

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

BIOLOGIA MOLECULAR I - 03 DE NOVEMBRO DE 2021

Transformação bacteriana e Extração de DNA plasmidial bacteriano

Aula 2

Extração de DNA plasmidial e análise em eletroforese em gel de agarose.

Para extração do DNA plasmidial, a célula deverá ser lisada e o plasmídeo purificado a partir da solução contendo restos da parede celular, da membrana e de outros componentes celulares. Normalmente, a lise da célula é feita por meio de um tratamento em meio básico (lise alcalina), onde é adicionado o detergente SDS que desnatura as proteínas e dissolve os lipídios, e NaOH que desnatura todo o DNA (cromossômico e plasmidial). Por neutralização com acetato de potássio, o DNA plasmidial (cccDNA: “covalently closed circular DNA”) renatura rapidamente, pois as duas cadeias não se separaram completamente devido aos super-enovelamentos, fato este que não ocorre com o DNA genômico que é formado com cadeias longas. Assim, o DNA genômico é precipitado juntamente com as proteínas e o restante dos componentes celulares, enquanto que os plasmídeos renaturados permanecem em solução.

O DNA plasmidial pode ser analisado através de vários métodos, para se verificar sua integridade. O método mais comum é realizar uma migração eletroforética das amostras. Nesse caso, as amostras são aplicadas no gel horizontal, ao qual é aplicada uma corrente elétrica. As moléculas de DNA migram para o polo positivo, devido a sua carga negativa (dada pelos agrupamentos fosfato). Como o plasmídeo é circular, ele apresenta um formato super-enovelado (forma I), que, por estar mais compactado, permite uma migração mais rápida do que o plasmídeo circular contendo pelo menos uma quebra (circular relaxado- forma II). No gel, a presença de intercalantes fluorescentes (como o brometo de etídeo) permite a visualização das moléculas de DNA em um equipamento conhecido como transiluminador de luz ultravioleta.

Experimento 2

(na véspera)

Análise da placa e inóculo para extração DNA Plasmidial

Preparo do Inóculo

- a) Cada grupo receberá suas placas de Petri contendo as colônias resultantes da transformação.
- b) Contar as colônias e determinar a eficiência de transformação (número de colônias viáveis/ μg de DNA).

- c) Utilizando um palito esterilizado, coletar uma colônia bacteriana isolada e inoculá-la em 3 ml de meio de cultura LB contendo cloranfenicol (50 µg/mL).
- d) Após inoculação, a suspensão de células deverá ser incubada por 18 -24 horas a 37°C sob agitação constante (~200 rpm).

Experimento 3

Extração de DNA plasmidial - Lise Alcalina em pequena escala (MiniPrep)

- a) Transferir 1,5 mL da cultura bacteriana para um microtubo e centrifugar a 12000 x g, por 30 segundos.
- b) Remover o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta, deixando o precipitado de células com a menor quantidade possível de meio de cultura.
- c) Ressuspender o sedimento com 100 µL de solução I. Agitar bem em vortex para completa dispersão das células.
- d) Adicionar 200 µL de solução II e misturar 5 vezes por inversão rápida do microtubo (não usar o vortex), certificando se que todas as células tenham entrado em contato com a solução.
- e) Colocar os tubos no gelo.
- f) Adicionar 150 µL de solução III. Misturar mantendo o microtubo invertido e agitando lentamente com movimentos circulares por aproximadamente 10 seg.
- g) Centrifugar a 12000 x g, por 5 min e transferir o sobrenadante para um novo microtubo.
- h) Adicionar 2 volumes de etanol absoluto, misturar no vortex e incubar por 2 minutos à temperatura ambiente para precipitar o DNA.
- i) Em seguida centrifugar a 12000 x g, por 5 minutos.
- j) Remover cuidadosamente o sobrenadante por inversão e manter o tubo em posição invertida sobre papel absorvente. Remover gotas de sobrenadante que tenham ficado aderidas às paredes do microtubo.
- k) Lavar o DNA precipitado (o qual não é visualizado) com 1 mL de etanol 70%. Remover cuidadosamente o álcool por inversão e manter o tubo em posição invertida sobre papel absorvente.
- l) Deixar o DNA secar ao ar durante por aproximadamente 10 minutos.
- m) Dissolver o DNA em 50 µL de tampão TE ou água ultra-pura esterilizada, misturando brevemente em vortex. Avaliar a qualidade do DNA por meio de eletroforese em agarose.

