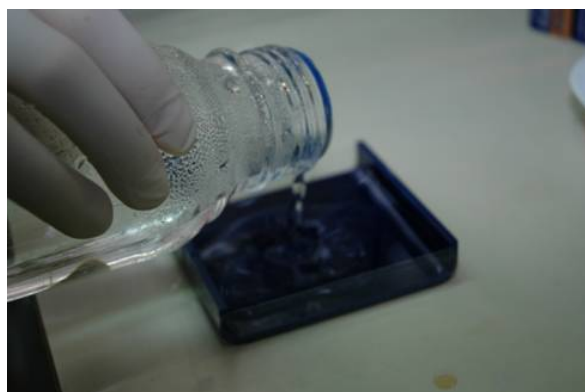


Figura 9: Verter a agarose cuidadosamente no tabuleiro (a agarose foi deixada arrefecer até cerca de 45 °C)





Figura 10: Tabuleiro com a agarose e o pente colocado na posição correcta

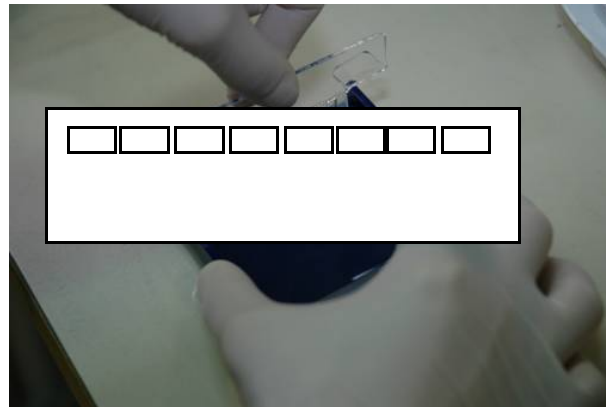


Figura 11: Retirar o pente do gel após solidificação (com uma das mãos segurar o tabuleiro e com a outra puxar o pente para cima, perpendicularmente ao gel).



Figura 12: Verter o tampão cuidadosamente para a tina



Figura 13: Gel totalmente coberto com tampão TBE-

(A) (B)



Figura 13: Gel totalmente coberto com tampão TBE-

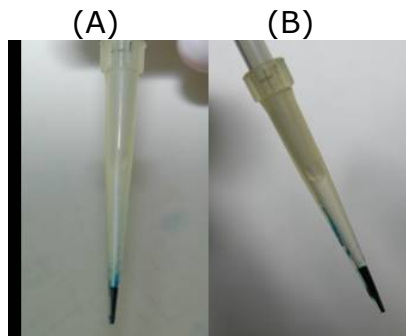


Figura 14: Pipeta com um volume de amostra de 5 μL (A) e 10 μL (B)

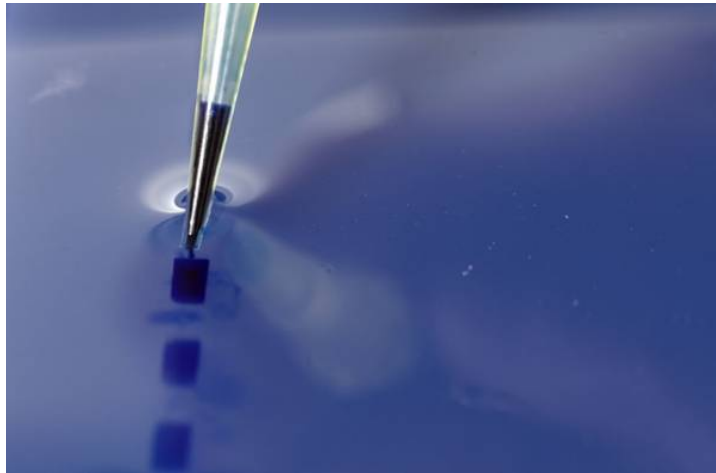


Figura 15: Aplicação da amostra num poço do gel



Figura 16: Sistema de electroforese montado. Electroforese a decorrer



Figura 17: Electroforese a decorrer. Visualização de bolhas de gás a libertarem-se do eléctrodo.



Figura 17: Electroforese a decorrer. Visualização de bolhas de gás a libertarem-se do eléctrodo.



Figura 18: Coloração do gel (aplicação do corante na tampa da tina. Pode ser feita, preferencialmente, num recipiente (tipo tabuleiro) de vidro).

