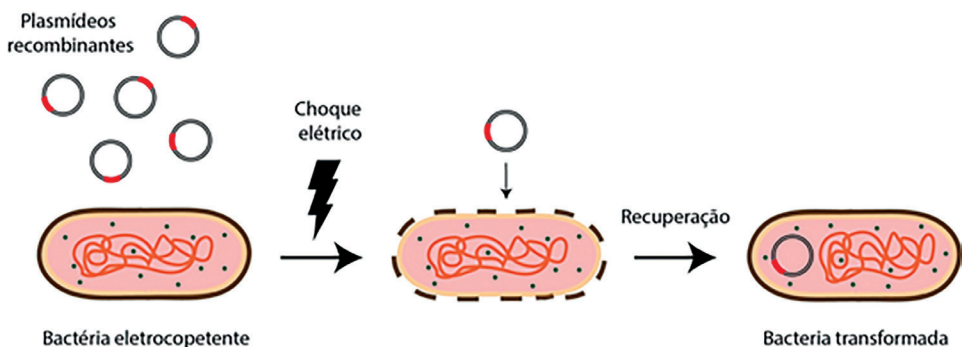


MINIPREPARAÇÃO DE DNA DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS, MINIPREPARAÇÃO BACTERIANA E DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Uma das técnicas utilizadas para inserir o DNA plasmideal recombinante em bactérias é a eletroporação. Nesse processo, as bactérias são submetidas a um pulso elétrico, de modo que sejam formados poros na membrana bacteriana, possibilitando, assim, a entrada dos plasmídeos (Figura 11).

Figura 11. Inserção de DNA recombinante em bactéria por eletroporação.

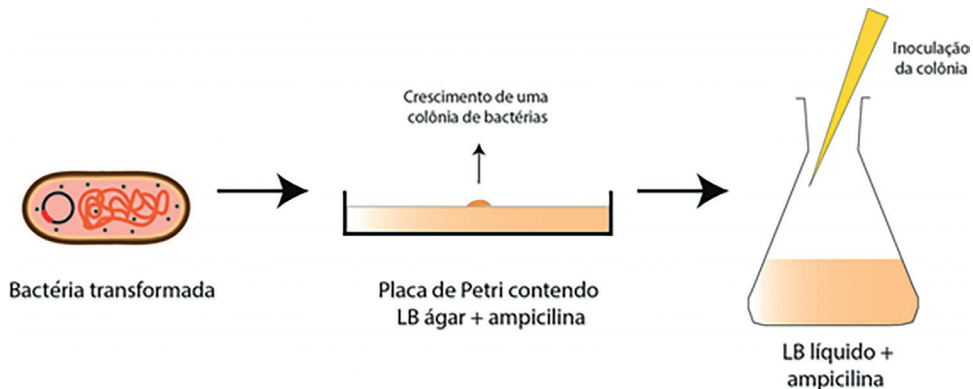


Devido ao fato de ser utilizado pulso elétrico, os sais presentes nos tampões das etapas anteriores (digestão, desfosforilação, fosforilação e ligação) acarretam maior condutividade elétrica, gerando um pulso maior do que o necessário para a abertura dos poros bacterianos. Por isso, é necessário realizar a precipitação do plasmídeo (descrito no protocolo anterior), antes da eletroporação, para que o excesso de sais seja eliminado.

O racional de inserir a molécula de DNA recombinante nas bactérias reside no fato de que esses micro-organismos se multiplicam de maneira muito mais rápida do que células de mamíferos, por exemplo. As bactérias têm a tendência de se duplicarem a cada 20 a 30 minutos e, uma vez dentro delas, a molécula recombinante também é duplicada diversas vezes, o que faz das bactérias ótimas ‘máquinas’ para a produção de DNA recombinante.

Após o pulso elétrico, as bactérias são inoculadas em LB ágar contendo ampicilina, antibiótico ao qual o vetor confere resistência e, por isso, apenas as células bacterianas que receberam o vetor, conseguirão sobreviver e se multiplicar. Aproximadamente 16 h após o plaqueamento, colônias bacterianas terão sido formadas; estas serão agora adicionadas ao LB líquido contendo o antibiótico e incubadas por mais 16 h, a 37 °C e sob agitação, de modo que seja obtida maior quantidade de bactéria e, conseqüentemente, maior quantidade de DNA recombinante (Figura 12).

