

**Aula Prática 5: EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL
E DIGESTÃO PLASMIDIAL COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**

Na aula anterior, realizamos a ligação do produto de PCR (ORF de *cas2*) ao vetor de clonagem pUC19 e, em seguida, inserimos essa construção em células competentes de *E.coli* DH5- α através de transformação. As colônias crescidas depois da transformação foram capazes de crescer na presença de ampicilina e tiveram a coloração branca ou azul. Assim, uma colônia branca foi inoculada em 5 mL de meio LB estéril, contendo 100 μ g/mL de ampicilina, e incubada a 37 °C, 150 rpm, *overnight*. Na aula de hoje, realizaremos a extração do vetor (DNA plasmidial) desta colônia.

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL POR LISE ALCALINA

A. Procedimento

- 1) Transfira 1,5 mL da cultura bacteriana para um tubo de 2 mL. Centrifugue a 13.000 rpm por 1 min e descarte o sobrenadante.
- 2) Repita a etapa 1, utilizando o mesmo tubo.
- 3) Adicione 100 μ L da **Solução 1** gelada (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0). Ressuspenda as células gentilmente por pipetagem e incube a temperatura ambiente por 5 min.
- 4) Adicione 200 μ L da **Solução 2** (200 mM de NaOH e 1% de SDS). Agite o tubo por inversão suave (5 vezes) e incube a temperatura ambiente **exatamente** por 5 min.
- 5) Adicione, **imediatamente**, 150 μ L da **Solução 3** (5 M de acetato de potássio pH 4,8). Agite o tubo por inversão suave (5 vezes) e incube no gelo por 5 min. Nesta etapa deve ser formado um aglomerado branco.
- 6) Centrifugue a 13.000 rpm por 5 min e transfira o sobrenadante para um tubo novo. **Atenção:** não colete o material que se forma na interface das soluções!
- 7) Adicione 800 μ L de etanol absoluto gelado, agite o tubo por inversão suave e incube no gelo por 2 min.
- 8) Centrifugue a 13.000 rpm por 3 min. Nesta etapa deverá ser observado um pequeno precipitado.
- 9) Descarte o sobrenadante, adicione 1 mL de etanol 70% gelado e agite o tubo por inversão suave.
- 10) Centrifugue a 13.000 rpm por 3 min.
- 11) Descarte o etanol (**cuidado para não descartar o DNA precipitado**) e deixe o tubo aberto, invertido sobre papel, a temperatura ambiente até o DNA não mais apresentar odor de álcool (cerca de 20 min).
- 12) Ressuspenda o DNA em 20 μ L de água milli-Q.
- 13) Estoque o DNA a -20 °C.

B. Questões

- 1) Explique o papel das soluções 1, 2 e 3, e esclareça como este método permite separar o DNA plasmidial do genômico.
- 2) Discuta se há limitação do tamanho do plasmídeo que pode ser recuperado por tal técnica.
- 3) Pesquise outro protocolo comumente utilizado para a purificação de plasmídeos bacterianos (usando resina de sílica, por exemplo) e compare-o com a técnica que utilizamos.

DIGESTÃO PLASMIDIAL COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para que a sequência codificante de *cas2* possa ser expressa pela célula produzindo a proteína clavaminato sintase recombinante, é necessário que ela se encontre em um plasmídeo de expressão e em uma linhagem bacteriana apropriada para expressão heteróloga, denominada linhagem de expressão.

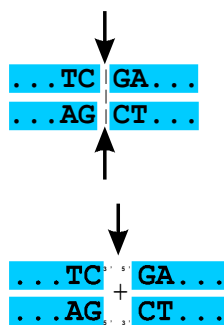
Usaremos enzimas de restrição para retirar o inserto *cas2* do plasmídeo pUC19 e, posteriormente, inseri-lo em um plasmídeo de expressão (pET28a ou pGEX-5X-1). Para isso, faremos a digestão com as enzimas de interesse, seguindo-se a purificação do inserto em gel de agarose.

Posteriormente, o fragmento de DNA digerido e purificado (inserto) será ligado ao vetor de expressão (previamente digerido com as mesmas enzimas utilizadas para a clivagem do fragmento de DNA de interesse) e esse novo vetor será usado na transformação de uma linhagem para expressão.

