

Aula Prática 01: EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Streptomyces clavuligerus*

O gênero *Streptomyces* inclui bactérias gram-positivas filamentosas pertencentes à Ordem dos Actinomicetos (Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales). *Streptomyces* são encontradas em solo, água doce e salgada e produzem diversos antibióticos que, possivelmente, estão envolvidos no processo de competição por nutrientes com outros organismos. Mais de 50 antibióticos diferentes (actinomicina, cefamicina C, cloranfenicol, canamicina, neomicina, estreptomina etc) e outros agentes farmacêuticos, tais como agentes antitumorais e imunossuppressores, têm sido isolados de *Streptomyces* por meio das complexas vias de metabólitos secundários. *Streptomyces clavuligerus* produz uma variedade de compostos β -lactâmicos, incluindo cefamicina C, penicilina N, ácido clavulânico e várias outras clavamas.

A. Extração de DNA genômico

Células de *S. clavuligerus* foram cultivadas em 20 mL de meio ISP2 a 28 °C sob agitação por 48 h, e então centrifugadas a 4.000 rpm por 30 min. Cerca de 200 mg das células foram armazenados a -20 °C até o momento da extração do DNA genômico.

- 1) Adicione às células, 480 μ L da solução de 50 mM de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) e ressuspenda-as, gentilmente, por pipetagem.
- 2) Adicione 120 μ L da solução de lisozima (10 μ g/mL) e misture por pipetagem.
- 3) Incube as células a 37 °C por 30 min.
- 4) Centrifugue a amostra a 13.000 rpm por 10 min.
- 5) Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o.
- 6) Adicione ao precipitado 600 μ L da solução de lise e ressuspenda-o gentilmente para não formar bolhas. A solução de lise contém 10 mM de Tris-HCl [Tris (Hidroximetil) Aminometano] pH 8,0; 250 mM de EDTA pH 8,0; e 2,5% de SDS (Dodecil sulfato de sódio).
- 7) Incube a 80 °C por 5 min.
- 8) Espere esfriar a temperatura ambiente.
- 9) Adicione 200 μ L da solução de 8 M de acetato de amônio e misture por inversão.
- 10) Incube no gelo por 5 min.
- 11) Centrifugue a 13.000 rpm por 5 min.
- 12) Transfira o sobrenadante cuidadosamente (sem pegar material precipitado) para um tubo limpo.
- 13) Adicione 600 μ L de isopropanol gelado. Misture por inversão.
- 14) Centrifugue a 13.000 rpm por 2 min.
- 15) Descarte o sobrenadante com cuidado, para não remover o precipitado.
- 16) Adicione 600 μ L de etanol 70% gelado e misture cuidadosamente para lavar o precipitado.
- 17) Centrifugue a 13.000 rpm por 2 min.
- 18) Descarte o sobrenadante.
- 19) Deixe o tubo aberto e invertido sobre um papel na bancada por cerca de 15 min para evaporar o etanol.
- 20) Ressuspenda o material obtido em 30 μ L de água milli-Q.

Questões

- 1) Nas etapas 1 e 2, quais são as funções do EDTA e da lisozima? Quais as fontes naturais mais abundantes de lisozima?
- 2) Na etapa 3, por que deve-se incubar a amostra a 37 °C?
- 3) O que contém o sedimento obtido na etapa 4?
- 4) Quais as funções de cada reagente da solução de lise empregada na etapa 6?
- 5) Na etapa 7, qual a função da temperatura?
- 6) Na etapa 9, qual a função do acetato de amônio? Por que a mistura deve ser feita por inversão somente?
- 7) Na etapa 13, qual a função do isopropanol?
- 8) Na etapa 16, qual a função do etanol 70%?
- 9) O material obtido ao final do processo (etapa 20) é somente DNA? Justifique.