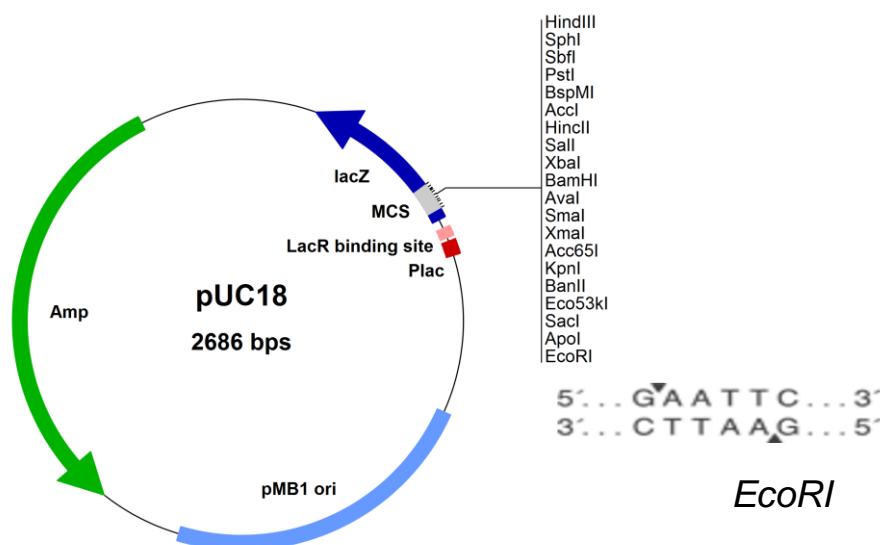


## LGN0232 – Genética Molecular - 2017

**Aula prática 1 – Clonagem por PCR (Polimerase Chain Reaction),  
clivagem de DNA por enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose**



### PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

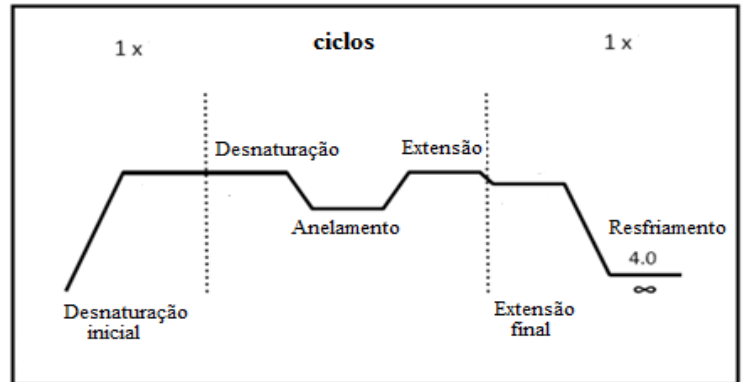
#### Materiais e Métodos

- Serão realizadas duas reações de PCR: uma como controle (sem DNA) outra com o DNA (utilizando o plasmídeo pUC18 para amplificar somente o gene de interesse (*primers* específicos).
- Pipetar cada reagente (volume para “2 reações”) em um tubo eppendorf de 1,5 mL fazendo o mix da reação de PCR.
- Dividir o volume final em dois, pipetando 45µL em cada tubo de PCR.
- Em um dos tubos escrever “controle” e em outro “DNA”.
- No tubo “DNA” adicionar o volume descrito de DNA genômico. Colocar ambos os tubos no termociclador.

Reagentes	1 reação	2 reações	Função
Água milli-Q	30,0 µL	60,0 µL	Completar o volume da reação
Tampão/buffer	5,0 µL	10,0 µL	Mantém as condições ótimas para atuação da enzima.
MgCl <sub>2</sub>	4,0 µL	8,0 µL	Fornece os íons Mg <sup>+2</sup> que são cofatores da DNA polimerase.
Primer Forward (PF)	1,5 µL	3,0 µL	Anelam-se ao DNA molde e fornecem uma extremidade 5' livre para a DNA polimerase iniciar a síntese da nova fita (det. seq. que será amplificada)
Primer Reverse (PR)	1,5 µL	3,0 µL	
dNTPs	2,0 µL	4,0 µL	Substrato para a reação de síntese (contém quant. equimolares de A, T, C, G).
Taq DNA polimerase	1,0 µL	2,0 µL	Enzima termoestável que catalisa a extensão dos <i>primers</i> anelados.
<b>Volume total do mix</b>	<b>45,0 µL</b>	<b>90,0 µL</b>	
DNA***	5 µL	É o DNA molde para a reação, contém o fragmento que se quer amplificar.	