A. Enzimas de restrição

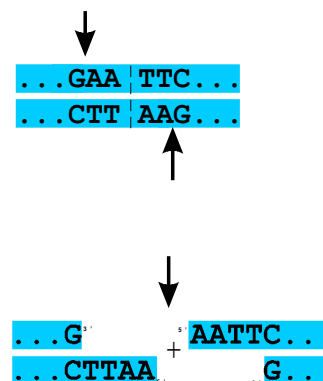
As enzimas de restrição, ou endonucleases de restrição, são enzimas que catalisam a clivagem do DNA através do reconhecimento de sequências nucleotídicas específicas. Elas são divididas em várias classes, dependendo da estrutura, da atividade e dos sítios de reconhecimento e clivagem. As enzimas do Tipo II, as mais usadas na rotina em Biologia Molecular, são proteínas que em geral clivam o DNA no mesmo sítio do seu reconhecimento. O sítio de reconhecimento deste tipo de enzima possui de 4 a 8 nucleotídeos e é normalmente uma sequência palindrômica, isto é, tem um eixo de simetria, sendo que a sequência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida no sentido oposto.

a) Clivagem no eixo de simetria



Moléculas com extremidades abruptas

b) Clivagem simetricamente situada ao redor do eixo de simetria



Moléculas com extremidades coesivas

B. Plasmídeo de expressão pGEX-5X-1

Utilizaremos as enzimas *Bam*HI e *Xho*I para retirar o fragmento de DNA (correspondente a região codificante do gene *cas2*) do plasmídeo de clonagem pUC19. Posteriormente, o plasmídeo de expressão pGEX-5X-1, aberto com essas mesmas enzimas, será ligado ao inserto através das extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição.

Veja o mapa do vetor de expressão anexo.

C. Plasmídeo de expressão pET28a (+)

Utilizaremos as enzimas *Nde*I e *Xho*I para retirar o fragmento de DNA que codifica *cas2* do plasmídeo de clonagem pUC19. Posteriormente, o plasmídeo de expressão pET28a, aberto com essas mesmas enzimas, será ligado ao inserto através das extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição.

D. Digestão enzimática

Atenção: A reação deve ser preparada no gelo.

1) Para um volume final de 25 μL , adicione em um tubo de 0,5 mL:

Reagente	Construção com <i>primers</i> pGEX	Construção com <i>primers</i> pET28
Água milli-Q	x μL	x μL
DNA plasmidial	y μL (~2 μg)	y μL (~2 μg)
Tampão para enzimas (10X)	2,5 μL	2,5 μL
Enzima 1	0,5 μL de <i>Bam</i> HI (15 U/ μL)	1 μL de <i>Nde</i> I (10 U/ μL)
Enzima 2	1 μL de <i>Xho</i> I (10 U/ μL)	1 μL de <i>Xho</i> I (10 U/ μL)
Total	25 μL	25 μL

2) Incube a reação de digestão enzimática 37 °C por 1 h.

E. Eletroforese em gel de agarose

- 1) Controle não-digerido: em outro tubo de 0,5 mL, adicione 5 μL do plasmídeo não-digerido e 1 μL de tampão de amostra.
- 2) Amostra digerida: adicione 5 μL de tampão de amostra aos 25 μL da digestão enzimática.

Aplique todo o volume das amostras 1 e 2 em poços (separados!!) de um gel de agarose 0,8% e proceda a eletroforese a 120 V por cerca de 40 min.

F. Questões

- 1) Por que optamos por trabalhar com duas enzimas para a digestão do vetor? Poderíamos ter escolhido um único sítio de restrição? Explique.
- 2) Como sabemos que podemos utilizar as combinações das enzimas *Bam*HI/*Xho*I ou *Nde*I/*Xho*I neste experimento?
- 3) As enzimas de restrição são naturalmente produzidas por bactérias. Qual a principal função destas enzimas nas bactérias? Como as bactérias protegem seu próprio DNA da ação destas enzimas?
- 4) Os vetores pGEX e pET28a são vetores de expressão. Qual a diferença básica entre eles com relação a região promotora envolvida na expressão do DNA de interesse?

Anexos (mapas dos plasmídeos de expressão usados)

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 CCG CCG CAT CGT GAC TGA
 BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons

