

Aula Prática 4: PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR, REAÇÃO DE LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Iniciamos o curso com a extração do DNA genômico da bactéria *Streptomyces clavuligerus*. Em seguida, verificamos a integridade do DNA genômico através de eletroforese em gel de agarose e realizamos a técnica de PCR para amplificar a ORF (região codificante) do gene *cas2*.

Para a aula de hoje, o produto de PCR correspondente à ORF *cas2* foi previamente purificado e quantificado espectrofotometricamente. Então, o produto de PCR purificado (denominado inserto) foi ligado ao plasmídeo pUC19 (denominado vetor de clonagem).

Na aula de hoje, iniciaremos com a demonstração da purificação do produto de PCR. A seguir, cada grupo receberá o vetor ligado ao inserto (pUC19::*cas2*) para transformá-lo na bactéria *Escherichia coli* (linhagem DH5 α).

A. Eletroforese do produto de PCR

- 1) Ao tubo contendo 40 μ L do produto de PCR, foram adicionados 5 μ L de tampão de amostra .
- 2) A mistura foi aplicada em uma canaleta do gel de agarose 0,8% à voltagem de 120 V por aproximadamente 30 min.

B. Purificação do produto de PCR (procedimento já realizado, mas que será realizado novamente para demonstração)

Utilizamos o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) para purificar o produto de PCR. Informações detalhadas sobre o kit estão disponíveis em:

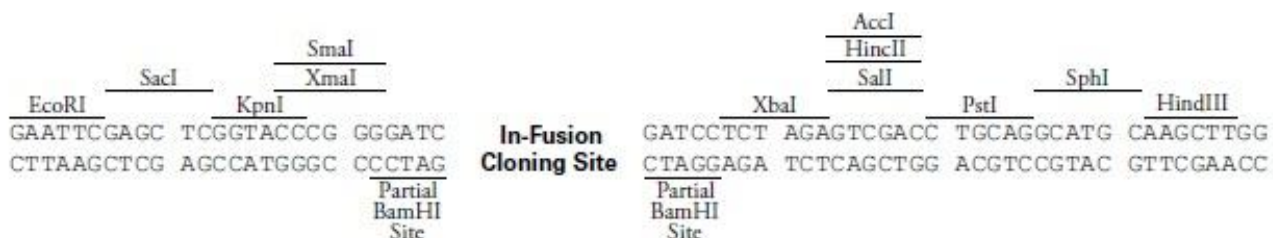
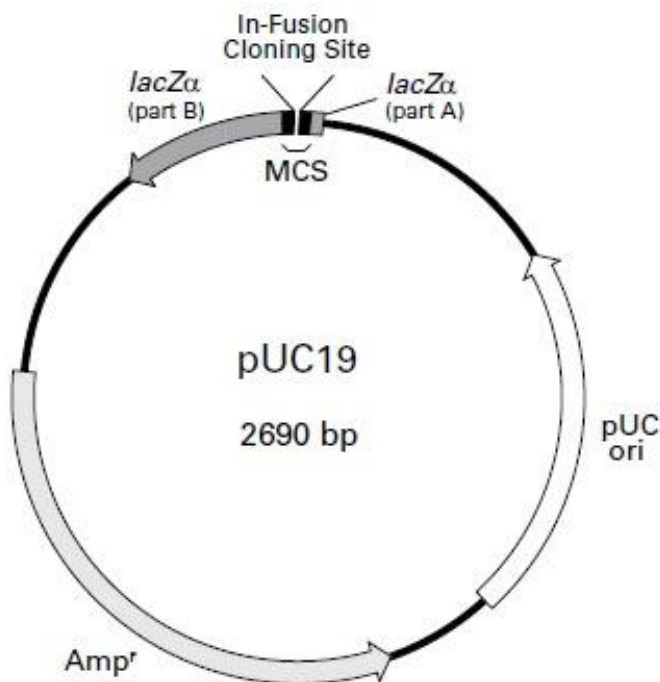
<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/>

Segue o procedimento:

- 1) Pese e identifique um tubo de 1,5 mL.
- 2) Com auxílio de uma lâmina de metal, recorte o fragmento do gel e coloque-o dentro do tubo de 1,5 mL.
Atenção: retire o fragmento de DNA no menor volume possível de agarose.
- 3) Pese o tubo novamente e determine a massa do gel.
- 4) Para cada 10 mg de gel, adicione 10 μ L da solução de ligação à membrana (*Membrane Binding Solution*), que contém isotiocianato de guanidinina, um sal caotrópico.
- 5) Incube a 65 °C até derreter completamente o gel (cerca de 10 min).
- 6) Sobre um suporte de tubos, coloque uma mini-coluna dentro de um tubo de coleta.
- 7) Transfira o gel dissolvido para a mini-coluna e incube por 1 min.
- 8) Centrifugue a 14.000 rpm por 1 min. Descarte o líquido que passou pela coluna e está no tubo de coleta.
- 9) Adicione 700 μ L da solução de lavagem da membrana (*Membrane Wash Solution*), que contém etanol 95%.
- 10) Centrifugue a 14.000 rpm por 1 min. Descarte o líquido que passou pela coluna e está no tubo de coleta.
- 11) Adicione 500 μ L da solução de lavagem da membrana (*Membrane Wash Solution*).
- 12) Centrifugue a 14.000 rpm por 5 min. Descarte o líquido que passou pela coluna e está no tubo de coleta.
- 13) Centrifugue a 14.000 rpm por 1 min com a tampa do rotor aberta para retirar o excesso de líquido da coluna.
- 14) Coloque a coluna em um tubo de 1,5 mL.
- 15) Adicione 30 μ L de água livre de nucleases (*Nuclease-free water*) e incube por 1 min.
- 16) Centrifugue a 14.000 rpm por 1 min.
- 17) Descarte a mini-coluna e identifique o tubo de 1,5 mL.
- 18) Armazene o produto de PCR purificado a -20 °C.