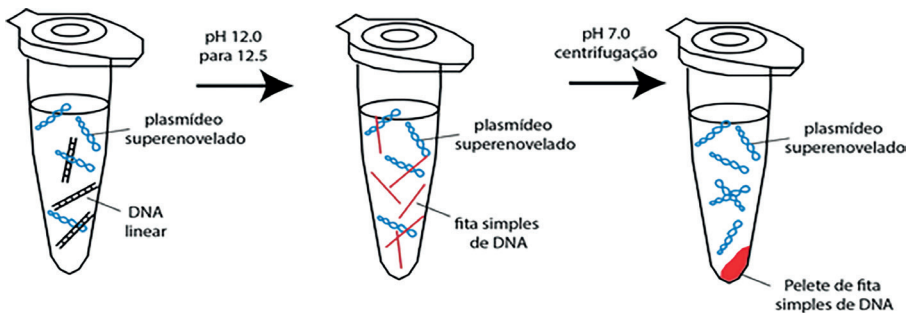
Figura 12. Crescimento bacteriano para a produção de DNA recombinante.



Após o período de incubação em condições ótimas para proliferação bacteriana, é necessário extrair o DNA plasmideal recombinante para uso posterior. Nesse momento, lança-se mão da minipreparação bacteriana ou, simplesmente, “miniprep”. A miniprep é um método utilizado para a

recuperação dos plasmídeos recombinantes inseridos nas bactérias. Os métodos de extração de DNA consistem, basicamente, em duas etapas. A primeira é a liberação da molécula de DNA plasmideal através da lise celular e o segundo é o tratamento químico e/ou enzimático da amostra para retirada de contaminantes. Na lise, são utilizados detergentes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio), frequentemente associado com algum álcali, como NaOH. O SDS tem a função de se intercalar entre os fosfolipídios da membrana, gerando poros, enquanto o hidróxido de sódio degrada a parede celular e desfaz as ligações (pontes) de hidrogênio presentes entre as duas fitas do DNA plasmideal mais relaxado, bem como do DNA cromossômico. A retirada dos contaminantes se inicia com a neutralização do pH, pois quando se adiciona ácido acético, as cadeias de DNA voltam a se unir. No entanto, pedaços grandes de DNA cromossômico rompido e de plasmídeo relaxado, não conseguem se hibridizar perfeitamente, gerando uma massa emaranhada que pode ser separada por centrifugação, de modo que se obtenha, no sobrenadante, principalmente, DNA plasmideal (Figura 13). Em seguida, a preparação é colocada em uma coluna de sílica positivamente carregada, para que, devido ao caráter negativo da molécula de DNA, este fique retido na coluna.

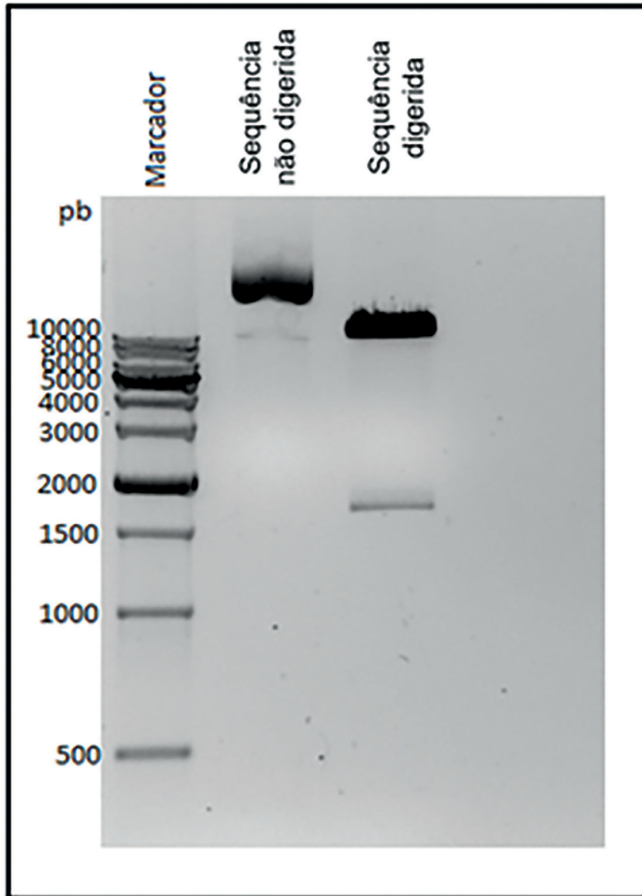
Figura 13. Extração de DNA plasmideal por lise alcalina.



