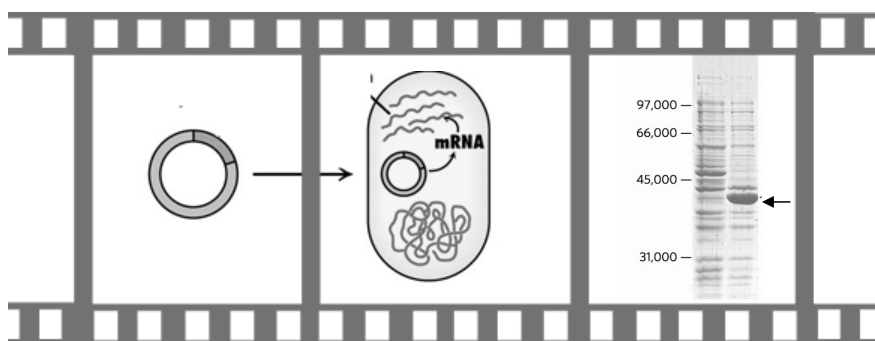


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica

QBQ2457 – Tecnologia do DNA Recombinante

Aulas Práticas de Laboratório Atividades Multimídia



DOCENTES RESPONSÁVEIS:

Proaf. Dra. Carla Columbano de Oliveira

Prof. Dr. Nicolas Carlos Hoch

MONITORES:

Bianca Scigliano Vargas

Valdir Gomes Neto

INTRODUÇÃO

A parte prática da disciplina tem como objetivo realizar a expressão recombinante de uma proteína na bactéria *Escherichia coli*. Para isso, será realizada a clonagem da sequência codificadora de interesse em um vetor de expressão bacteriano, e a expressão da proteína recombinante será verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

A primeira etapa a ser realizada é a amplificação da região codificadora do gene de interesse por meio de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) para posterior clonagem do segmento de DNA amplificado em vetor de expressão bacteriano. Os amplicons são previamente digeridos com enzimas de restrição e em seguida ligados ao vetor de expressão linearizado com enzimas de restrição compatíveis. Após a reação de ligação, é realizada a etapa de transformação em bactérias competentes e seleção dos clones recombinantes. Uma vez verificado o sucesso da clonagem, é realizada a indução da expressão da proteína de interesse e confirmação da expressão pela análise de lisados das bactérias por SDS-PAGE.

Escolhemos a proteína Rrp47 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para expressão recombinante em *E. coli*. Esta enzima é codificada pelo gene **RRP47**. Rrp47 é um cofator da RNase exossomo, presente em praticamente todos eucariotos, mas ausente em bactérias. Sua função fisiológica é ativar o exossomo durante o processamento de RNA ribossomal (rRNA).

Para amplificação da sequência codificadora (CDS) de Rrp47, será usado o DNA genômico da levedura *S. cerevisiae* como molde na reação de PCR. Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) que serão utilizados são complementares ao início e ao fim da CDS e contêm em sua extremidade 5' um sítio de reconhecimento de enzima de restrição, para permitir a clonagem do produto da reação de PCR no sentido apropriado no vetor de expressão.

Os protocolos para cada etapa do procedimento que visa a expressão de Rrp47 recombinante estão apresentados a seguir. É importante que sejam estudados com antecedência. Também é fundamental que cada grupo possua um “caderno de experimentos” onde deverá registrar os resultados obtidos em cada etapa, com indicação da data do experimento, problemas eventualmente encontrados, detalhes metodológicos, etc. Ao final da disciplina, cada grupo deverá entregar um relatório completo reunindo todos os resultados obtidos (positivos ou negativos).

Observe as indicações de segurança do laboratório didático, tais como uso obrigatório de avental, luvas, óculos de proteção, etc.

Cronograma dos Experimentos

13/03	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Lab 1
20/03	Eletroforese do produto de PCR em gel de agarose	Lab 2
27/03	Clivagem do produto de PCR e ligação no vetor de expressão	Lab 3
03/04	Transformação bacteriana com a construção plasmidial Miniprep	Lab 4
10/04	PCR de colônias Eletroforese em gel de agarose	Lab 5
08/05	Indução da expressão da proteína recombinante	Lab 6
15/05	Verificação da expressão (SDS-PAGE)	Lab 7
22/05	Purificação da proteína recombinante	Lab 8

QBQ2457- Lab 1 – PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de *Rrp47*

Neste ensaio de PCR, será utilizado um par de *primers* planejado para amplificação da sequência codificadora (CDS) de *Rrp47* e o DNA genômico da levedura *S. cerevisiae* como molde. Os *primers* a serem utilizados foram planejados como demonstrado na aula passada.

Rrp47_ForBam **GGATCC**ATGGAAGATATCGAAAAGATAAAAC 64 °C (BamHI)

Rrp47_RevXho **CTCGAG**TTCTTCCTCCTTTCTTTTTTC 60 °C (XhoI)

Antes de iniciar, leia todo o protocolo e confirme se todos os reagentes estão disponíveis. A enzima *Taq* DNA polimerase, será fornecida pelos monitores assim que todos os grupos estiverem com os tubos prontos;

Atenção:

- Utilize luvas e evite falar durante a reação, para não contaminar a PCR com o seu DNA;
- Espere todos os reagentes descongelarem antes de pipetar e homogenize com “tapinhas” no fundo dos tubos;
- Mantenha os reagentes no gelo enquanto prepara a reação. Alguns são muito lábeis, em particular a solução de dNTPs
- Separe os reagentes já colocados para não se confundir;
- Identifique seus tubos com o número ou sigla de seu grupo;
- Lembre-se de verificar (e anotar) a sequência do par de primers que será utilizado na PCR.

A amplificação do gene *RRP47* será realizada segundo o protocolo abaixo. O amplicon deve ter ~0,56 kbp.

Serão dois tubos (tubo eppendorf de 0,2mL) por grupo: um de amostra (+) e um controle (-)/sem DNA molde.

- Descongele todos os reagentes, mantendo-os no gelo e separe os reagentes já colocados, para não se confundir, deixando o tubo sempre no gelo;
- Pipete todos os reagentes na ordem abaixo, a exceção do DNA*, que será substituído pelo mesmo volume de água no tubo

	Estoque	Concentração Final	Amostra (+)	Controle (-)
Água ultra-pura autoclavada			37,5 µL	38,5 µL
Solução de dNTPs	10mM	0,2mM	1 µL	1 µL
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	3 µL	3 µL
Primer Forward	10 µM	0,2 µM (0,2pmol/µL)	1 µL	1 µL
Primer Reverse	10 µM	0,2 µM (0,2pmol/µL)	1 µL	1 µL
Buffer <i>Taq</i> 10x	10x	1x	5 µL	5 µL
<i>Taq</i> Polimerase padrão (NEB, Invitrogen, ou equivalente)	5U/µL	2,5U	0,5 µL	0,5 µL
DNA molde (50ng/µL)*	---	---	1µL	---
Volume final	---	---	50µL	50µL

Todos os grupos usarão o mesmo programa do termociclador, portanto mantenha seus tubos no gelo até que todos estejam prontos.

A reação de PCR será feita com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	20 seg	
55°C	20 seg	35
58°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

O programa deve demorar cerca de 90 minutos. **Neste intervalo, verifique como os *primers* que você utilizou foram planejados e confirme suas sequências. Atividade em sala de aula.**

Ao final da reação, retire os tubos do termociclador. Centrifugue rapidamente (certifique-se que não há gotas de líquido na tampa). Pipete 5µL no fundo de um tubo de 1,5 mL e mantenha o restante no próprio tubo. Armazene seus tubos a -20°C até a próxima aula.