B. Reação de ligação do produto de PCR purificado ao plasmídeo comercial pUC19 (procedimento já realizado)

pUC19 é um vetor de clonagem de alta taxa de replicação. O vetor possui um sítio múltiplo de clonagem (MCS, *Multiple Cloning Site*) que permite a clivagem para gerar terminações abruptas (*blunt ends*), conforme visto na figura abaixo. O sítio múltiplo de clonagem é um local reconhecido por diferentes enzimas de restrição, o que o torna conveniente para a inserção de fragmentos de DNA. Adicionalmente, o vetor possui uma origem de replicação (pUC ori), um gene que confere resistência a ampicilina (Amp^r) e o gene *lacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase, responsável pela clivagem de β -galactosídeos em monossacarídeos.



O sítio múltiplo de clonagem encontra-se inserido dentro da região codificante do gene *lacZ* α . Quando não há ligação do inserto (DNA de interesse) no vetor, o gene *lacZ* α é transcrito produzindo a enzima β -galactosidase. O reagente X-Gal, um análogo da galactose, é usado como substrato e, após metabolizado, torna a colônia bacteriana azul.

Se, ao contrário, a região codificante do gene *lacZ* α fica interrompida pela introdução do inserto no vetor, o gene *lacZ* α não é transcrito corretamente e a enzima β -galactosidase não é produzida. Conseqüentemente, o reagente X-Gal não é metabolizado e a colônia bacteriana permanece branca.

Procedimento já realizado (não é necessário repetir essa etapa)

1) Em um tubo de 0,5 mL, **foram adicionados:**

- 1 µL do plasmídeo pUC19 (50 ng) digerido com a enzima *SmaI*
- 10 µL do produto de PCR purificado (300 ng)
- 1,5 µL do tampão de ligação (10X)
- 1 µL de *T4 DNA ligase* (5 U/µL)
- 2,5 µL de água milli-Q para completar um volume final de 15 µL

2) A reação de ligação foi incubada a 4 °C por 24 h.

C. Transformação bacteriana

A técnica conhecida como transformação permite a introdução de um plasmídeo na célula bacteriana. Este DNA exógeno passa a fazer parte do material genético bacteriano que será herdado pelas novas células à medida que a bactéria se multiplica. Neste procedimento, utilizaremos o método de transformação de células bacterianas competentes (linhagem DH5α de *Escherichia coli*) para introduzir o vetor pUC19::cas2.

Todo o procedimento deve ser realizado em um ambiente estéril.

- 1) Coloque um microtubo contendo 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α no gelo.
- 2) Adicione 10 µL da reação de ligação às células, misture delicadamente e incube no gelo por 30 min.
- 3) Submeta as células ao choque térmico: retire rapidamente o microtubo do gelo e coloque-o por exatamente 2 min. no banho-maria a 42 °C. Em seguida, recoloque-o no gelo.
- 4) Adicione às células 250 µL de meio de cultura LB e incube-as a 37 °C, 150 rpm, por 45 min.
- 5) Sobre a bancada há uma placa de meio LB (*Lysogenic Broth*) sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 0,1 mg/mL de X-Gal. Plaqueie 200 µL das células transformadas com o auxílio de uma alça de Drigalski.
- 6) Incube a placa a 37 °C por 12 h a 24 h.
- 7) Estoque as placas a 4 °C.

D. Questões

Sobre a purificação de DNA

- 1) Realizamos a purificação do produto de PCR para retirar componentes que estavam presentes durante a PCR e que poderiam atrapalhar a eficiência da etapa de ligação do produto de PCR ao plasmídeo de clonagem. Quais são esses componentes e como poderiam interferir nas etapas seguintes?
- 2) Qual a função do sal caotrópico na solução de ligação à membrana?
- 3) Por que a solução lavagem da membrana não elui (retira) o DNA da coluna, mas a água sim?

Sobre a reação de ligação

- 4) No processo de clonagem de DNA, o inserto pode ser ligado em um plasmídeo de clonagem e, posteriormente, pode ser retirado do plasmídeo de clonagem e transferido para um plasmídeo de expressão. Quais são as diferenças básicas entre um plasmídeo de clonagem e um de expressão?
- 5) Qual é a função de um gene de resistência a antibiótico em um plasmídeo?

Sobre a transformação

- 6) Quais são as características da linhagem DH5 α de *E.coli* que a tornam conveniente para propagação ou manutenção do plasmídeo?
- 7) Quais são as funções do IPTG, X-Gal e ampicilina?