



CIIMAR

Curso de formação

Preparação de amostras para análises moleculares

Formadores: Catarina Magalhães,
Filipe Pereira,
Virgínia Cunha

Manual do Curso

Índice

Objectivos.....	2
Plano de Organização	3
Protocolos e Material de Apoio.....	4
Alguns Resultado.....	8
Anexos.....	13

Índice de Figuras

Figura 1: RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (<i>Danio rerio</i> , resultados grupo 1).	8
Figura 2: RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (<i>Danio rerio</i> , resultados grupo 2).....	8
Figura 3: RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (<i>Danio rerio</i> , resultados grupo 1).....	9
Figura 4: DNA total extraído a partir de amostras de sedimento, de água estuarina, macroalgas (<i>Ulva lactuca</i>) e tecido de peixe (<i>Danio rerio</i>) e produto de amplificação do gene 16S rRNA; resultados grupo 1.....	10
Figura 5: DNA total extraído a partir de amostras de sedimento, de água estuarina, macroalgas (<i>Ulva lactuca</i>) e tecido de peixe zebra (<i>Danio rerio</i>); resultados grupo 2.....	10
Figura 6: DNA total extraído a partir de amostras de sedimento e de água estuarina e produto de amplificação do gene 16S rRNA; resultados grupo 3	11
Figura 7: Exemplo de resultados de quantificação de expressão génica por PCR em tempo real a partir do RNA extraído de amostras de tecido de peixe (<i>Danio rerio</i>).....	12

Objectivos

1 - Compreender as metodologias necessárias à **colheita, conservação e preparação** das amostras de diferentes matrizes para análises moleculares (DNA / RNA).

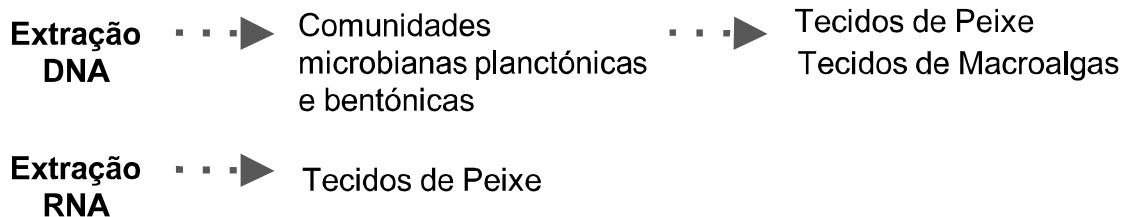
Sedimentos

Água

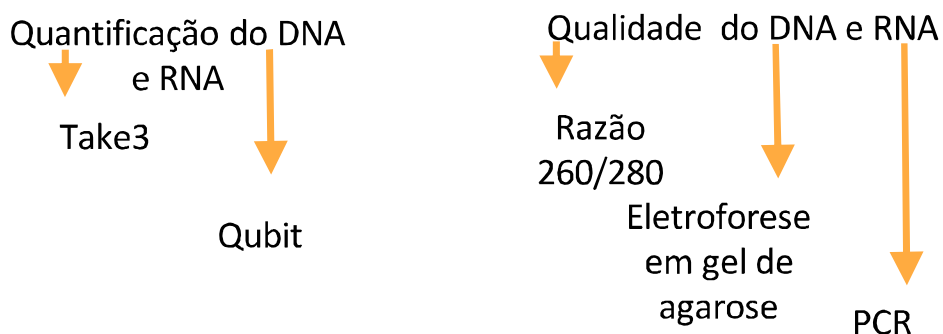
Peixes

Macroalgas

2 - Compreender as metodologias de extracção de DNA/RNA de tecidos animais e vegetais bem como de comunidades microbianas planctónicas e bentónicas.



3 - Compreender as metodologias de controlo de **qualidade** e de **quantificação** do DNA e RNA



4 - Conhecer exemplos de aplicações da utilização de técnicas de Biologia Molecular, para a avaliação dos recursos naturais.

a) avaliação da expressão de genes biomarcadores da exposição a contaminantes

Extracção RNA . . . ► Síntese de cDNA . . . ► qPCR

b) identificação de espécies aquáticas

Extracção DNA . . ► Água / Sedimento . . ► Identificação espécies microbianas

Extracção DNA . . ► Tecidos Peixe . ► Identificação da espécie

Plano de Organização

Módulo 1:

Preparação de amostras bentónicas
Extracção DNA de amostras complexas
Avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído.