Seguem-se lavagens com etanol ou isopropanol, que precipitam o DNA rapidamente. Lava-se também com etanol 70% para remover resíduos de alguns sais e de SDS. Por fim, o DNA é eluído em água e quantificado por espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda igual a 260 nm. É possível também inferir a pureza da preparação; o DNA absorve radiação UV a 260 nm enquanto proteínas absorvem a 280 nm. A relação A_{260}/A_{280} , se igual ou maior do que 1,8, revela que a preparação é pura. Resultados da relação menor que 1,8 demonstram uma preparação contaminada com proteína.

De posse do DNA recombinante extraído e quantificado, este é submetido à digestão com enzimas de restrição, visando verificar a integridade do vetor, pois, ocasionalmente, o vetor pode sofrer recombinação com o DNA cromossomal, perdendo regiões importantes para seu bom funcionamento (Figura 14).

Figura 14. Vetor digerido com as enzimas *NotI* e *BamHI* para verificação de sua integridade.



PROTOCOLO 3

1. Transformação de bactérias eletrocompetentes com o plasmídeo recombinante e plaqueamento em meio seletivo

- Ligar o eletroporador (Botão lateral > 4) Pré-set Protocol > Enter > 1) Bacterial > Enter > 2) E. coli-2 mm, 2,5 Kv > Enter);
- 50 uL de bactéria eletrocompetente;
- 1 a 2 uL da reação de ligação precipitada;
- Adicionar o volume obtido na cubeta de eletroporação gelada (4 °C);
- Colocar a cubeta no eletroporador, e apertar o botão ‘Pulse’;
- Adicionar à cubeta de eletroporação 1 mL de LB e transferir o volume para um tubo eppendorf de 1,5 mL;
- Incubar em banho seco por 1 h, a 37 °C, sob agitação;
- Centrifugar a 4.000 RPM por 5 min;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* bacteriano em aproximadamente 500 uL de meio LB;
- Plaquear todo o conteúdo em meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina para obtenção de colônias resistentes ao antibiótico;
- Incubar as placas a 37 °C, por cerca de 16~18 h;
- Selecionar colônias bacterianas que cresceram nas placas LB-Amp e expandir em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Incubar os inóculos a 37 °C por 16-18 h sob agitação.

2. Minipreparação de DNA plasmideal

- Inóculos de 5 mL de bactérias podem ser utilizados para a preparação plasmideal em pequena escala;
- Seguir protocolos dos kits disponíveis (Sugestão: Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare).

3. Confirmação da integridade dos plasmídeos

A) Digestão dos plasmídeos:

Reação para volume final de 10 uL:

- X uL do plasmídeo (~500 ng do DNA plasmídeo);
- 1 uL do tampão O (*Thermo Scientific*);
- 0,5 uL (5U) da enzima NOTI 10 U/uL (*Thermo Scientific*, #ER0592);
- 0,5 uL (5U) da enzima EcoRI 10 U/uL (*Thermo Scientific*, #ER0271);
- X uL de água deionizada;
- Incubar por 1 h, a 37 °C.

B) Eletroforese das amostras em gel de agarose 1%:

- Pesar 0,5 g de agarose;
- Solubilizar a agarose em 50 mL de tampão TAE 1x;
- Levar ao micro-ondas para completa dissolução da agarose;
- Esperar esfriar e adicionar 2 uL de brometo de etídio (concentração final no gel deve ser 0,2-0,5 µg/mL);
- Adicionar esse conteúdo ao suporte para gel de agarose e esperar o gel polimerizar;
- Colocar o gel na cuba preenchida com tampão TAE 1x;
- Adicionar às amostras, tampão *Loading Dye* (se o tampão estiver 6X, para 20 uL de amostra, adicionar 3,3 uL de tampão, de modo que este fique 1x);
- Iniciar a eletroforese, com voltagem de 100 V, por 60 min.
- OBS: Verificar se as enzimas apresentam atividade ótima no mesmo tampão. Caso não apresentem, deve-se procurar enzimas que apresentam boa atividade no mesmo tampão ou incubar a reação por mais tempo.