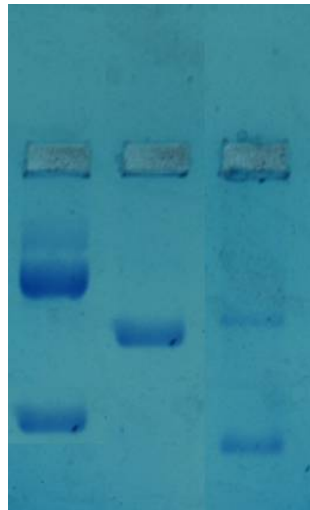


Figura 19: resultado de uma electroforese da Experiência 2, com o plasmídeo pUC18 (2,6 kpb)

ND = Não digerido

D = Digerido

M = Marcador

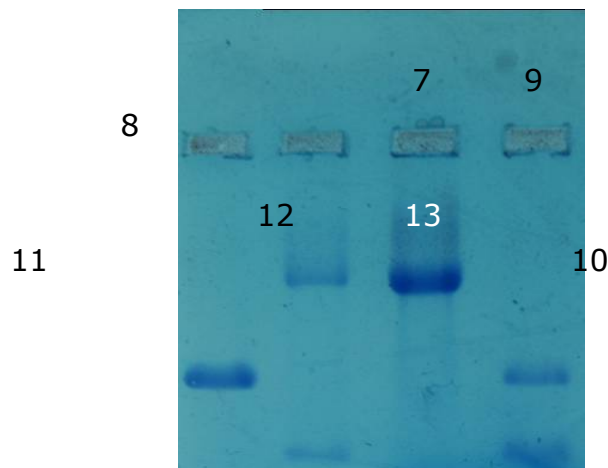
L – Forma linearizada do plasmídeo

SE – Forma super-enrolada do plasmídeo

R – Forma relaxada do plasmídeo

NOTA: A banda do plasmídeo pUC18 situa-se entre as bandas de 3000 e de 1000 pb, indicando um tamanho de cerca de 2700 pb (tamanho real, 2686 pb). Por este método os alunos podem identificar que se trata de um plasmídeo pUC18 e não o pCR2.1, no qual a banda do plasmídeo linearizado se situaria acima da banda de 3000 pb.

4
1
Figura 20: Resultado de uma electroforese de DNA (Experiência 3 (Fraude Canina))
3 2 5 6



Legenda:

M = Mãe;
P1 = Pai possível 1;
P2 = Pai possível 2;
F = Filho

O filho é heterozigótico com dois alelos diferentes (1000 pb e 600 pb). Uma das bases vem da mãe, que é homozigótica (1000 pb), logo o alelo de 600 pares de bases só pode vir do Pai 1, porque o Pai 2 não tem esse alelo.

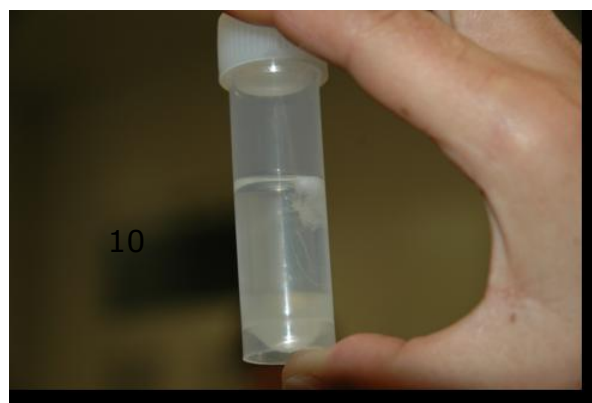


Figura 21: Aspecto do DNA precipitado (experiência 1)

CRÉDITOS

Este trabalho foi financiado pelo **Programa Ciência Viva6** e teve o apoio das seguintes Instituições e colaboradores, sem os quais não teria sido possível a sua realização.

- Ordem dos Biólogos** – Doutor Pedro Lourenço
- Escola Secundária da Amadora (Amadora) – **Prof^a. Maria dos Prazeres Cardoso Amaral Fragoeiro**
- Escola Secundária Fernando Lopes Graça (Parede) - **Prof^a Joana Capucho**
- Escola Secundária Ibn Mucana (Alcabideche) – **Prof^a Ana Maria Queiroz de Macedo**
- Escola Secundária José Saramago (Mafra) – Prof. Pedro Passos e

Ordem dos Biólogos – Doutor Pedro Lourenço
Escola Secundária da Amadora (Amadora) – **Prof^a. Maria dos Prazeres Cardoso Amaral Fragoeiro**

Escola Secundária Fernando Lopes Graça (Parede) - **Prof^a Joana Capucho**

Escola Secundária Ibn Mucana (Alcabideche) – **Prof^a Ana Maria Queiroz de Macedo**

Escola Secundária José Saramago (Mafra) – Prof. Pedro Passos e e Prof. Martinho Rangel

Escola Secundária Padre Alberto Neto (Queluz) – Prof^a Manuela Moura Lopes

Escola Secundária Stuart de Carvalhais (Massamá) – Prof^a Ana Morais, Prof^a Ângela Neves e Prof. Jorge Fernandes

INETI (Inst. Nac. Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P.) – Grupo de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia

Coordenador: José Matos

Investigadores: Fernanda Simões; Paula Sá Pereira; João Mascarenhas (design)

Técnicos de Investigação: Diogo Mendonça, Carla Borges, Mafalda Possante.

CONTACTOS:

Para dúvidas técnicas e para aquisição de novos kits, seus componentes ou reagentes em separado:

José Matos

e.mail: jose.matos@iniav.pt; Telefone: 214 463 783