Módulo 2:

Extracção de DNA de amostras de tecidos de peixes e macroalgas marinhas.
Avaliação da quantidade e qualidade do DNA extraído.

Módulo 3:

Extracção de RNA de amostras de tecidos de peixes
Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído
Síntese de cDNA.

Protocolos e Material de Apoio

Módulo 1:

1. Colheita e filtração amostras comunidades microbianas planctónicas e bentónicas

Protocolo: Ocean Sampling Day Handbook

[https://www.microb3.eu/sites/default/files/osd/OSD Handbook June 2015.pdf](https://www.microb3.eu/sites/default/files/osd/OSD_Handbook_June_2015.pdf)

Water Column Prokaryotic Genomics.docx (Anexo 1)

Vídeos

Colheita e filtração amostras comunidades microbianas planctónicas

<https://www.youtube.com/watch?v=yUm7SsSe-cw>

<https://www.youtube.com/watch?v=5vpKlkzusE8>

2. Extracção de DNA de amostras planctónicas e bentónicas complexas

Protocolos:

Coluna de água filtros de membrana – “Water DNA Isolation Kit. Mobio”

<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/14900-S.pdf>

Coluna de água filtros Sterivex – “Water DNA Sterivex Isolation Kit”

<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/14600-S.pdf>

Sedimentos/Solos – “Soil DNA Isolation Kit”

<https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>

Vídeos

Extracção DNA “PowerSoil DNA Isolation Kit

<https://www.youtube.com/watch?v=v4ggmR1b0pU>

3. Avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído.

3.1 Gel de Agarose Electroforese

Protocolo: Gel de Agarose para Electroforese.docx (Anexo 2)

Vídeo: <https://www.youtube.com/watch?v=mN5lvS96wNk>

3. Avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído.

3.2 Amplificação do 16S rRNA por PCR

Protocolo: PCR-Protocolo.docx (Anexo 3)

Vídeos: <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

<https://www.youtube.com/watch?v=DkT6XHWne6E>

3.3 Quantificação do DNA

Protocolo: Qubit dsDNA BR/HS Assay

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf

<http://themurderofmeredithkercher.com/docupl/spublic/filelibrary3/docs/manuals/2015-02-16-Manual-Qubit-dsDNA-HS-Assay-Kit-Manual.pdf>

Para mais informações contactar: Catarina Magalhães cmagalhaes@ciimar.up.pt

Protocolos e Material de Apoio

Módulo 2:

4. Extração de DNA de Tecidos animais

Protocolo: Extração de DNA – Método de Fenol-Clorofórmico
Tecidos animais

Extração de DNA_FenolCloroTecidos animais.docx (Anexo 4)

5. Extração de DNA de Tecidos vegetais

Protocolo: Extração de DNA – Método de Fenol-Clorofórmio
Tecidos vegetais

Extração de DNA_FenolCloro_Tecidos animais.docx (Anexo 5)

Protocolos e Material de Apoio

Módulo 3:

6. Extracção de RNA de amostras de tecidos de peixes

Protocolo: “illustra RNAspin Mini RNA”

rna extraction GE.pdf

http://www.blossombio.com/pdf/products/UG_28982258AC.pdf

7. Síntese de cDNA

Protocolo: “iScript cDNA Synthesis Kit”

Protocolo de síntese de cDNA.docx (Anexo 6)

<http://projekter.aau.dk/projekter/files/239577583/grp10509Bilag22016.pdf>

8. Quantificação de Expressão Génica

Protocolo: Quantificação de expressão génica por PCR em Tempo Real

Protocolo Real Time PCR.docx (Anexo 7)

