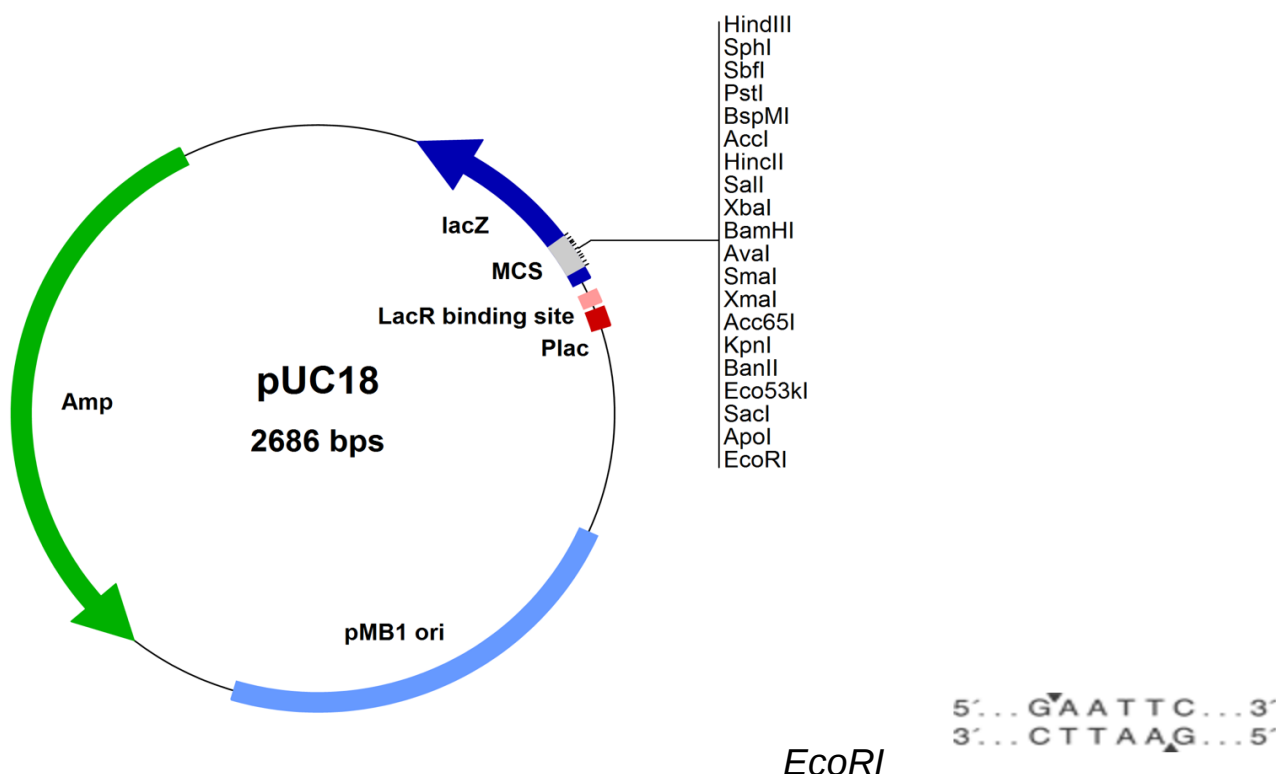


Aula prática 1 – Clonagem por PCR (Polimerase Chain Reaction),
clivagem de DNA por enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose



Gene *cry1Aa* (Número de Acesso NCBI D17518.1)

```

1  tatgttttaa attgtagtaa tgaaaaacag tattatatca taatgaattg gtatcttaat
61  aaaagagatg gaggtaactt atggataaca atccgaacat caatgaatgc attccttata
121 attgtttaag taaccctgaa gtagaagtat taggtggaga aagaatagaa actgggttaca
181 cccaatcga tatttccttg tcgctaacgc aatttccttt gagtgaattt gttcccgggtg
241 ctggatttgt gtaggacta gttgatataa tatggggaat ttttgggtccc tctcaatggg

```

...

```

3541 ggattgagat tggagaaacg gaaggaacat ttatcgtgga cagcgtggaa ttactcctta
3601 tggaggaata gtctcatgca aactcagggt taaatatcgt tttcaaatca attgtccaag
3661 agcagcatta caaatagata agtaatttgt tgtaatgaaa aacggacatc acctccattg
3721 aaacggagtg atgtccgttt tactatgtta ttttctagta atacata

```

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.

