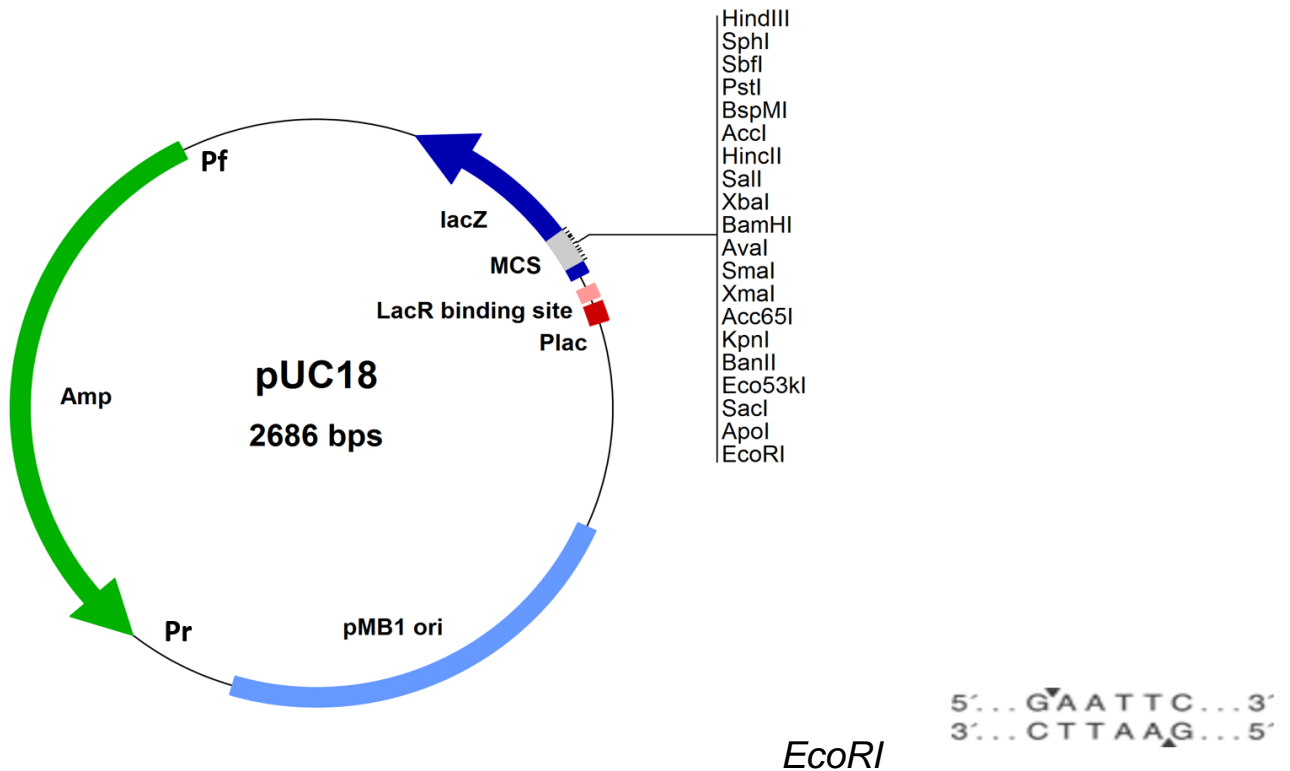


**Aula prática 1 – Clonagem por PCR (Polimerase Chain Reaction),
clivagem de DNA por enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose**



PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

Materiais e Métodos

- Serão realizadas duas reações de PCR: uma como controle (sem DNA) duas outra com o DNA (utilizando o plasmídeo pUC18 proveniente de colônias brancas e azuis para amplificar somente o gene de interesse. Os primers utilizados são específicos para flanquear a região plasmídeo e verificar se foi inserido corretamente.
- 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 três, pipetando 45µL em cada tubo de PCR.
- Em um dos tubos escrever “1- plasmídeo colônia branca, 2 – plasmídeo colônia azul e 3 - controle.
- Nos tubos 1 e 2 adicionar o volume descrito de DNA genômico. Colocar ambos os tubos no termociclador.

CUIDADO: os reagentes são caros e devem ser manuseados com cautela para que não haja desperdício!!!!

Reagentes	1 reação	3 reações	Função
Água milli-Q	30,0 µL	90,0 µL	Completar o volume da reação
Tampão/buffer	5,0 µL	15,0 µL	Mantém as condições ótimas para atuação da enzima.
MgCl ₂	4,0 µL	12,0 µL	Fornece os íons Mg ⁺² que são cofatores da DNA polimerase.
Primer Forward (PF)	1,5 µL	4,5 µL	Anelam-se ao DNA molde e fornecem uma extremidade 5` livre para a
Primer Reverse (PR)	1,5 µL	4,5 µL	DNA polimerase iniciar a síntese da nova fita (det. seq. que será amplificada)
DNTPs	2,0 µL	6,0 µL	Substrato para a reação de síntese (contém quant. equimolares de A, T, C, G).
Taq DNA polimerase	1,0 µL	3,0 µL	Enzima termoestável que catalisa a extensão dos <i>primers</i> anelados.
Volume total do mix	45,0 µL	135,0 µL	
DNA***	5 µL	É o DNA molde para a reação, contém o fragmento que se quer amplificar.	