Alguns Resultados

Extração RNA / Tecido Peixe

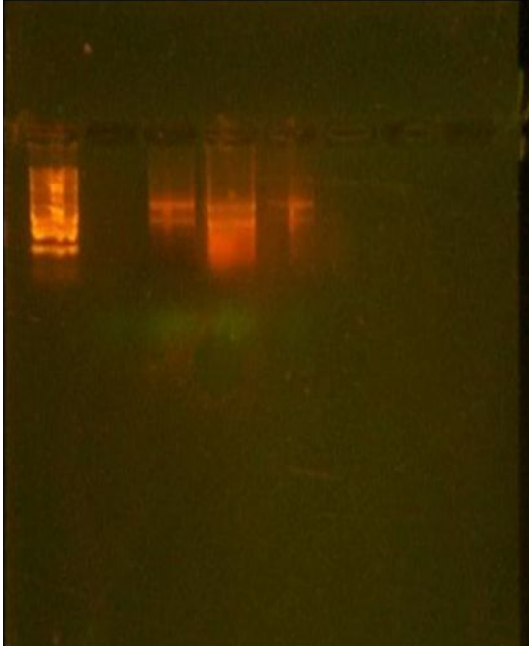


Figura 1:RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (*Danio rerio*, resultados grupo 1).

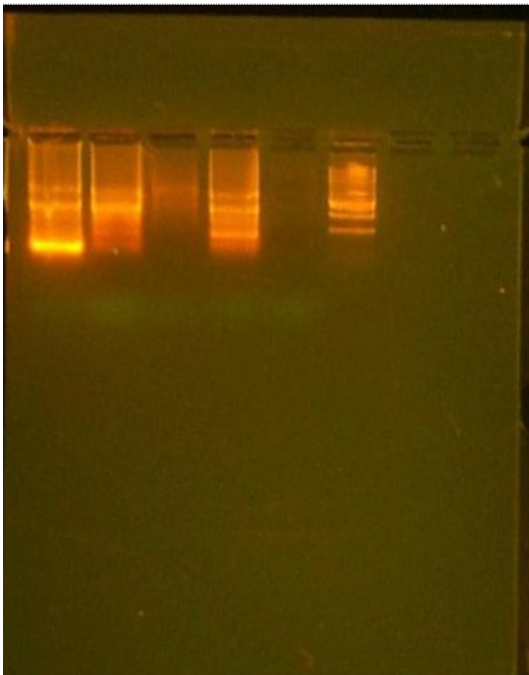


Figura 2:RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (*Danio rerio*, resultados grupo 2).

Alguns Resultados

Extração RNA / Tecido Peixe

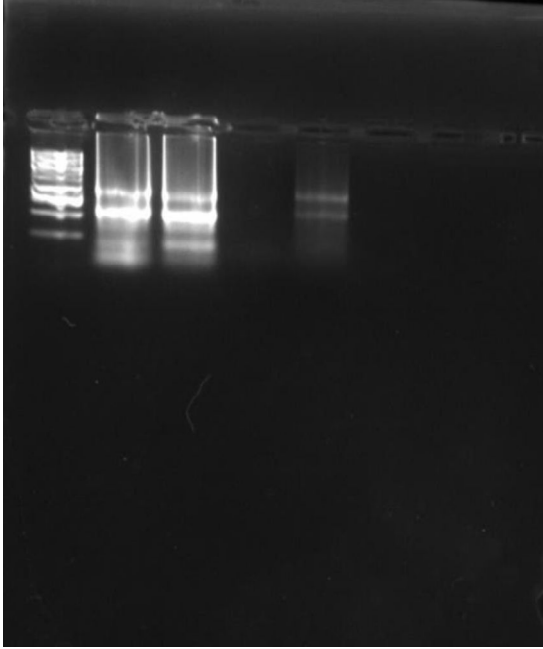


Figura 3:RNA total extraído a partir de tecido de peixe zebra (*Danio rerio*, resultados grupo 1).

Alguns Resultados

Extração de DNA de amostras de água estuarina, sedimento, tecidos de peixe e tecidos de macroalgas.

