

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 RNase HI 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 num tampão contendo a enzima RNase A.

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

Células de *E. coli* DH5 α contendo a construção plasmidial pProEx HTa/*rnhA* são cultivadas em meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina a 37°C com agitação por cerca de 10 h (esta etapa será realizada pelos monitores).

1. Transfira 1 mL da cultura de *E. coli* para um tubo tipo Eppendorf.
2. Centrifugue a 12000 rpm por 2 minutos.
3. Descarte o sobrenadante.
4. Adicione 100 μ l de tampão GET e ressuspensa as bactérias por agitação no vórtex. Evite deixar algum precipitado no fundo do tubo; a suspensão deve ficar homogênea.
5. Adicione 200 μ l de tampão de lise alcalina, para DNA plasmidial.
6. Inverta o tubo 10 vezes, lenta e delicadamente, até a solução ficar transparente e viscosa. Não ultrapassar 5 min neste passo.
7. Adicione 300 μ l de solução neutralizadora e inverta 10 vezes o tubo lenta e delicadamente. Deve se formar um precipitado branco grande e a solução deve ficar menos viscosa. Mantenha no gelo até a centrifugação.
8. Centrifugue a 12000 rpm por 5 min à temperatura ambiente.
9. Transfira o sobrenadante resultante da centrifugação do passo anterior para outro eppendorf. Cuidado para não transferir pedaços do precipitado também.
10. Adicione 1 ml de etanol 100 % gelado e mantenha no gelo.
11. Centrifugue a 12000 rpm por 2 min à temperatura ambiente .
12. Despreze o sobrenadante e lave o sedimento com 500 μ l de etanol 70%.
13. Centrifugue a 12000 rpm por 5 min à temperatura ambiente.
14. Seque o sedimento na estufa a 85°C por 5-10 min
15. Ressuspensa o sedimento em 20 μ l de TE + RNase.
16. Avalie a preparação em eletroforese em gel de agarose 0,8%.