**QBQ1354 - AULA PRÁTICA 2 (22/06/2023)**

**Hoje serão realizados dois experimentos**

1. Transformação de bactérias com plasmídeo recombinante.

2. PCR e eletroforese em gel de agarose.

**Uma vez que cada experimento é demorado, no final deste documento indica-se a ordem com que as etapas de cada experimento devem ser realizadas. Leia atentamente antes de começar.**

**1. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COM PLASMÍDEO RECOMBINANTE**

**Objetivo:** Ilustrar uma das técnicas muito utilizadas para a clonagem de genes de eucariotos e procariotos em sistemas bacterianos.

**Fundamento:** O processo de transformação bacteriana consiste na introdução do DNA de um vetor (plasmídeo) numa bactéria e sua posterior manutenção como elemento autônomo auto‐replicativo. Esse processo pode ser realizado de duas maneiras principais: eletroporação e transformação química (ver Colóquio).Na transformação química, a ser utilizada nesta aula, as bactérias ***E. coli* DH5α** foram tornadas “competentes” para receber o DNA plasmidial por tratamento prévio (a frio) com CaCl2 0,1 M em tampão acetato de sódio 20 mM pH 6,5.

O mapa de restrição e as características do plasmídeo pET28a a ser utilizado na aula constam no esquema abaixo. Verifique no esquema a posição da Origem de replicação, um marcador de resistência para canamicina (Kan) e o sítio de clonagem múltipla (MCS). No sítio de restrição para *Bam*Hi foi clonado o gene ***Rrp47***da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O gene foi clonado a partir da amplificação por PCR do DNA genômico da levedura com iniciadores (*primers*) específicos. (ver Experimento 2).



**Procedimento experimental**

1. Marcar dois tubos eppendorf de 2 mL (1 e 2) e deixar no gelo.

2. Distribuir 0,1 mL da suspensão de bactérias competentes em cada tubo.

3. Adicionar:

**Tubo 1**: 2 μL do DNA do plasmídeo recombinante + 18 μL de tampão TE

**Tubo 2**: 20 μL de tampão TE (controle).

Incubar em gelo por 30 min.

4. Transferir os tubos do gelo para o banho a 42 °C por exatamente 2 minutos e voltar os tubos para o gelo por 5 min.

5. Adicionar a cada tubo 0,6 mL de meio LB (10 g/L Triptona, 5 g/L Extrato de levedura; 5 g/L NaCl) e incubar a 37 °C sem agitação por uma hora. Neste período as bactérias se recuperam do estresse.

**Observação: durante esta etapa, em que se deve aguardar por uma hora, realizar o experimento de PCR descrito abaixo.**

6. Cada grupo receberá duas placas de Petri contendo LB-Agar + Kanamicina.

Escreva o nome do seu grupo e número da placa **na parte inferior da placa onde está o agar.**

7. Após recuperação, centrifugar as culturas e desprezar 600 µL do sobrenadante, deixando 100 μL da solução no fundo do tubo. Ressuspender as células e palquear os 100 μL de cada tubo nas placas, de acordo com o esquema abaixo. Espalhar as bactérias com o auxílio de uma alça de vidro, previamente flambada em álcool e, em seguida, resfriada na própria tampa da placa de Petri.

|  |  |
| --- | --- |
| **Placa** | **Nome** |
| 1 | Tubo 1 – Plasmídeo recombinante |
| 2 | Tubo 2 - Controle |

8. Deixar secar por aproximadamente 5 minutos com a tampa um pouco aberta.

9. Levar as placas (invertidas) para estufa a 37 oC por um período de ~16 horas para aguardar o crescimento das colônias.

10. No dia seguinte, **um estudante de cada grupo deverá ir ao laboratório para analisar o resultado do experimento e tirar fotos das duas placas.**

**Relatório**

Nota: Não é necessário copiar o procedimento. Apenas responda as perguntas abaixo.

1. Anexe as fotografias das placas e **descreva** e **comente** os resultados obtidos para as placas 1 e 2. Em quais placas houve crescimento de colônias? Justifique os resultados.

2. Qual a vantagem da presença do marcador de resistência no vetor usado para a clonagem gênica?

3. Pesquise: Qual o mecanismo de ação da Canamicina na bactéria?

4. Analise o mapa de restrição do vetor pET28a. No sítio de clonagem múltipla quantos sítios para enzimas de restrição estão representados?

5. Como pode ser recuperado o gene *Rrp47*a partir do plasmídeo recombinante?

**2. PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

**Objetivo**: Amplificar o gene ***Rrp47*** de *Saccharomyces cerevisiae*utilizando como molde o DNA deste organismo.

**Fundamento:** a reação de PCR é uma técnica utilizada para produzir grande número de cópias de um fragmento específico de DNA. Essa técnica pode ser utilizada para inúmeras finalidades, como por exemplo diagnóstico e clonagem gênica.

Neste ensaio, será utilizado um par de *primers* desenhado para a amplificação da sequência do gene ***Rrp47,*** Primers Rrp47\_ Forward e Rrp47-Reverse

Antes de iniciar, leia todo o protocolo e confirme se todos os reagentes estão disponíveis.

Atenção:

* Utilize luvas e evite falar durante a reação para não contaminar o material com o seu DNA.
* Espere todos os reagentes descongelarem antes de pipetar. Homogenize o conteúdo com “tapinhas” no fundo dos tubos.
* Mantenha os reagentes no gelo enquanto prepara a reação. Alguns reagentes 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!!!!**

A amplificação do gene *Rrp47* será realizada segundo o protocolo abaixo.

Cada grupo preparará dois tubos eppendorf pequenos: um de amostra (+) contendo o DNA molde de *Saccharomyces cerevisiae*, e um controle negativo (-), sem DNA molde.

1. Pipete os reagentes indicados na tabela abaixo, na seguinte ordem: H2O, GoTaq Master mix e DNA molde nos tubos da PCR.

**Nota: A GoTaq Master mix já foi preparada e contém: Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl2, tampão adequado e os primers Forward e Reverse.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Amostra (+) | Controle (-) |
| H2O | **9,5 µL** | **10,5 µL** |
| GoTaq Master mix | **14,5 ul** | **14,5 ul** |
| DNA molde (50ng/uL) | **1uL** | **---** |
| Vol. final | **25µL** | **25µL** |

Todos os grupos usarão o mesmo programa do termociclador, portanto mantenha seus tubos no gelo até que todos os grupos tenham terminado de preparar as amostras.

1. A reação de PCR será feita com o seguinte programa já instalado no termociclador

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Temperatura | Tempo | Ciclos |
| 95oC | 2 min | 1 |
| 95oC60oC | 30 seg30 seg | 35 |
| 72oC | 1 min |  |
| 72oC | 7 min | 1 |
| 4oC | ∞ |  |

Nota: Enquanto a PCR se desenvolve, retorne para a Experiência 1.

1. Ao final da reação de PCR, retire os tubos do termociclador. Centrifugue rapidamente (certifique-se que não há gotas de líquido na tampa). Mantenha no gelo.

**Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR**

Nota: O gel já está pronto. Os grupos irão analisar o produto da PCR em conjunto.

**ATENÇÃO: O gel contém brometo de etídeo, um possível carcinógeno. Portanto, use luvas na manipulação. CUIDADO COM O BROMETO DE ETÍDEO!!!**

1. Preparo das amostras.

Pipete 10 µL do produto da PCR das amostras (+) e (-) no fundo de cada tubo de 1,5 mL. Adicione 2,5 µL do tampão de amostra da eletroforese.

1. Aplique todo o volume da amostra nos poços do gel de agarose.

Nota: Em cada gel será aplicado também um marcador de tamanho (DNA ladder) e um controle positivo da reação.

Condições da Eletroforese:

- Tampão de corrida: tris-acetato-EDTA (TAE) pH 7,5.

- Corante: Brometo de etídeo

- Voltagem aplicada: 150 V.

Nota: A corrida eletroforética demora bastante. As técnicas do LBBM se encarregarão de retirar o gel e guardar até o dia seguinte.

Os monitores prepararam um gel demonstrativo.

1. No dia seguinte, **um estudante de cada grupo deverá ir ao laboratório para tirar fotos do gel.**

**Relatório**

Nota: Não é necessário copiar o procedimento. Apenas responda as perguntas abaixo.

1. Anexe a foto do gel.

**Na foto**: Indique a posição dos polos + e – da eletroforese. Indique a localização (a) das amostras de seu grupo; (b) do marcador de tamanho (DNA ladder); (c) do controle positivo da reação.

 2. Por comparação com o padrão de migração do marcador de tamanho molecular, estime o tamanho do produto amplificado do gene ***Rrp47*** de *Saccharomyces cerevisiae* e do DNA cuja amostra você aplicou.

**Procedimento Geral para as experiências 1 e 2**

* Começar com a Experiência 1: Transformação de bactérias com plasmídeo recombinante.

Etapas de 1 a 5.

* Enquanto as bactérias são incubadas por 1h a 37°C para recuperação (etapa 5), iniciar a

Experiência 2: PCR (etapas 1 e 2).

* Enquanto a amplificação da PCR acontece no termociclador, retorne para a Experiência 1 e realize as etapas 6 e 7 (Plaqueamento da transformação em meio seletivo).
* Retorne para a Experiência 2 e realize as etapas 3, 4 e 5.
* Visualize o aspecto do gel de agarose após eletroforese (gel demonstrativo).
* No dia seguinte, sexta-feira, **um estudante de cada grupo deverá ir ao laboratório para tirar fotos das placas e do gel.**