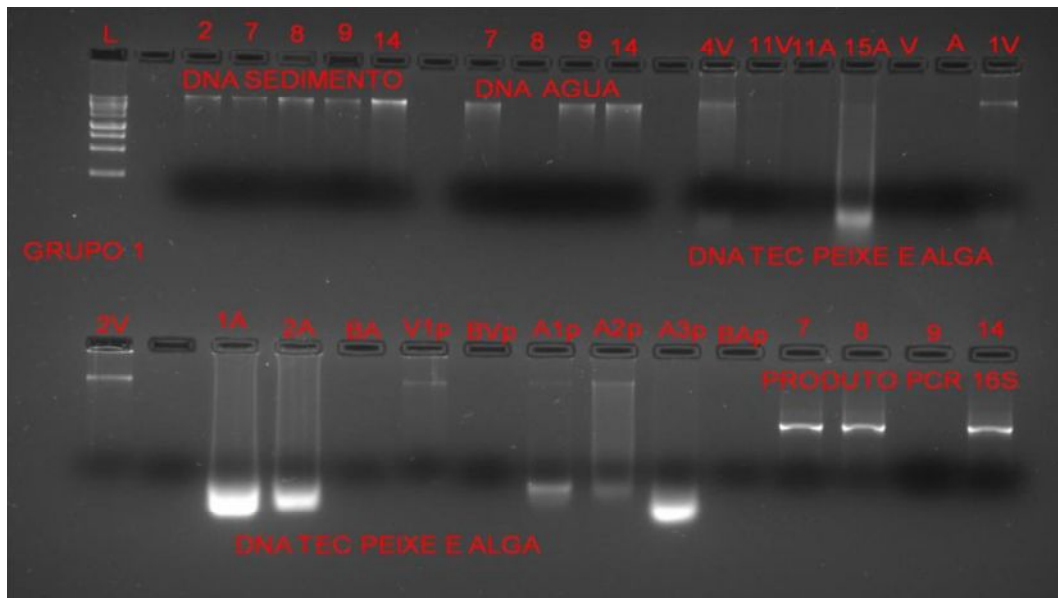


Figura 4:DNA total extraído a partir de amostras de sedimento, de água estuarina, macroalgas (*Ulva lactuca*) e tecido de peixe (*Danio rerio*) e produto de amplificação do gene 16S rRNA; resultados grupo 1.

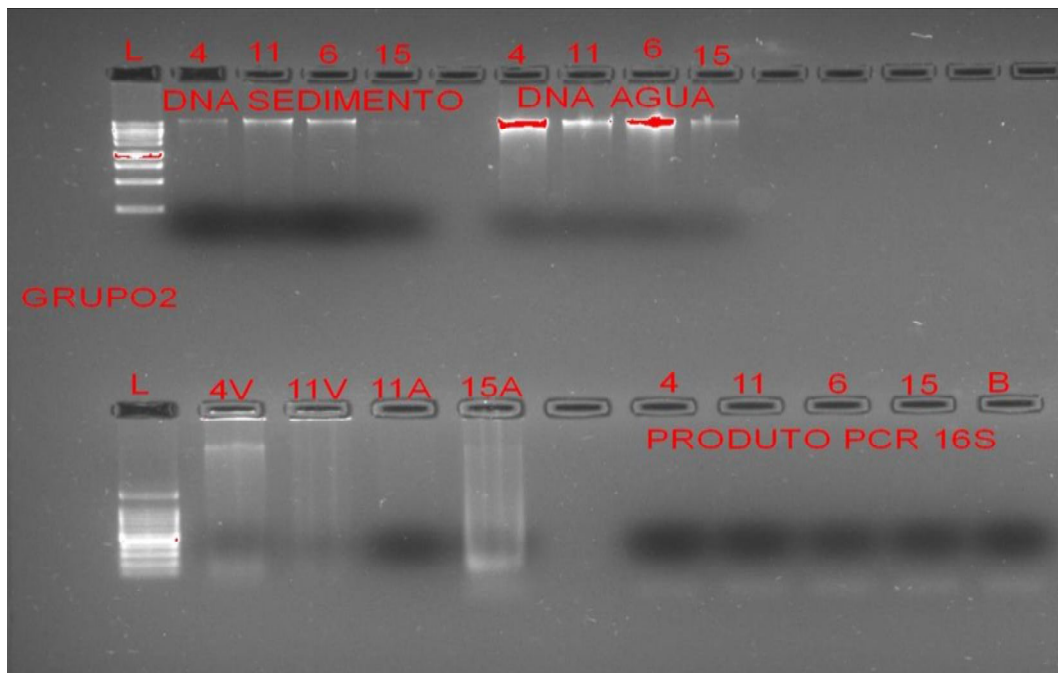


Figura 5:DNA total extraído a partir de amostras de sedimento, de água estuarina, macroalgas (*Ulva lactuca*) e tecido de peixe zebra (*Danio rerio*); resultados grupo 2.

Alguns Resultados

Extração de DNA de amostras de água estuarina, sedimento, tecidos de peixe e tecidos de macroalgas.