Experimento 4

Eletroforese em gel de agarose (0,8%)

Os géis de agarose previamente acrescidos de corante já serão levados prontos para esta aula

Aplicação das amostras

- a) Pipetar 10 μ L da amostra de DNA plasmidial e adicionar aos tubos 2 μ L contendo tampão de amostra para eletroforese. Homogeneizar com a pipeta.
- b) Com auxílio da micropipeta, aplicar toda a amostra nos poços do gel de agarose.
- c) Utilizar os poços das extremidades para aplicação do marcador de peso molecular.
- d) Ajustar a voltagem de acordo com o tempo de corrida desejado (média utilizada 100V) e acompanhar a migração das amostras no gel de agarose.
- e) Analisar o gel sob radiação ultravioleta e tirar foto dos resultados obtidos.

Materiais

Extração de DNA plasmidial:

•Solução I:

Glicose 50 mM;

Tris.HCl 25 mM, pH8,0;

EDTA 10 mM, pH8,0.

•Solução II:

NaOH 0,2 N (diluído previamente de uma solução estoque a 10N);

SDS 1%.

•Solução III:

Acetato de potássio 5 M, 60 ml;

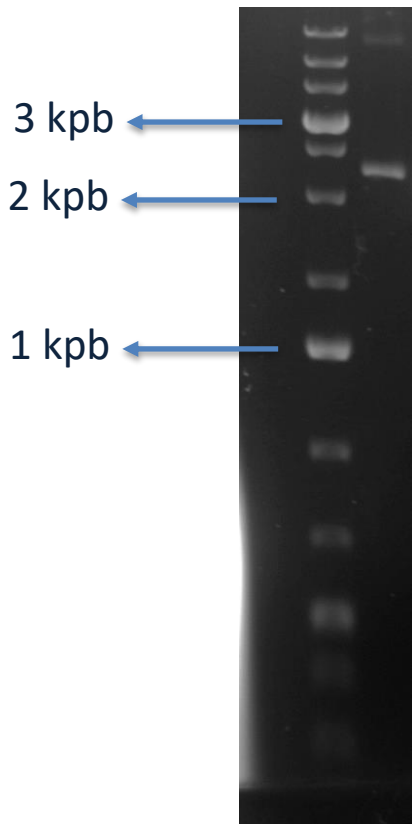
Ácido acético glacial, 11,5 ml;

H₂O (ultra-pura), 28,5 ml.

Referências

Sambrook J, MacCallum P, Russel D. 2000. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Resultado



Na imagem ao lado a canaleta da esquerda corresponde a um marcador de peso molecular. As bandas correspondentes de 1, 2 e 3 Kpb estão indicadas com as setas. Na canaleta da direita foi adicionada a amostra resultante da preparação de DNA plasmidial.

Perguntas

- 1) Qual é a função de cada uma das soluções (I, II e III) durante a extração de DNA plasmidial?
- 2) Porque é necessário realizar a precipitação do DNA com etanol durante o procedimento de miniprep?
- 3) Após a observação do resultado da eletroforese da extração de DNA plasmidial, levando em conta o tamanho do plasmídeo pBC, interprete o resultado obtido.
- 4) Caso o plasmídeo obtido fosse cortado em ambas as fitas por uma enzima de restrição, qual seria o resultado esperado após a eletroforese?