

## QBQ2457- Lab 5 – Extração do DNA plasmidial de bactérias (miniprep)

Nesta aula, vamos fazer a extração de DNA plasmidial a partir da cultura do mesmo clone de *E. coli* utilizado na indução da proteína RRP47 recombinante. O vetor plasmidial empregado possui características que permitem que ele se mantenha em alto número de cópias (>30 moléculas/célula) na bactéria.

Para extração do DNA plasmidial, bactérias são lisadas com o auxílio de um detergente, o dodecil sulfato de sódio (SDS). Na preparação de plasmídeos é usada uma solução alcalina, que é posteriormente neutralizada, com a precipitação de proteínas, DNA genômico e outros componentes da célula. O DNA plasmidial é depois precipitado com etanol e solubilizado em uma solução tampão.

Depois da extração, o plasmídeo purificado pode ser quantificado em espectrofotômetro e analisado em eletroforese em gel de agarose.

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  contendo a construção plasmidial pET/RRP47 são cultivadas em meio LB contendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de canamicina a 37°C com agitação por cerca de 10 h (esta etapa será realizada pela monitora).

1. Transferir 1,5 ml de cultura (previamente inoculada) para Eppendorf.
2. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga.

### Iniciar experimento no passo 3:

3. Desprezar sobrenadante e **ressuspender células em 100  $\mu\text{l}$  de GET<sup>1</sup>**, agitando em Vortex.
4. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de SDS/NaOH<sup>2</sup>, agitar os tubos por inversão e incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Adicionar 150  $\mu\text{l}$  de 7,5 M Acetato de Amônio, agitar os tubos por inversão e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Centrifugar por 5 minutos e transferir sobrenadante para tubo limpo.
7. Adicionar 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol, inverter tubos e centrifugar por 5 minutos.
8. Desprezar sobrenadante e lavar pellet com 500  $\mu\text{l}$  de 70% etanol gelado (agitar no vortex).
9. Centrifugar por 5 minutos e desprezar sobrenadante. Secar pellet.
10. Ressuspender em 100  $\mu\text{l}$  de TE<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>GET: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0/50 mM EDTA, pH 8,0/1% glicose

<sup>2</sup>SDS/NaOH: 200 mM NaOH/1% SDS

(Diluir de soluções 10X concentradas na hora de usar)

<sup>3</sup>TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0/1 mM EDTA, pH 8,0

### QBQ2457- Lab 5 - parte 2 – Verificação da clonagem por PCR de colônias

Os procedimentos realizados nas aulas anteriores tinham como objetivo a clonagem e a inserção do plasmídeo nas bactérias. Realizamos o plaqueamento após a transformação em meio contendo o antibiótico. Nesta etapa vamos confirmar que os clones que cresceram, de fato têm o gene inserido no vetor plasmidial.

No processo de ligação, utilizamos uma relação de inserto: vetor de 2:1, o que quer dizer que há excesso de inserto, então a chance de ter ocorrido a ligação do inserto com o vetor é alta. Outro fator que favorece a eficiência da clonagem é a utilização de enzimas de restrição diferentes em cada extremidade a ser ligada. Mas nada impede de ter ocorrido recircularização do vetor, no caso da existência de moléculas em que apenas um dos sítios de restrição foi efetivamente clivado, e o clone bacteriano que cresceu na placa após a transformação ter somente este vetor fechado.

Por isso iremos fazer o PCR de colônia, no qual iremos detectar a presença do inserto utilizando o mesmo par de *primers* que foi utilizado na amplificação do gene *RRP47* por PCR.

Uma das colônias em que a clonagem tenha sido confirmada será expandida para indução da expressão da expressão da proteína RRP47.

Cada grupo irá fazer o PCR de colônia para dois clones crescidos na placa da transformação da ligação da aula anterior:

1. Colocar 10µL de TE num tubo eppendorf e “inocular” com uma ponteira uma pequena porção da colônia. Faça tantos tubos quantos forem as suas colônias (no caso serão duas colônias), não esquecendo de numerar a colônia na placa e a tampa do tubo!
2. Aquecer por 5 minutos em termobloco a 95°C. Colocar imediatamente no gelo.
3. Centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 2 min.
4. Transferir o sobrenadante para um novo tubo (termolisado).
5. Mantenha o termolisado no gelo. Homogeneizar (Vortex) bem antes de pipetar o volume adequado. Se necessário, armazenar o termolisado congelado em freezer -80°C até o uso **(Prevenir qualquer chance de degradação do DNA)**.
6. Use 5 µL na reação de PCR.
7. Prepare a reação PCR – Prepare a mix. Calcule o volume da mix em uma reação a mais, isto é, se vai fazer 2 reações, prepare a mix para 3 reações. **Nunca prepare o volume justo!**

	Estoque	Concentração Final	Volume (µL) para 1 tubo	Mix para n+2 tubos
Água ultra-pura autoclavada			14,25 µL	
Solução de dNTPs	10mM	0,2mM	0,5 µL	
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5 mM	1,5 µL	
Primer Forward	10 µM	0,2 µM (0,2pmol/µL)	0,5 µL	
Primer Reverse	10 µM	0,2 µM (0,2pmol/µL)	0,5 µL	
Buffer <i>Taq</i> 10x	10x	1x	2,5 µL	
<i>Taq</i> Polimerase padrão (NEB, Invitrogen, ou equivalente)	5U/µL	2,5U	0,25 µL	
Volume final			20 µL	

1. Distribua os 20 $\mu$ L de mix em tubos eppendorfs 0,2 mL devidamente identificados (número do grupo/número da colônia).
2. Adicione 5  $\mu$ l do sobrenadante do termolisado.
3. Coloque os tubos no termociclador, utilizando ao seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	20 seg	
55°C	20 seg	30
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	$\infty$	

4. Após o termino da reação de PCR, adicione 5  $\mu$ L do tampão de amostra em cada eppendorf e aplique no gel;
5. Deixe correr a 100V por 30 minutos para a visualização no transiluminador UV.