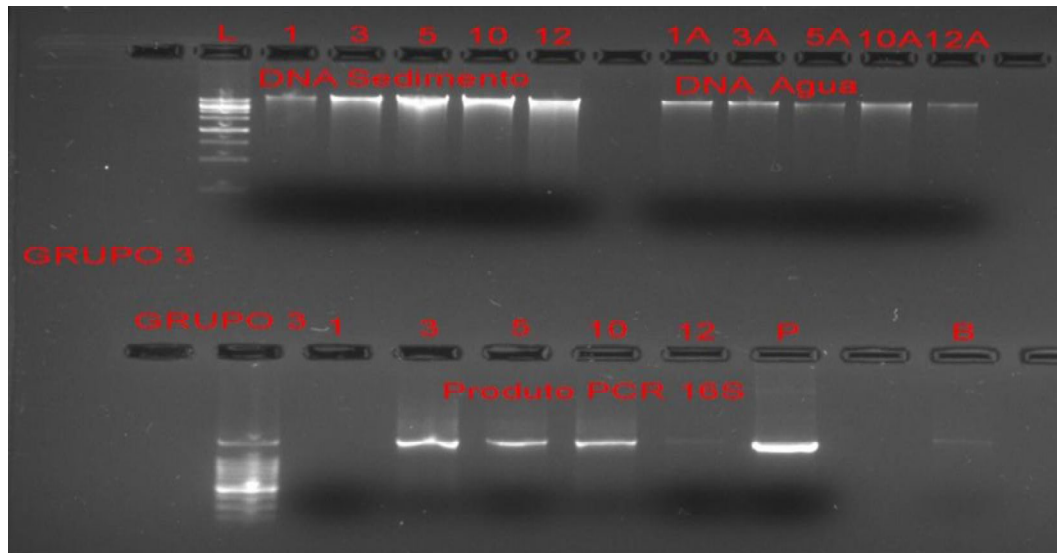


Figura 6: DNA total extraído a partir de amostras de sedimento e de água estuarina e produto de amplificação do gene 16S rRNA; resultados grupo 3.

Alguns Resultados

Quantificação da expressão génica por PCR em tempo real.

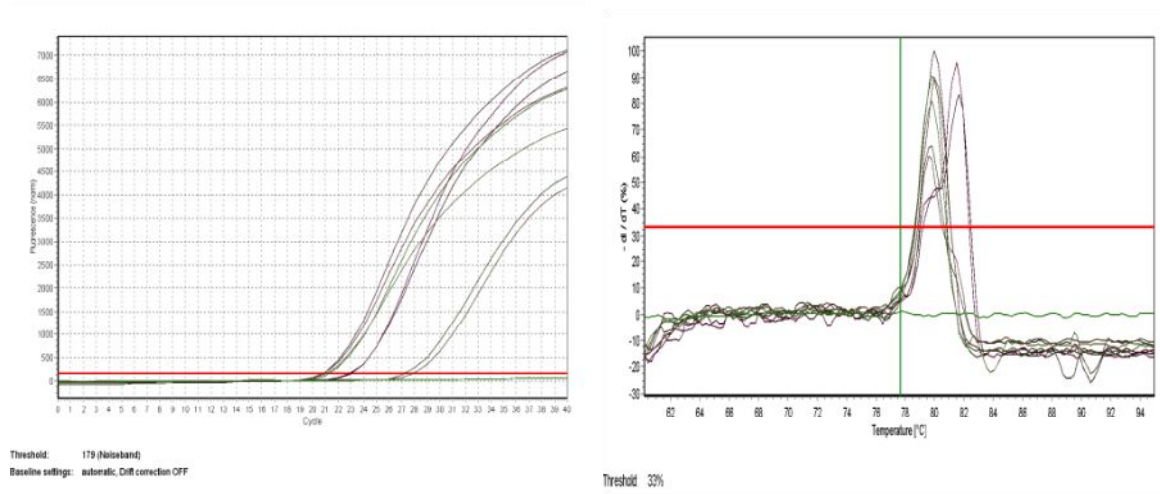


Figura 7: Exemplo de resultados de quantificação de expressão génica por PCR em tempo real a partir do RNA extraído de amostras de tecido de peixe (*Danio rerio*).