\*\*\*Adicionar apenas no tubo “DNA”.

## Ciclos de amplificação (termociclador)



1 x 95°C = 10 minutos (desnaturação inicial)  
95°C = 30 segundos (desnaturação)  
35 x 58°C = 30 segundos (anelamento)  
72°C = 30 segundos (extensão)  
1 x 72°C = 10 minutos (extensão final)



## PROTOCOLO PARA CLIVAGEM DE DNA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO

### Materiais e métodos

- Dividir o **volume final** em dois, pipetando 8 µL em dois novos tubos - escrever "Produto de PCR" e adicionar o volume correspondente (\*); em outro escrever "plasmídeo" e adicionar o volume correspondente (\*\*).
- Encubar ambos no banho-maria a 37°C por 12 horas.

Reagentes	1 reação	2 reações
Tampão de reação com cofatores	1,0 µL	2,0 µL
Enzima de restrição <i>EcoRI</i>	1,0 µL	2,0 µL
�gua mili-Q esterelizada	6,0 µL	12,0 µL
<b>Volume final do mix</b>	<b>8,0 µL</b>	<b>16,0 µL</b>
Produto de PCR	2,0 µL	
Plasmídeo <i>pUC18</i> **	2,0 µL	

Observa o: Trocar de ponteira ao pegar cada reagente para evitar contaminação.

## ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

### Material e métodos

- Aplicar cada uma das diferentes amostras e o marcador 1Kb em diferentes canaletas do gel de agarose 1%.

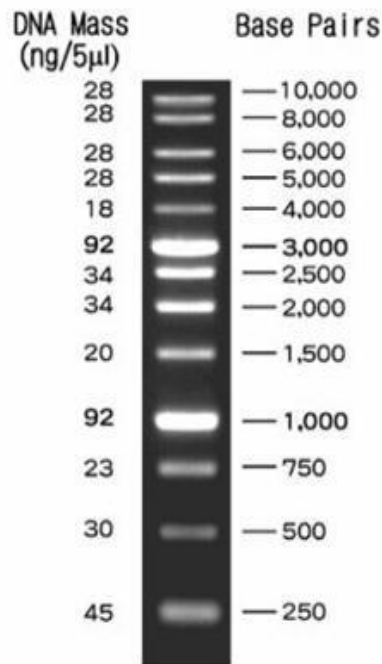
- Para que os fragmentos (ou “bandas”) possam ser observados no transluminador ultravioleta, antes da aplicação, devem ser adicionados às amostras LB+SYBR®, que são, respectivamente, tampão com coloração azul (conduzir fragmentos e para permitir observar os fragmentos se movimentando pelo gel) e intercalante de DNA (o qual emite fluorescência sob a luz ultravioleta).
- Após aplicar, conecte os cabos ligando a cuba até a fonte. Programe a voltagem para 100V (50-70 mA) por aprox. 30 minutos. O SYBR degrada com a luz, por isso, se possível, cobrir a cuba para o gel correr no escuro. Para visualizar as amostras, colocar o gel sob a iluminação ultravioleta e comparar o tamanho (pb) das bandas obtidas.

**Ordem de aplicação nos “pocinhos do gel” e respectivos volumes de amostras**

Pocinho do gel	Amostra	Volume Amostra	LB + SYBR®	Volume total a ser aplicado no gel
1	Marcador 1Kb	3 µL	3 µL	6 µL
2	Plasmídeo íntegro*	10 µL	3 µL	13 µL
3	Plasmídeo clivado	15 µL	3 µL	18 µL
4	PCR controle*	3 µL	3 µL	6 µL
5	PCR DNA genômico - inserto	3 µL	3 µL	6 µL
6	DNA genômico íntegro*	5 µL	3 µL	8 µL
7	DNA genômico digerido	10 µL	3 µL	13 µL

\*Controles

**Marcador 1kb**



1 % TAE agarose gel

