

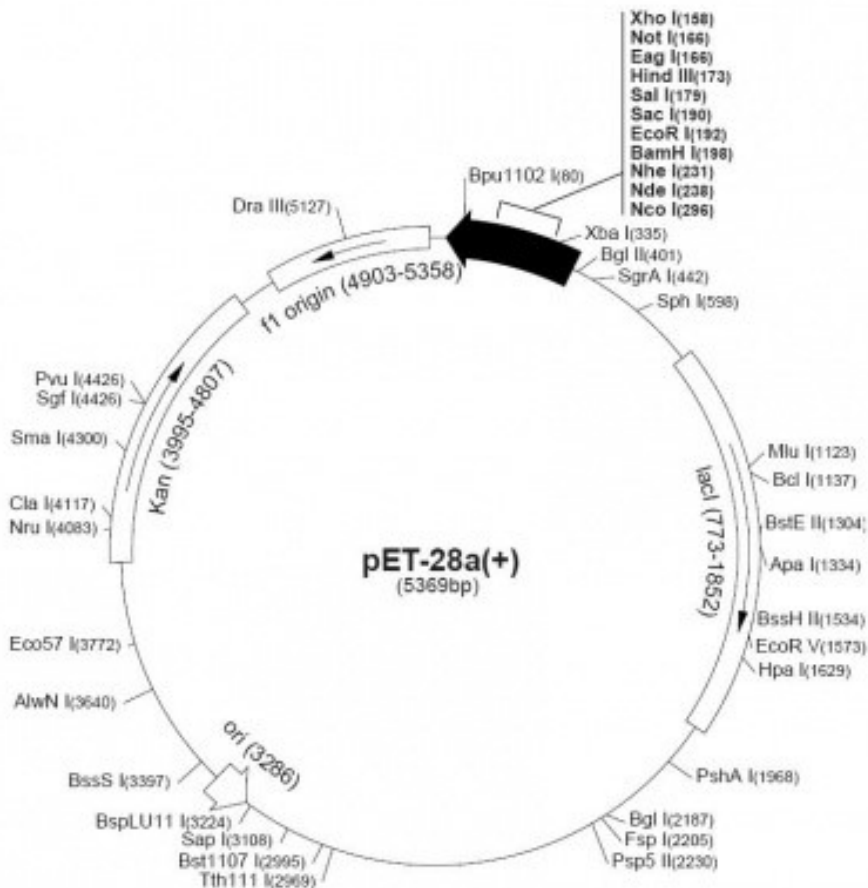
QBQ2457- Lab 3 – Digestão do amplicon com enzima de restrição e Ligação no vetor de expressão

Após a amplificação do gene *RRP47* realizada na aula anterior, faremos a digestão do produto do PCR com enzimas de restrição específicas e a sua ligação ao vetor de expressão já linearizado (submetido a reações com as mesmas enzimas de restrição).

Digestão dos insertos e vetor: A escolha das enzimas de restrição a serem usadas é um dos principais pontos nessa etapa. Para realizar a clonagem do gene *RRP47* no vetor de expressão, é necessário primeiramente a digestão do produto de PCR obtido (amplicon obtido na aula anterior) e do vetor por enzimas de restrição para a formação de extremidades protuberantes e complementares (extremidades coesivas) que podem ser ligadas no sentido apropriado.

O vetor de expressão (plasmídeo) que iremos utilizar para a clonagem chama-se pET28a (mapa abaixo). Ele possui entre outras características um gene de resistência ao antibiótico canamicina.

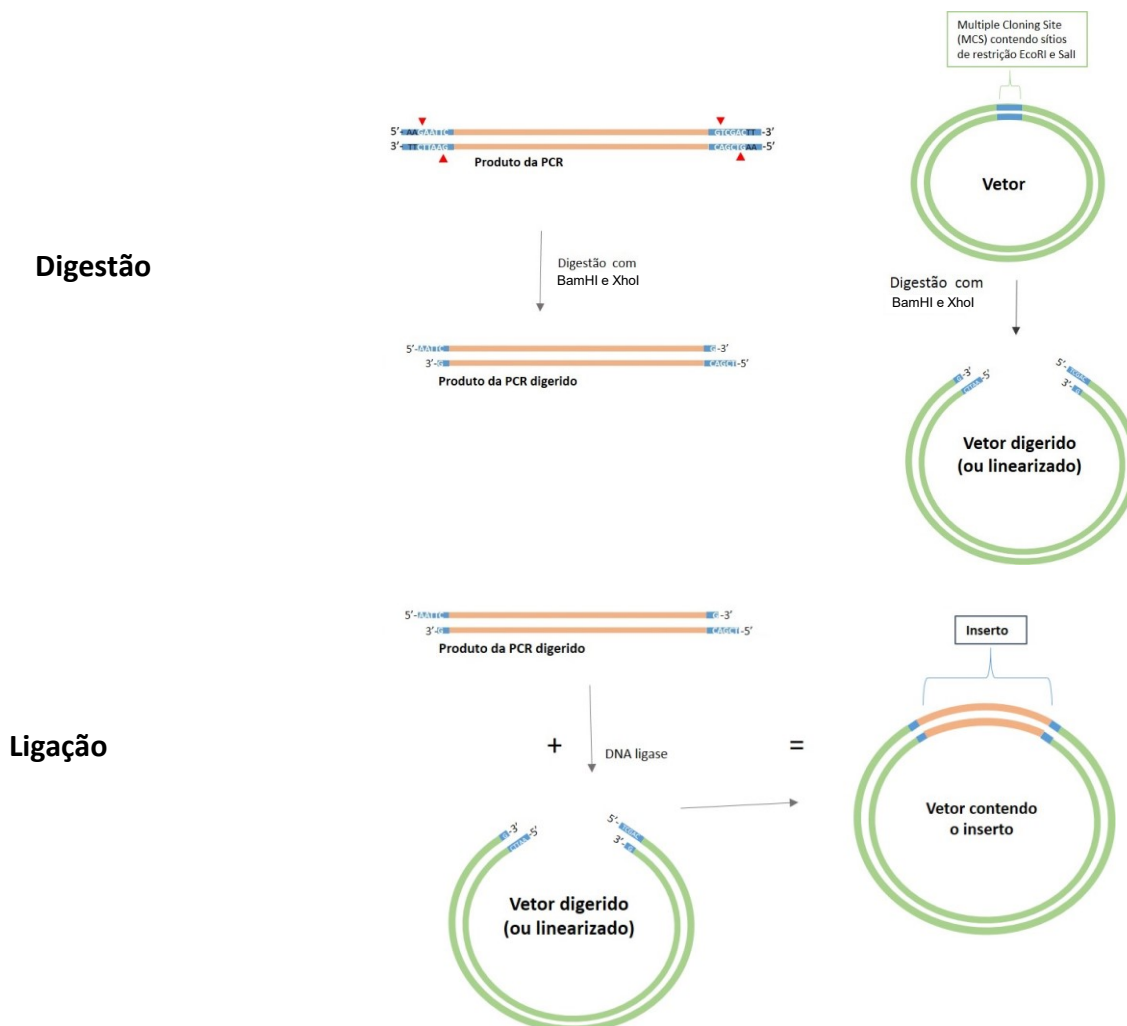
Para a digestão do DNA, são necessários um tampão apropriado e as enzimas de restrição adequadas (enzimas que irão clivar as extremidades do amplicon).



A grande maioria dos vetores comerciais possui uma região denominada MCS (*multiple cloning site*). Os MCS contêm uma série de sequências de sítios de restrição que são reconhecidas por enzimas de restrição específicas. Essa é a região em que o segmento de DNA de interesse é inserido após o vetor ter sido digerido pela(s) mesma(s) enzima(s);

Os produtos de PCR (amplicon) somente serão digeridos se possuírem sítios de restrição para enzimas correspondentes. Tais sítios podem ser adicionados às extremidades 5' dos *primers* utilizados para amplificação da sequência codificadora do gene. No nosso caso, a digestão do inserto (amplicon) e do vetor será realizada com as enzimas de restrição *Bam*HI and *Xho*I. Tais sítios de restrição devem ser **obrigatoriamente únicos** na sequência do amplicon. **Confira fazendo um mapa de restrição virtual do amplicon do gene *rnhA*, utilizando a sequência obtida na aula Multimídia 1 e ferramentas disponíveis na Internet (ex: <http://www.restrictionmapper.org/>).**

Após a digestão, é necessário ligar o fragmento ao vetor utilizando a enzima DNA ligase, que catalisa a formação da ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos das extremidades livres. Veja abaixo um esquema demonstrando digestão de vetor e inserto seguida por ligação.



Esquema da digestão de vetor e inserto, com posterior ligação

Protocolo: Digestão do amplicon com enzimas de restrição

A digestão dos insertos será realizada de acordo com o protocolo abaixo. O vetor já foi previamente digerido pelos monitores em um procedimento bastante semelhante.

1. Retire o tampão da enzima de restrição do congelador;
2. Somente retire as enzimas de restrição do congelador no momento da utilização;
3. Em um tubo de 0,5 mL, pipete os reagentes na ordem da tabela, sempre mantendo-os no gelo;

Reagente	Volume
Água ultra-pura autoclavada qsp	50 µL
NEB Buffer 3.1 10x	4,7 µL
BSA 100 x	3 µL
Produto de PCR (~1ug)	0,3µL
Enzima <i>Bam</i> HI (NEB)	20 µL
Enzima <i>Xho</i> I (NEB)	1 µL
Volume final	1 µL
	30 µL

4. Incube os tubos a 37°C por 1 hora e 65°C por 10 minutos para inativação das enzimas (no termociclador).

Protocolo: Reação de ligação

Após a digestão do inserto e do vetor, realizaremos a reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase, com os reagentes indicados na tabela abaixo. Pipete os reagentes na ordem, num tubo Eppendorf de 0,2 mL, separando os reagentes já utilizados e retirando a enzima T4 DNA ligase imediatamente antes de utilizar (mantenha a enzima sempre no gelo!). Antes de pipetar o tampão da DNA ligase, verifique que esteja completamente descongelado e a solução completamente homogênea.

Nota: A concentração do inserto (amplicon digerido) será estimada a partir da quantidade que foi utilizada na reação de digestão com enzimas de restrição. Para aumentar as chances de sucesso da reação de ligação utilizaremos um excesso do inserto (razão molar inserto:vetor = 2:1). Calcule a quantidade de inserto a ser utilizada na ligação com a fórmula abaixo, considerando a utilização de 50 ng de vetor linearizado.

$$\text{inserto (ng)} = \frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \text{razão molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}}$$

Reagente	Volume
Tampão de DNA Ligase 10x	2 µL
Inserto (0,5 kb)	16 µL
Vetor (5,3 kb)	(50ng) 1 µL
T4 Ligase (400 U/µL)	1 µL
Água ultra-pura autoclavada qsp	20 µL
Total	20 µL

Incube a reação a 16°C *overnight* (16-18h) e em seguida incube 70°C por 5 min (inativação da enzima). Após inativação, transfira imediatamente o tubo o gelo e armazene no congelador (-20°C) até a próxima aula quando será realizada a transformação bacteriana. *(esta etapa será realizada pelos monitores)*