Anexos

1. Water column prokaryote genomics (Catarina Magalhães)

Protocol for collecting pelagic prokaryotes on 0.22 μm pore size filters using Sterivex cartridges for DNA extraction and further prokaryotic community analysis. This protocol is based on the protocol used for Ocean sampling day initiative and at the Western Channel Observatory, Gilbert et al. (2012), PLoS ONE 5(11))

1. Collect a total of 5L of seawater using Niskin bottle, store it in a clean carboy, previously washed with the sampling water.
2. Collect/Concentrate microbial community by passing the sampled seawater through a 0.22 μm filter using Sterivex cartridges (Fig.1), by using a vacuum pump. Try to filter as much as possible, until the filter clogs.
3. Flush filtering tubes with sample water before attach the filter, to remove any residual water from previous sample.
4. The Sterivex should be pumped free of standing water following filtration but does not need to dry.
5. Seal the Sterivex filter using parafilm (Provided in the sampling kit)
6. Label the filter with the sample code.
7. Store the labeled sealed filter into a 15 ml falcon tube (Provided in the sampling kit) and label the falcon tube with the same code.
8. Store it at -80°C preferential or at -20°C if not possible at -80°C .
9. Fill the logsheet provided with the total volume of water filtered and the time of filtration.

IMPORTANT:

- 1. Please record any modification to the protocol on the Logsheet provided.
- 2. Make sure you label both, the filter and the 15 ml falcon tube. Store only one filter per 15 ml falcon tube
- 3. Do not forget to quantify the volume of the water filtered per each sample.
- 4. Please use gloves and be more aseptical as possible to avoid cross contamination



2. Gel de Agarose para Electroforese

Preparação do gel (1.5% agarose):

1. Diluir 1.5 g de agarose em 100 ml de TAE 1x.
2. Levar o Erlenmeyer ao micro-ondas por ca. 2m30s.
3. Retirar quando a solução estiver homogénea e sem bolhas.
4. Deixar arrefecer um pouco a solução [na bancada] até se conseguir tocar com a palma da mão, para que o corante (*Sybr Safe*) a adicionar não se degrade.
5. Adicionar 1 μ l de *Sybr Safe* à solução e tocar com a tip, se necessário. Misturar/agitar na bancada para que não se formem bolhas. Verter no tanque. Se se formarem bolhas, remover com a tip.
6. Deixar solidificar (30-45 min).

Corrida do gel:

1. Colocar num poço 3 μ l de ladder.
 - a. Para DNA: usa-se o χ .
 - b. Para produtos de PCR: usam-se 1Kb ou 100bp
2. Colocar ca. de 1.5 μ l (\pm 1 gota) de Dye. Misturar a amostra com o Dye por pipetagem e colocar tudo num poço.
3. Ajustar/confirmar as definições do correntómetro:
 - i. 90 V
 - ii. ~30 – 40 min.

3.PCR – Protocolo

Pcr (dreamtaq)

0.5 µl DNA

1 µl de primer (2 µl no total para o *forward* e *reverse*)

12.5 µl de *dreamtaq PCR Master mix* (ver o melhor volume)

10 µl de água (*nuclease free*)

De modo a evitar fazer possíveis erros de pipetagem, fazer previamente o master mix (fizemos 2 mastermix, um para o *nirS* e outro para o *nosZ*). Como foram 3 amostras, faz-se as contas para esse total + o controlo negativo (tudo menos o DNA). Portanto será:

8 µl de primer (4 µl do *Forward* e 4 µl do *Reverse*, para cada *nirS* e *nosZ*)

50 µl de *dreamtaq PCR Master mix*

40 µl de água (*nuclease free*)

Agitar um pouco no vortex e lentamente.

Adicionar 24,5 µl do master a cada tubo pcr (0,2 ml) + 0,5 µl da amostra [DNA]. Agitar no vortex e verificar se tem bolhas em baixo. Colocar os tubos no meio do rack do pcr, ligado previamente, e seleccionar o ciclo. Correr o pcr.

Notas:

Não ressuspender quando estiver a fazer o master mix!!!!

Ao retirar os tubos PCR tocar apenas na base do tubo para que deste modo se evite a contaminação;

Ao preparar as alíquotas tocar sempre na base do tubo para evitar contaminações;

Fechar sempre os tubos depois de se adicionar o(s) reagente(s).

Ao fazer o master mix, adicionar inicialmente a água e a enzima no final e lentamente, de modo a evitar a formação de bolhas e minimizar a descongelação da enzima;

Idealmente, fazer no rack congelado.

Primers solutions

Fazer uma *stock solution* dos *primers* a 100 μM e, seguidamente, fazer alíquotas de 10 μM com 50 μl (5 μl de *primer stock solution* a 100 μM + 45 μl de *água nuclease free*).

Programa PCR:

Cycle step	Standard 3-step PCR Protocol		Number of cycles
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time	
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation Annealing Extension	95 60 72	30 sec 30 sec 30 sec	35
Final extension	72	10 min	1

4. EXTRACÇÃO DE DNA – MÉTODO DE FENOL-CLOROFÓRMIO

Tecidos animais

1. Cortar 1cm³ de tecido para um tubo eppendorf.
2. Ressuspender em 500 µl de tampão STE 1X (Sodium Chloride-Tris-EDTA; pH 7.8±0.2).
3. Adicionar 25 µl de SDS 20% (previamente aquecido em banho para dissolver completamente).
4. Adicionar 5 µl a 10 µl de proteinase K (20mg/ml).
5. Incubar a 56°C overnight com agitação suave. Se os tecidos não estiverem desfeitos, adicionar mais proteinase K e incubar novamente.

(6 a 10 - fazer numa hotte)

6. Adicionar 20 µl de NaCl 5M (previamente aquecido em banho para dissolver completamente).
7. Colocar a amostra (resultante do ponto 6) num Phase lock. Adicionar 575 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Fechar bem o tubo e inverter várias vezes para misturar.
8. Centrifugar 3 min a ~14.000g. Caso as fases não estejam separadas, adicionar água até encher o Phase lock e repetir centrifugação. Passar a fase aquosa (superior) para um outro tubo Phase lock e descartar a fase orgânica (inferior).
9. Adicionar 575 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e inverter para misturar.
10. Centrifugar 3 min a ~14.000g. Passar a fase aquosa (superior) para um outro tubo de 2mL e descartar a fase orgânica (inferior).

(11 a 15 pode ser feito numa Câmara de Fluxo Laminar)

11. Adicionar 1ml de etanol 96% (a -20°C) e guardar a -80°C durante pelo menos 15 min.

12. Centrifugar 15 min a ~14.000g a 4°C (centrífuga refrigerada).
13. Descartar o etanol 96% e adicionar 1ml de etanol 70%
14. Centrifugar 5 min a ~14.000g
15. Secar completamente o precipitado de preferência ao ar ou Câmara de Fluxo Laminar (ou num bloco térmico a 37°C).
16. Ressuspender em 50 µl (variável dependendo da concentração desejada) de água ou TE. Vortexar muito ligeiramente para ajudar a ressuspender o DNA.

- ◆ Use phenol/chloroform in fumehood at all times.
- ◆ Double glove- phenol can severely burn your skin.
- ◆ Dispose of liquid and solid phenol/chloroform in proper waste disposal containers. Do not pour down sink!

Informações diversas:

TRIS – solução tampão que estabiliza o pH;

NaCl - participa na precipitação das proteínas (salting in);

EDTA – ação quelante de metais pesados e catiões (como o Zn e o Mg), prevenindo a degradação do DNA, já que os metais pesados iriam quebrar as ligações fosfodiéster por ação das DNAses (são cofactores destas enzimas).

pH 7,8 - as nucleases são mais ativas a pH 7,0, e queremos evitar a sua actividade, daí o tampão com pH de 7,8.

SDS – detergente anfipático que desnatura as proteínas;

Proteinase K – degrada todas as proteínas;

NaCl concentrado – ajuda na precipitação das proteínas e do DNA (salting out);

O **fenol** e o **clorofórmio** desnaturam as proteínas, ficando estas solubilizadas na fase orgânica.

Centrifugação: As proteínas encontram-se solubilizadas na fase orgânica; os ácidos nucleicos permaneceram na fase aquosa, já que têm carga negativa e, portanto, são solúveis em água.

O **clorofórmio** é apolar, e remove restos de fenol porque ele é muito oxidante e podia interferir com as enzimas.

O **etanol** é um oxidante, dissolve a maioria dos catiões, para se obter o DNA praticamente puro e precipitado.

