



## **RELATÓRIO DE AULA PRÁTICA**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Professor: Miguel

Alunos: Gustavo Bastos, Hugo Rezende, Monica Maertens, Paula Gonçalves, Rafael  
Ribeiro, Stella Maris

Curso: Ciências Biológicas Diurno

23/08/07

### **1- INTRODUÇÃO**

A biologia molecular faz uso de variadas técnicas em seus experimentos, dentre elas algumas das mais conhecidas são a Miniprep, o PCR, a digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição e a eletroforese em gel de agarose. A utilidade das mesmas está brevemente explanado abaixo. A clonagem gênica permitiu um avanço explosivo no conhecimento nas áreas biológicas. Clonagem significa a obtenção de múltiplas cópias de um gene para que se possa manipulá-lo quimicamente. A clonagem biológica de um gene consiste em inserí-lo em um vetor, que é um DNA capaz de se multiplicar dentro de um sistema vivo; um exemplo é o plasmídeo bacteriano. Sendo que uma colônia de bactérias é proveniente de um clone e cada colônia carrega múltiplas cópias do plasmídeo que por sua vez carrega o gene clonado inserido em si. Quando se faz uma Miniprep de um plasmídeo obtém-se então suficiente número de cópias desse gene para manipulações químicas. A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e clínicos, consiste em produzir automaticamente milhões de cópias de um único segmento de DNA em questão de horas. Tal façanha depende da habilidade das enzimas copiadoras de DNA (Taq polimerases) permanecerem estáveis em alta temperatura. Preparações de DNA plasmidial ou cromossomal purificadas podem ser submetidas a digestão com enzimas de restrição para identificação e caracterização do pedaço de DNA objeto do estudo. Eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato da moléculas também influi, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. Géis de agarose podem ser usados para análise de fragmentos de DNA que tenham entre 70 a 800.000 pares de base. Assim, é possível estimar o tamanho e a quantidade dos fragmentos de DNA. O tamanho pode ser estimado tomando-se por base a sua mobilidade em relação a de outros de tamanho conhecido.

### **2- OBJETIVOS**

Propiciar ao aluno o aprendizado sobre e posterior realização de técnicas de PCR, miniprep, eletroforese e digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição, as quais são muito utilizadas em laboratórios de biologia.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

**Miniprep:** pipeta, ponteira, suporte de eppendorfs, cultura bacteriana, eppendorfs de 1,5mL, microcentrífuga, solução I, solução II, gelo, solução III, isopropanol, vortex, etanol, solução de TE.

**PCR:** solução obtida ao termino da miniprep, eppendorfs (1,5mL e 0,5mL), ponteira, pipeta, água, tampão 10x, dNTPs, primers forward e reverse, Taq polimerase, termociclador.

**Digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição:** eppendorf de microcentrífuga, tampão 10x, solução com *EcoRi*, água, DNA molde, banho maria

**Eletroforese em gel de agarose:** luvas, pipeta, ponteira, gel de agarose 1% contendo brometo de etídio, solução resultante da miniprep, tampão TA, máquina responsável pelo campo elétrico e conseqüentemente pelo correr do gel, UV, proteção para os olhos.

#### 3.1- Protocolo resumido para Miniprep (14/11/2007)

Cada grupo extrairá plasmídeo contendo cDNA de *S.mansoni*.

