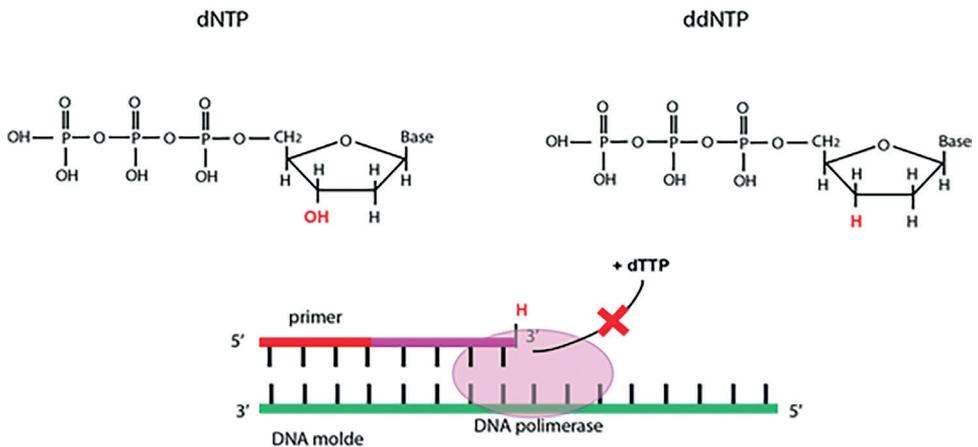


CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PLASMIDEAL PARA SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS

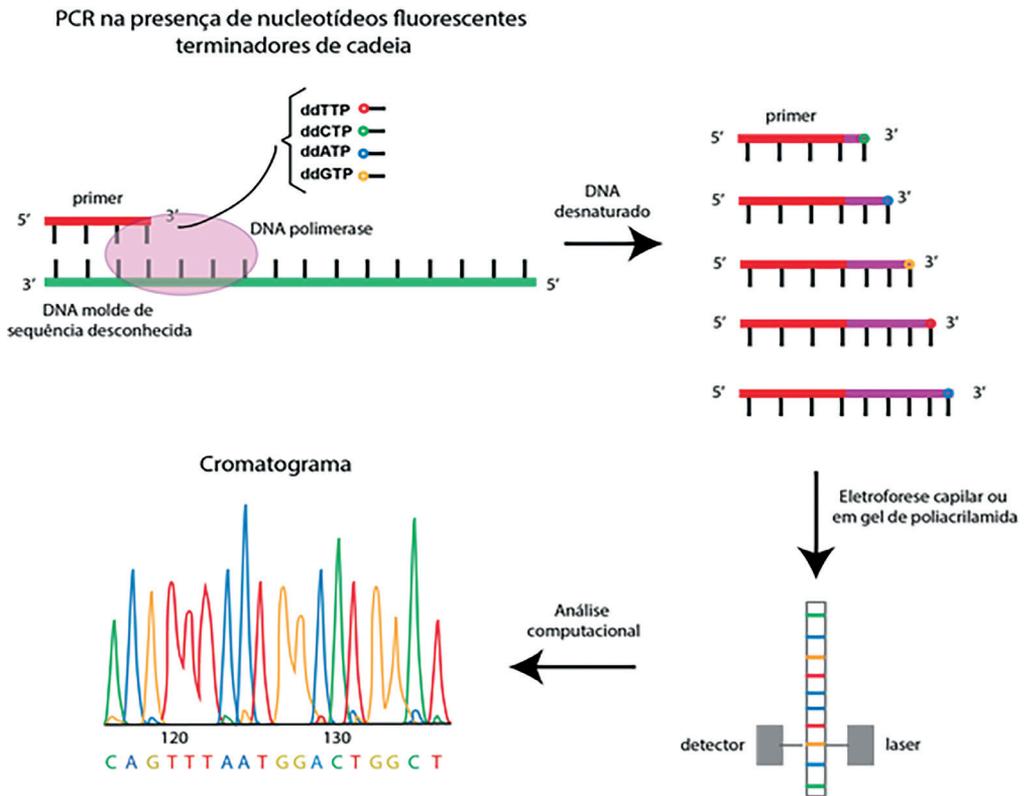
O sequenciamento é necessário para se confirmar a inserção da sequência-guia no vetor. O método mais acessível de sequenciamento, no momento, é o de Sanger, baseado na incorporação de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) à cadeia nascente de DNA. Os ddNTPs não possuem o OH- na posição 3', impedindo a ligação do próximo nucleotídeo, causando, assim, a parada de crescimento da cadeia (Figura 15).

Figura 15. Parada de crescimento da cadeia nascente pela adição de ddNTP.



A esses ddNTPs são também acoplados diferentes fluoróforos, de modo que cada base seja diferencialmente identificada. Sendo assim, para a reação de sequenciamento são necessários iniciadores (*primers*), um *template* (amostra), dNTPs, ddNTPs, DNA polimerase e tampão. A reação é feita em termociclador, seguindo condições predeterminadas de temperatura. Antes da análise por eletroforese capilar, as amostras passam por um processo de purificação para retirada de nucleotídeos não incorporados. Em seguida, as amostras são submetidas à eletroforese capilar para separação e identificação dos fragmentos gerados e montagem da sequência de interesse (Figura 16).

Figura 16. Eletroforese capilar para determinação da sequência analisada.



Os cromatogramas gerados podem ser analisados utilizando-se programas específicos, como o Chromas e Seqman.

PROTOCOLO 4

1. Preparo das amostras de DNA para sequenciamento

Reação para volume final de 20 uL:

- X uL DNA (~350 ng do DNA amplificado);
- 2,5 uL Big Dye (*Applied Biosystems*, #4336911);
- 0,5 uL (0,25 uM) do *primer* (10 uM);
- 4 uL Buffer 5X (*Applied Biosystems*, #4339843);
- Fazer um mix com H₂O deionizada, BigDye e o Buffer;
- Adicionar o DNA no fundo do poço;
- Adicionar o *primer* na lateral do poço e bater;
- Adicionar o mix na lateral do poço na placa;
- Cobrir a placa com adesivo adequado;
- Centrifugar na placa utilizando a centrífuga adequada;
- Incubar as amostras no termociclador com a programação a seguir:
 - 1) 95 °C por 2 min
 - 2) 95 °C por 45 seg
 - 3) 55 °C por 30 seg
 - 4) 60 °C por 4 min
 - 5) Repetir passos de 2 a 4 (de 35 a 42 ciclos)
 - 6) Manter a 4 °C até remover a reação do termociclador

2. Reação de precipitação das amostras:

- Centrifugar as amostras após saírem do termociclador;
- Adicionar 1 uL de acetato de sódio 3 M;
- Adicionar 2 uL de glicogênio 20 mg/mL;

- Adicionar 100 uL de etanol absoluto e misturar no Vortex;
- Incubar a placa por 1 h no freezer (-20 °C);
- Centrifugar a placa por 40 min, a 4.000 RPM, a 4 °C;
- Remover o sobrenadante por inversão rápida e secar em papel;
- Adicionar 200 uL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar a placa por 30 min, a 4.000 RPM, a 4 °C;
- Remover o sobrenadante por inversão rápida e secar em papel;
- Evaporar o líquido restante através de incubação no termociclador, por 3 min, a 95 °C;
- Selar com PVC, embalar em papel alumínio e enviar para sequenciamento.