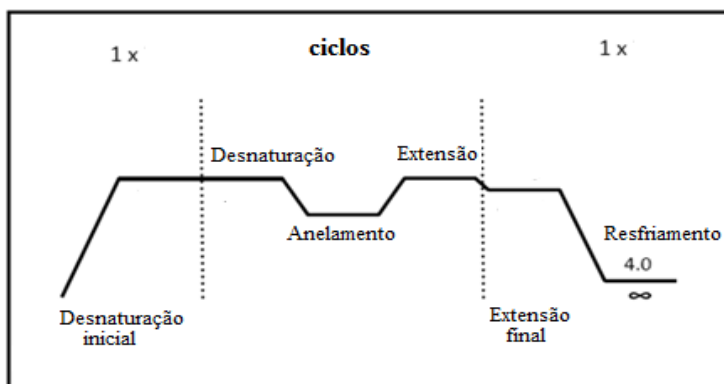
- Nos tubos 1 e 2 adicionar o volume descrito de DNA genômico. Colocar ambos os tubos no termociclador.
CUIDADO: os reagentes são caros e devem ser manuseados com cautela para que não haja desperdício!!!!

Reagentes	1 reação	3 reações	Função
Água milli-Q	30,0 µL		Completar o volume da reação
Tampão/buffer	5,0 µL		Mantém as condições ótimas para atuação da enzima.
MgCl ₂	4,0 µL		Fornece os íons Mg ⁺² que são cofatores da DNA polimerase.
Primer Forward (PF)	1,5 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		
DNTPs	2,0 µL		Substrato para a reação de síntese (contém quant. equimolares de A, T, C, G).
Taq DNA polimerase	1,0 µL		Enzima termoestável que catalisa a extensão dos <i>primers</i> anelados.
Volume total do mix	45,0 µL	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 três, 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.

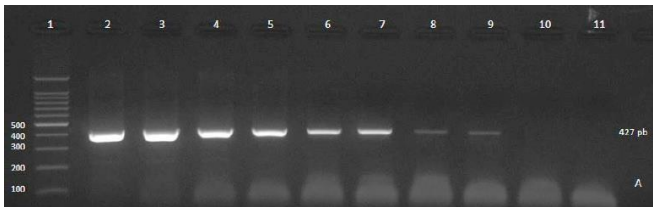
Reagentes	1 reação	3 reações
Tampão de reação com cofatores	1,0 µL	3,0 µL
Enzima de restrição <i>EcoRI</i>	1,0 µL	3,0 µL
Água mili-Q esterelizada	6,0 µL	18,0 µL
Volume final do mix	8,0 µL	16,0 µL
Plasmídeo <i>pUC18</i> – <i>colônia branca</i>	2,0 µL	
Plasmídeo <i>pUC18</i> – <i>colônia azul</i>	2,0 µL	
DNA bactéria BT	2,0 µL	

Observação: Trocar de ponteira ao pegar cada reagente para evitar contaminação.

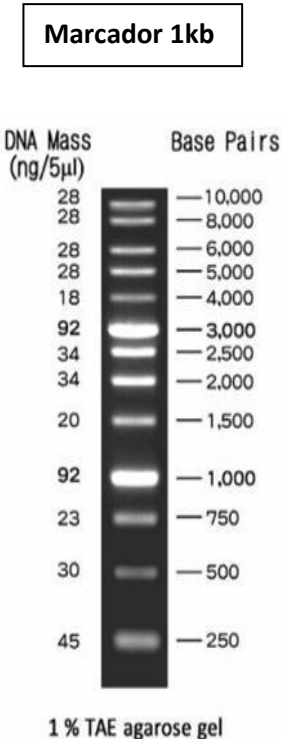
ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

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.

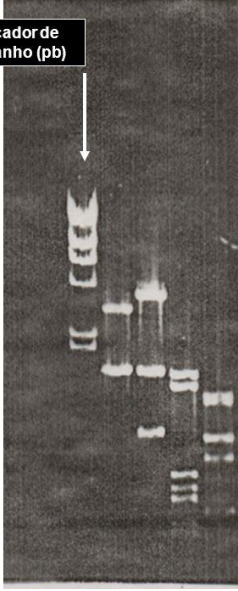


Gel de agarose com resultado de PCR (exemplo)



Digestão de um plasmídeo
com enzimas de Restrição

Marcador de
tamanho (pb)



Digestão de DNA genômico
com enzimas de Restrição

Marcador de
tamanho (pb)