- 1) Encha um tubo de microcentrífuga com a cultura bacteriana e centrifugue por 1 minuto.
- 2) Despreze o sobrenadante, encha o tubo novamente e centrifugue para obter material suficiente para a extração.
- 3) Ressuspenda o sedimento com 100 µL de solução I (basta transferir todo o conteúdo do microtubo) incubando em mixer por 3 minutos. Solução I é um tampão que não deixa o pH variar.
- 4) Adicione 200 µL de solução II, misture por inversão gentil do tubo por 4 vezes e incube em gelo por 5 minutos. Solução II contém hidróxido de sódio (NaOH) que aumenta o pH a fim de se desnaturar proteínas, há também SDS, um detergente que se liga à proteína do cromossomo da bactéria.
- 5) Adicione 150 µL de solução III, misture por inversão gentil do tubo por 4 vezes, obtendo precipitado branco, e centrifugue por 5 minutos. Solução III contém acetato de potássio. O íon K<sup>+</sup> faz o SDS se precipitar.
- 6) Transfira 400 µL do sobrenadante ou o máximo que conseguir para outro tubo marcado com A, sem retirar o material branco precipitado. Quero o sobrenadante porque é nele que os plasmídeos se encontram.
- 7) Adicione 400 µL de isopropanol (transfira todo o material do tubo "i"), misture por inversão, aguarde 2 minutos e centrifugue por 5 minutos para precipitar o plasmídeo. O isopropanol é responsável pela mudança da constante dielétrica do meio que se torna razoavelmente apolar fazendo com que o DNA se precipite.
- 8) Lave o sedimento (expressão usada na bioquímica quando não se consegue ressuspender o sedimento, mas mesmo assim o mesmo é misturado em Vortex para retirar o excesso de sal) com 1mL de etanol 80% (tubo "e"), vortexando por 1 minuto.
- 9) Centrifugue por 5 minutos, despreze o sobrenadante, retire todo o etanol com micropipeta e ressuspenda o DNA plasmidial com 50 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8) refluxando com micropipeta 10 vezes.

## Prática 2: PCR, Digestão de Plasmídeo com Enzima de Restrição e Eletroforese (21/11/2007)

### 3.2- PCR

Inicialmente diluir a miniprep 1:100 (em tubo dA com 200  $\mu$ L de água, retirar 2  $\mu$ L e pipetar 2  $\mu$ L da miniprep correspondente)

Em tubos de 0,5 mL, para cada reação de PCR, é utilizado:

- 13,2  $\mu$ L de água
  - 2,0  $\mu$ L de tampão 10x (estoque)
  - 1,6  $\mu$ L de dNTPs (solução estoque de 2,5mM)
  - 1  $\mu$ L de cada primer forward e reverse (estoque contendo 20  $\mu$ L de cada primer que se anelarão com o vetor)
  - 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase 5I/  $\mu$ L (100x conc)
  - 2  $\mu$ L de miniprep diluída
- TOTAL: 20  $\mu$ L

Para cada tubo de PCR (exemplo P1A) pipetar 18  $\mu$ L do PCR-mix (feito com sobra de algumas reações).

Aos 18  $\mu$ L de PCR-mix, adicionar 2  $\mu$ L de DNA molde dA (miniprep diluída 100x, ~ 3 ng/ $\mu$ L).

Adicionar uma gota de óleo mineral para evitar evaporação (é desnecessário quando o termociclador possui tampa aquecida, mas não é prejudicial)

Incubar em termociclador programado para:

1. 94<sup>o</sup> C por 4 min
2. 94<sup>o</sup> C por 1 min
3. 53<sup>o</sup> C por 1 min
4. 72<sup>o</sup> C por 1,5 min
5. volta 29 vezes ao passo 2
6. 72<sup>o</sup> C por 10min
7. 4<sup>o</sup> C infinito
8. Fim

Soluções: Tampão de Taq 10x (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 9,0 1% Triton X-100; MgCl<sub>2</sub> 30 mM)

### 3.3- Digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição

Em um tubo de microcentrífuga é utilizado:

- 2  $\mu$ L de tampão 10x (Promega)
  - 1  $\mu$ L de *Eco*Ri (10 UI/ $\mu$ L) (Promega) – nunca utilizar mais que 10% do volume final em enzimas caso contrário o glicerol inibe a reação. Diluir no mínimo 5x.
  - 15  $\mu$ L H<sub>2</sub>O
  - 2  $\mu$ L de DNA molde
- TOTAL: 20  $\mu$ L

