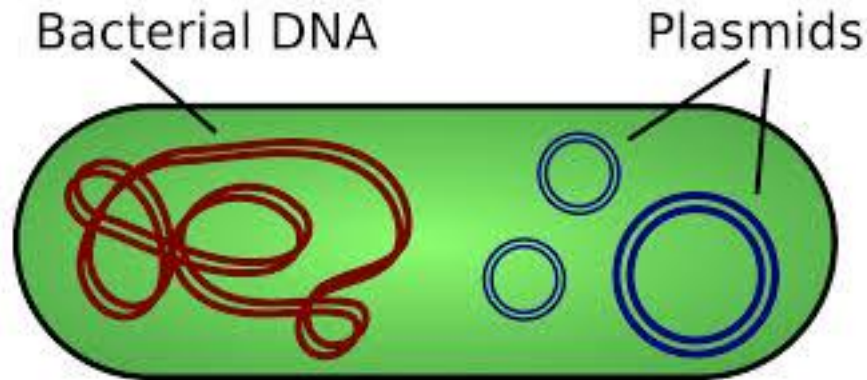
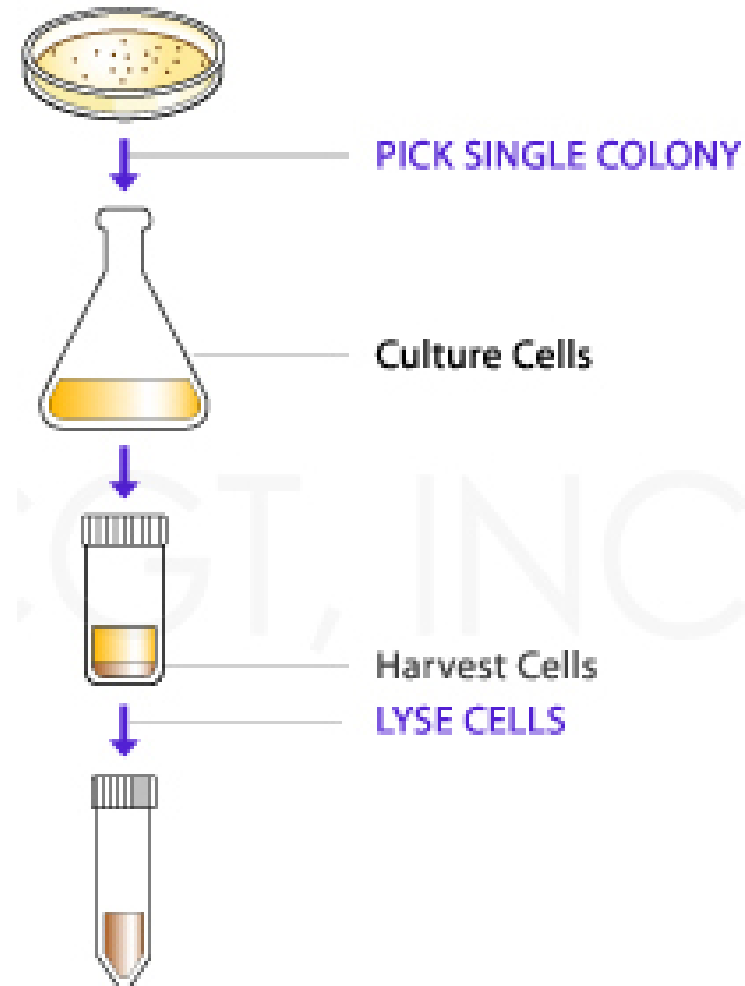


# Extração e purificação de DNA plasmidial em pequena escala: “MINIPREP”



# Pré-requisitos

- Crescer a cultura bacteriana a partir de uma colônia até a fase log
- Centrifugar as células
- Lisar as células



# Métodos

O método de lise é o variável, sendo dependente de 3 fatores:

– **O tamanho do plasmídeo**

- Plasmídeos > 15kb são + suscetíveis a danos

– **A linhagem de *E. coli***

- Linhagem que liberam carboidratos quando aquecidas (ex. HB101) podem interferir na qualidade do DNA

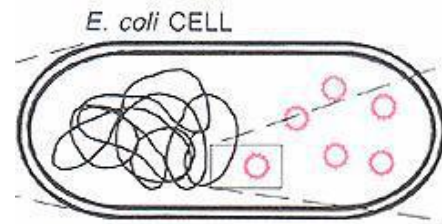
– **Qual será o uso posterior do DNA**

- Contaminação com outros componentes pode ser um problema...

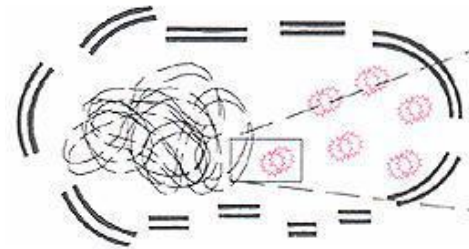
# O método de Lise Alcalina

- Birnboim and Doly, 1979
  - Método de rotina mais popular, pois é :
    - Simples;
    - De baixo custo relativo
    - Reprodutível

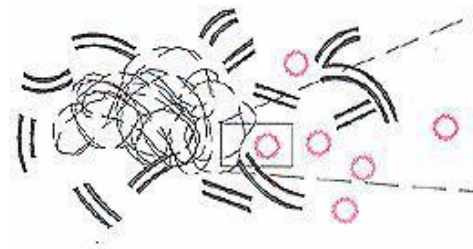
A combinação alto pH e um detergente fortemente aniônico (SDS) rompe a célula, desnatura o DNA cromossomal e proteínas e libera o plasmídeo no sobrenadante.



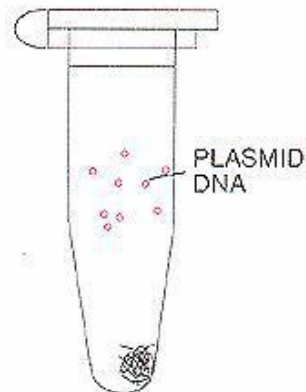
shows the plasmid  
DNA and  
chromosomal DNA



addition of NaOH  
causes denaturation of  
plasmid DNA and  
chromosomal DNA



Acid addition  
neutralizes the base  
and in turn renatures  
the DNA and plasmid



The chromosomal DNA  
caught within the SDS/  
lipids is pellet down in  
centrifuge and the plasmid  
DNA is found in the  
lysate.

PRECIPITATE  
CONTAINING  
CHROMOSOMAL  
DNA

# Endonucleases de Restrição

- Encontradas em procariontes
- Purificadas de bactérias partir de 1973.
- “Enzimas que reconhecem uma seqüência específica DNA, promovendo a clivagem de ambas as fitas”.

Qual o significado biológico?  
Sistema de modificação-restrição



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton O. Smith

- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978 was awarded jointly to Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton O. Smith "for the discovery of **restriction enzymes** and their application to **problems of molecular genetics**" in 1970.

# Tipos de endonucleases de restrição

- Tipo I: catalisa a clivagem em sítios randômicos que podem estar até 1000pb da seq. reconhecida;
- Tipo II: Reconhecem uma seq. de DNA e “clivam” dentro ou próximo ao sítio de reconhecimento; a maioria reconhece seqüências palindrômicas (simétricas).
- Tipo III: Promovem a clivagem a cerca de 25pb do sítio de reconhecimento