5. EXTRACÇÃO DE DNA – MÉTODO DE FENOL-CLOROFÓRMIO

Tecidos vegetais

1. Colocar 500 µl de CTAB+mercaptoetanol (0,2%) com o material em um tubo.
(ex. 9980 µl CTAB + 200 µl mercaptoetanol)
 2. Incubar a 60°C por 1h.
 3. Colocar a amostra (resultante do ponto 2) num Phase lock. Adicionar 575 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Fechar bem o tubo e inverter várias vezes para misturar
 4. Centrifugar 3 min a ~14.000g. Caso as fases não estejam separadas, adicionar água até encher o Phase lock e repetir centrifugação. Passar a fase aquosa (superior) para um outro tubo Phase lock e descartar a fase orgânica (inferior).
 5. Adicionar 575 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e inverter para misturar.
 6. Centrifugar 3 min a ~14.000g. Passar a fase aquosa (superior) para um outro tubo de 2mL e descartar a fase orgânica (inferior).
 7. Adicionar 1ml de etanol 96% (a -20°C) e guardar a -80°C durante pelo menos 15 min.
 8. Centrifugar 15 min a ~14.000g a 4°C (centrífuga refrigerada).
 9. Descartar o etanol 96% e adicionar 1ml de etanol 70%
 10. Centrifugar 5 min a ~14.000g
 11. Secar completamente o precipitado de preferência ao ar ou Câmara de Fluxo Laminar (ou num bloco térmico a 37°C).
 12. Ressuspender em 50 µl (variável dependendo da concentração desejada) de água ou TE. Vortexar muito ligeiramente para ajudar a ressuspender o DNA.
- ◆ Use phenol/chloroform in fumehood at all times.
 - ◆ Double glove- phenol can severely burn your skin.
 - ◆ Dispose of liquid and solid phenol/chloroform in proper waste disposal containers. Do not pour down sink!

6. Protocolo de síntese de cDNA

Material:

Microtubos
Pontas de filtro 10 μ L
Micropipetas
Termociclador
Caixa com gelo
RNaseAway
Etanol

1. Limpar a camara e o material com Etanol e RNaseaway;
2. Colocar os reagentes e o RNA numa caixa com gelo;
3. Num microtubo colocar os reagentes e o RNA nas proporções abaixo descritas;
4. Colocar o microtubo no termociclador e correr o protocolo de reação.
- 5.

Components	Volume per Reaction
5x iScript reaction mix	4 μ l
iScript reverse transcriptase	1 μ l
Nuclease-free water	x μ l
RNA template (100 fg to 1 μ g total RNA)*	x μ l
<hr/>	
Total volume	20 μ l

Reaction Protocol

Incubate complete reaction mix:

5 minutes at 25°C

30 minutes at 42°C

5 minutes at 85°C

Hold at 4°C (optional)

Recommendations for Optimal Results Using the iScript cDNA Synthesis Kit

The maximum amount of the cDNA reaction that is recommended for downstream PCR is one-tenth of the reaction volume, typically 2 μ l.

*When using larger amounts of input RNA (>1 μ g), the reaction should be scaled up, e.g., 40 μ l reaction for 2 μ g, or 100 μ l reaction for 5 μ g to ensure optimum synthesis efficiency.

7.Real Time PCR

Material:

Micropipetas
Pontas com filtro
PCR microplates
Plate sealer
Nuclease-free water
Caixa de gelo
Etanol
Eppendorfs
Rack
Primers

1. Limpar a camara/bancada e o material com Etanol;
2. Colocar os reagentes numa caixa com gelo;
3. Num eppendorf fazer uma mix com todos os componentes, com excepção do cDNA, nas proporções abaixo descritas;
4. Distribuir a mix pelos poços da microplaca;
5. Colocar o cDNA e selar a placa;
6. Centrifugar a placa;
7. Colocar a placa no Real-time e correr o protocolo de reação.

Components	Volume per Reaction
Sybr green mix	10 μ l
cDNA	2 μ l
Nuclease-free water	4 μ l
Forward Primer	2 μ l
Reverse Primer	2 μ l
<hr/>	
Total volume	20 μ l

Cycling step	Temperature (°C)	Hold time	cycles
Initial denaturarion and enzyme activation	95	2 min	1
denaturing	95	30 sec	40
annealing	54*	30 sec	
extension	72	30 sec	
	95	1 min	1
Melting curve	95	15 sec	1
	56*	15 sec	
	95	15 sec	

*a temperatura de annealing e melting são específicas para cada primer