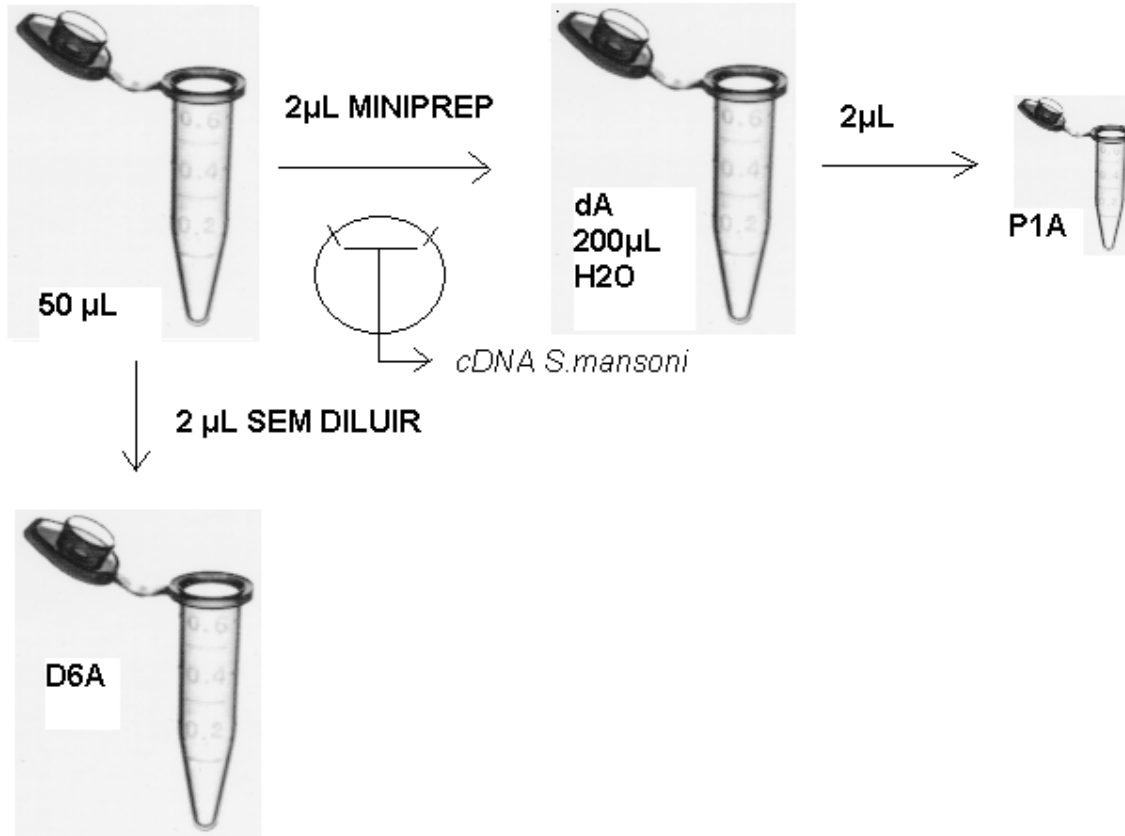
Adicionar 2  $\mu$ L da miniprep SEM DILUIR (~300 ng/ $\mu$ L) a 18  $\mu$ L do mixE (tubo D1A).

Nunca utilizar mais do que 0,2  $\mu$ L/mL de DNA em uma digestão!

Colocar os tubos em banho a 37<sup>o</sup> C por 2 horas e depois guardar a -20<sup>o</sup> C e correr em gel de agarose.

Soluções: Tampão 10x (50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM NaCl)

Esquema geral de 1 e 2

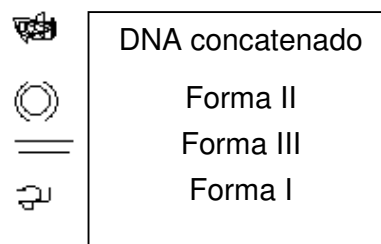


### 3.4- Eletroforese em gel de agarose

Ao final do trabalho, adicionar à miniprep A 10  $\mu$ L de tampão de amostra TA (azul) e correr 20  $\mu$ L em gel de agarose 1% contendo Brometo de Etídio (intercalante do DNA que permite visualização com luz UV). O DNA correrá para o pólo vermelho o qual é o pólo positivo.