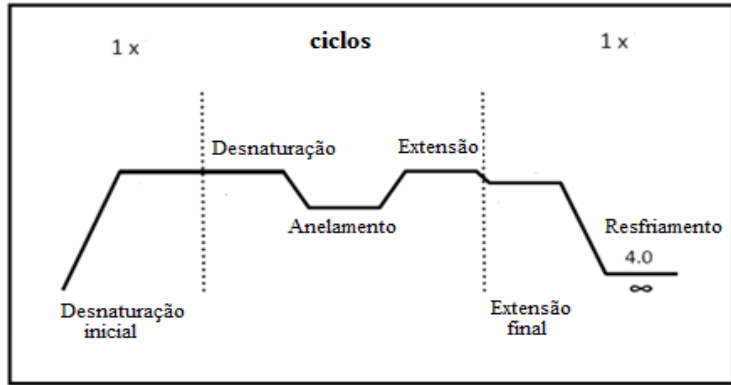
***Adicionar apenas nos respectivos tubos 1 e 2.

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)



Termociclador



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 "1 - colônia branca" e adicionar o volume correspondente (*); em outro escrever "2 - colônia azul" 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
Água mili-Q esterelizada	6,0 µL	12,0 µL
Volume final do mix	8,0 µL	16,0 µL
Plasmídeo <i>pUC18</i> – colônia <i>branca</i>	2,0 µL	
Plasmídeo <i>pUC18</i> – colônia <i>azul</i>	2,0 µL	

Observação: 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

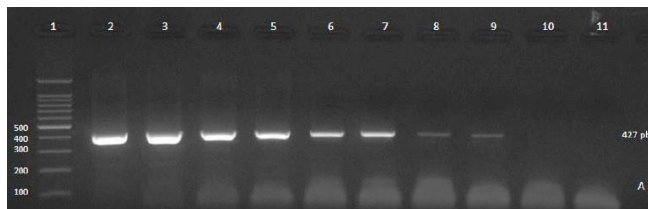
fragmentos e para permitir observar os fragmentos se movimentando pelo gel) e intercalante de DNA (o qual emite fluorescência sob a luz ultravioleta).

- 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

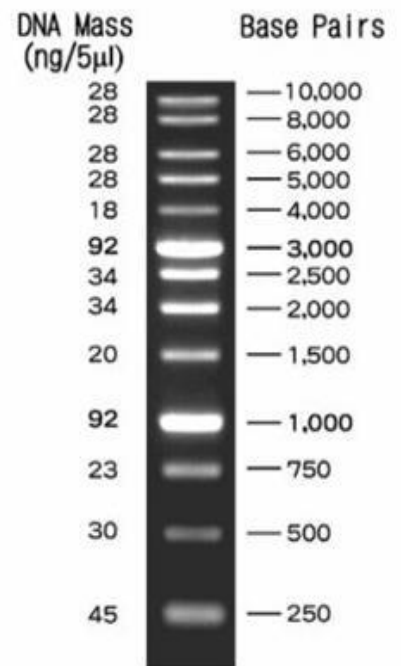
Pocinho do gel	Amostra	Volume Amostra	LB + SYBR®	Volume total a ser aplicado no gel
1	Marcador 1Kb	3 µL	3 µL	6 µL
2	Plasmídeo íntegro*	10 µL	3 µL	13 µL
3	Plasmídeo clivado	15 µL	3 µL	18 µL
4	PCR controle*	3 µL	3 µL	6 µL
5	PCR DNA genômico - inserto	3 µL	3 µL	6 µL
6	DNA genômico íntegro*	5 µL	3 µL	8 µL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

*Controles

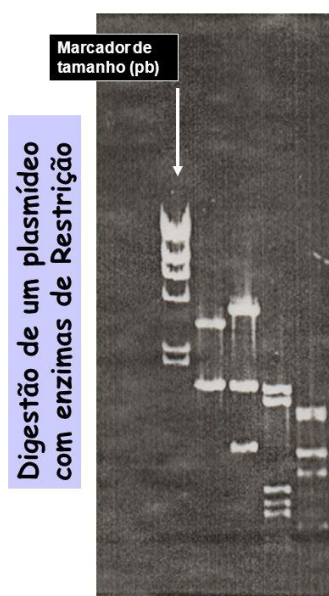


Gel de agarose com resultado de PCR (exemplo)

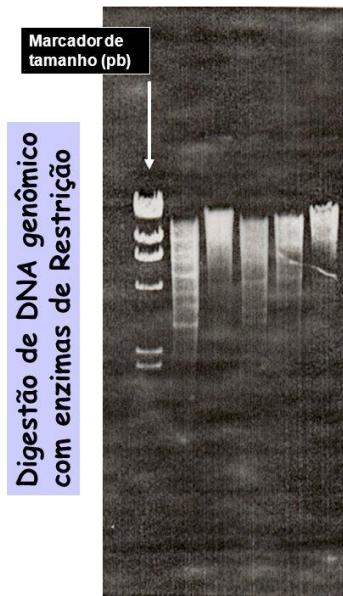
Marcador 1kb



1 % TAE agarose gel



Digestão de um plasmídeo com enzimas de Restrição



Digestão de DNA genômico com enzimas de Restrição