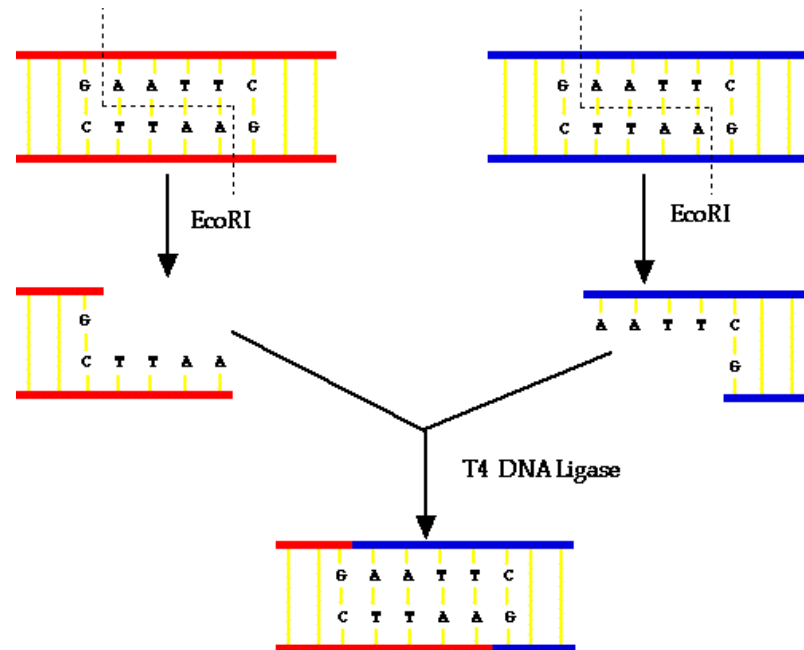


# Enzimas do Tipo II

## Tipo II (93%) :

Reconhecem uma seq. de DNA simétrica e “clivam” dentro dessa sequência;

Sequência de reconhecimento com 4 a 8 bases;



# Enzimas do Tipo II

**Algumas reconhecem sequências  
descontínuas:**

Bgl I GCCNNNNNGGC

GCCNNNN↓NGGC  
CGGN↓NNNNCCG

Microrganismo	Enzima	Sequência Alvo
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	<pre>       ↓     G A   A T T C     C T   T A A G       ↑ </pre>
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	<i>BamHI</i>	<pre>       ↓     G G   A T C C     C C   T A G G       ↑ </pre>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>BglII</i>	<pre>       ↓     A G   A T C T     T C   T A G A       ↑ </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeII</i>	<pre>       ↓ Pu  G   C G C Pi Pi  C   G C G B       ↑ </pre>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindIII</i>	<pre>       ↓     A A   G C T T     T T   C G A A       ↑ </pre>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i>	<pre>       ↓     C T   G C A G     G A   C G T C       ↑ </pre>
<i>Streptococcus albus G</i>	<i>SalI</i>	<pre>       ↓     G T   C G A C     C A   G C T G       ↑ </pre>
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	<pre>       ↓     T C G A     A G C T       ↑ </pre>
<i>Brevibacterium albidium</i>	<i>BalI</i>	<pre>       ↓     T G G C C A     A C C G G T       ↑ </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	<pre>       ↓   ( A G G ( G C T     T C C ( G G A       ↑ </pre>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	<pre>       ↓     C C C G G G     G G G C C C       ↑ </pre>

# Simbologia, de acordo com NC-IUB (1988):

**R** = purina

**Y** = pirimidina

**N** = qualquer base

**M** = A ou C

**K** = G ou T

**S** = G ou C

**W** = A ou T

**H** = A ou C ou T

**B** = G ou T ou C

**V** = G ou C ou A

**D** = G ou A ou T

↓ = indica o sítio de clivagem

## Isoesquizômeros:

→ enzimas que reconhecem a mesma sequência alvo e promovem o mesmo tipo de clivagem.

REBASE: The Restriction Enzyme  
Database

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

# Qual o tamanho médio do fragmento produzido após clivagem genômica por uma endonuclease de restrição?

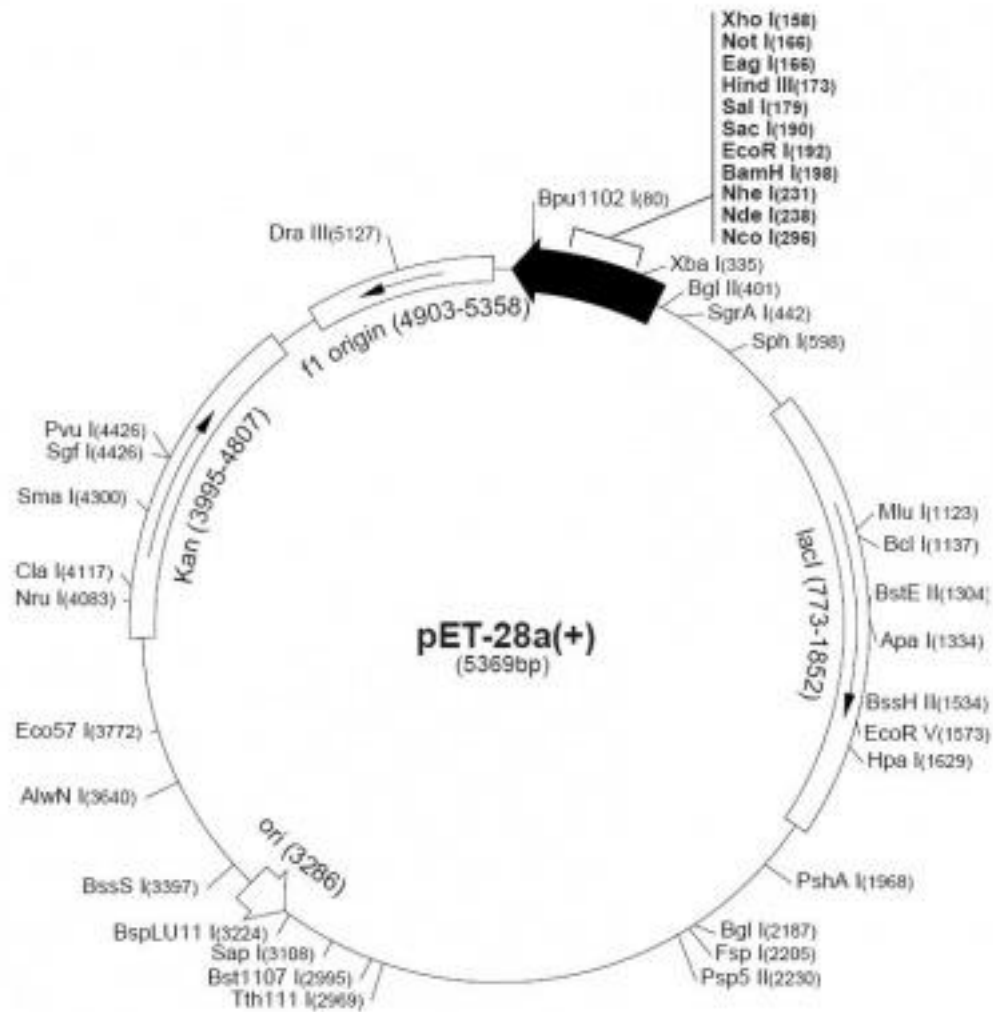
- Depende da frequência com que o sítio de reconhecimento ocorre:
  - sítio com 6 bases: ocorre em média a cada  $4^6$  (4096 pb)
  - sítio com 4 bases:  $4^4$ (256 pb)

# Quanto usar da enzima?

- 1 U da endonuclease de restrição = quantidade de enzima necessária para digerir 1ug de DNA em 1 hora num volume de 50uL.

Obs. Considerando um DNA linear....

O DNA deve estar livre de contaminantes







**pGEX-5X-1 (27-4584-01)**

Factor Xa

Ile	Glu	Gly	Arg	Gly	Ile	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His	Arg	Asp	
ATC	GAA	GGT	CGT	GGG	ATC	CCC	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT	CGT	GAC	TGA
				BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I					Stop codons