O plasmídeo na bactéria está no mesossomo e na forma super-hélice ou forma I, a qual não é muito boa para se realizar comparações. Quebras mecânicas geram a forma II, faz-se um círculo relaxado. Quando se corta I ou II com *EcoRI* o plasmídeo torna-se linear, ou seja, muda para a forma III. No gel a forma I “anda” mais rápida, seguida da III, da II e de DNAs concatenados respectivamente. A forma III se desloca mais rapidamente do que a II pois consegue serpentear entre os poros mas sua linearidade faz com que ela se prenda em alguns momentos, por isso a forma I é a mais rápida.

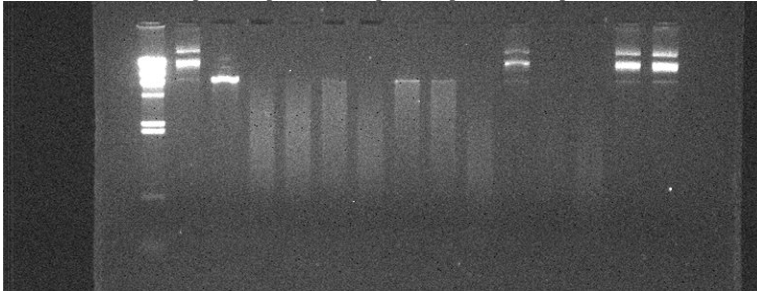
Ordem das estruturas no gel:



## 4- Resultados

### Digestão

P 1p 1e 2p 2e 3? 4p 4e 5p 5e 5m 6p 6e c c

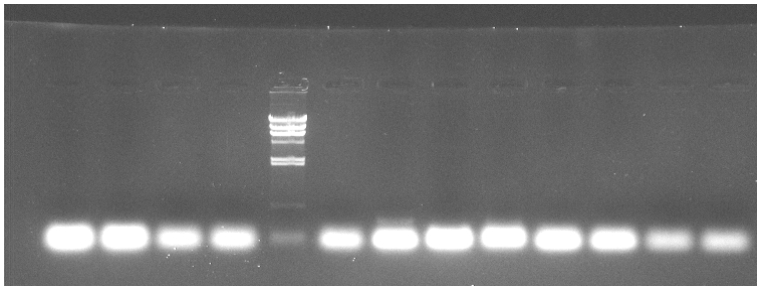


- P = padrão de tamanho molecular lambda Hind III  
Np = digestão com Pst I que não tem sítio no plasmídeo  
Ne = digestão com Eco RI que lineariza o plasmídeo  
? = aparentemente Eco RI pq há uma banda no início da degradação  
5p e 5e = invertidos? Parece haver uma banda no início da degradação em p...  
5m = controle "mock" incubado sem enzima  
c = controles não incubados, mostrando banda superélice + círculo relaxado

[Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV]

### PCR

1c 1a 2c 2a P 3c 3a 4c 4a 5c 5a 6c 6a

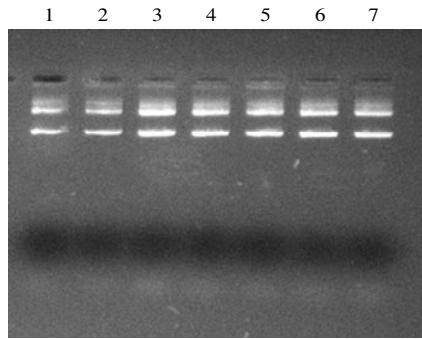


- P = padrão de tamanho molecular lambda Hind III  
Nc = controle sem DNA molde  
Ne = amostra com DNA molde – sem resultado positivo (molde?)  
Gel será refeito utilizando-se outros PCRs

Bandas visíveis = PRIMERS

[Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV]

# Miniprep



Visualização de plasmídeo extraído: banda superélice + círculo relaxado  
[Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV]