



Universidade do Minho

Departamento de Biologia da Universidade do Minho

**Mestrado em Bioempreendedorismo e Biotecnologia em Plantas
Aromáticas e Medicinais**

Ano lectivo de 2007/2008

Ferramentas de Engenharia Genética

Protocolos das aulas práticas

Rui Oliveira

Extracção e purificação de DNA genómico

Adaptado de Doyle, J. J. and J. L. Doyle

1. Colher o tecido vegetal (folhas jovens em crescimento) e guardar a -80°C
2. Fragmentar o tecido (~3g) em azoto líquido até ficar reduzido a um pó muito fino. Transferir para um tubo Falcon de 15mL
3. Adicionar 6mL de tampão de extracção de gDNA e deixar aquecer a amostra à temperatura ambiente
4. Misturar por inversão do tubo até o material biológico ficar completamente molhado
5. Aquecer a 65°C durante 60min
6. Extrair com 3mL de clorofórmio por inversão. Centrifugar a 4000rpm durante 10min e guardar o sobrenadante
7. Adicionar $25\mu\text{L}$ de RNase A (10mg/mL) e incubar 30min a 37°C
8. Repetir a extracção com clorofórmio (guardar o sobrenadante)
9. Adicionar 0,6 volumes de isopropanol e retirar o DNA com uma pipeta Pasteur esterilizada
10. Lavar com 500mL de etanol 70% num microtubo e centrifugar 2min a 13000rpm
11. Ressuspender em $200\mu\text{L}$ de TE a 60°C com a micropipeta
12. Extrair duas vezes com volume igual de PCI
13. Extrair com clorofórmio
14. Adicionar 1/10 do volume de acetato de sódio 3M ($20\mu\text{L}$) e 2,5 volumes de etanol absoluto
15. Centrifugar a 13000rpm durante 2min
16. Lavar com 1mL com etanol 70%, centrifugar, secar e ressuspender em $200\mu\text{L}$ de TE

Reagentes

- Tampão de extracção de gDNA
 - Tris-Cl pH 7, 0,15M
 - NaCl 1M
 - EDTA 15mM
 - CTAB 1,5%
 - β -mercaptoetanol (adicionar antes do ajustamento de pH)
- Clorofórmio
- RNase A (10mg/mL)
- Isopropanol
- Etanol 70%
- TE
 - Tris-Cl 10mM, pH 7,5
 - EDTA 1mM
- PCI
 - Fenol pH 8, 25 partes
 - Clorofórmio, 24 partes
 - Álcool isoamílico, 1 parte
- Acetato de sódio 3M
- Etanol absoluto

Material

- Espátulas
- Azoto líquido
- Almofarizes
- Pipetas de 10mL
- Tubos Falcon de 15mL
- Banho a 65°C
- Micropipetas P20, P200 e P1000
- Pontas azuis e amarelas autoclavadas
- Pipetas Pasteur

Digestão parcial de gDNA

1. A um microtubo colocado no gelo adicionar:
 - 0,2-1 μ g de gDNA
 - 6 μ L de tampão de digestão (10x conc.)
 - água ultra-pura esterilizada q.b.p. 59 μ L
2. Misturar suavemente agitando no vortex. Manter o microtubo no gelo.
3. Adicionar 1 μ L da enzima de restrição e agitar novamente como em 2
4. Para calcular a quantidade a usar, consultar a ficha técnica do fabricante. De um modo geral, 1 unidade corresponde à quantidade de enzima necessária para digerir completamente 1 μ g de DNA do fago lambda, durante 1 hora a 37°C e com o tampão adequado. Para efeitos práticos, considera-se que 1U digere 1 μ g DNA/hora
5. Incubar a mistura à temperatura conveniente de acordo com a enzima (normalmente 37°C)
6. Retirar alíquotas de 20 μ L ao fim de 15, 30 e 45min e inactivar imediatamente por aquecimento a 65°C durante 10-15min
7. Analisar os produtos da reacção em electroforese em gel de agarose

Reagentes

- Enzima de restrição
- Tampão de digestão 10x
- Água ultrapura autoclavada

Material

- Microtubos
- Micropipetas P20
- Pontas amarelas autoclavadas
- Banho a 65°C

Electroforese em gel de agarose

1. Preparar uma solução de agarose em tampão TAE com concentração final de 0,8% (p/v). Aquecer a mistura em microondas, com agitação frequente, até toda a agarose se ter dissolvido
2. Colocar o tabuleiro da tina de electroforese no respectivo suporte de preparação do gel ou, na sua falta, selar com fita adesiva de autoclave
3. Colocar o pente em posição conveniente no tabuleiro para um correcto posicionamento dos poços: distância à extremidade e à base do gel
4. Verter a agarose no tabuleiro até uma altura de ~5mm. Eliminar bolhas de ar que se tenham formado, aspirando com uma micropipeta e deixar solidificar à temperatura ambiente
5. Quando o gel se tiver formado, retirar lentamente o pente para não danificar os poços, colocar o tabuleiro na tina de electroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eléctrodo negativo, e adicionar tampão TAE até ~1mm acima do gel
6. Para cada amostra, misturar num microtubo:
 - 100-500ng de DNA
 - 3,5 μ L de tampão de amostra (6x conc.)
 - água ultra-pura q.b.p. 20 μ L
7. Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos
8. Colocar a tampa da tina. Verificar que as amostras estão colocadas do lado do polo negativo (cátodo, eléctrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do polo positivo (ánodo, eléctrodo de cor vermelha)
9. Ligar os cabos à fonte de electricidade. Ligar a fonte e regular para uma voltagem de 1-5V/cm (distância medida entre os eléctrodos). Verificar se há desprendimento de bolhas dos eléctrodos devido à electrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correcto

10. Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente eléctrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. Retirar o gel cuidadosamente para não partir e corá-lo em banho numa solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml, durante 30-45min à temperatura ambiente
11. Examinar o gel à radiação ultra-violeta e fotografar para arquivar

Reagentes

- Tampão TAE (solução "stock" 50x conc.)
 - Tris base 242g
 - ácido acético glacial 57,1ml
 - EDTA 0,5M (pH8,0), 100ml
 - água ultra-pura q.b.p. 1000ml
- Tampão de amostra (6x conc.)
 - Azul de bromofenol 0,25% (p/v)
 - xileno de cianol FF 0,25% (p/v)
 - glicerol 30% (p/v)
- Agarose MP
- Brometo de etídeo 0,5µg/ml

Material

- Microtubos
- Micropipetas P20
- Pontas amarelas autoclavadas
- Sistema de electroforese e fonte de alimentação

Ligação dos fragmentos de gDNA ao vector plasmídico

1. Num microtubo de 1,5ml fazer a seguinte mistura:
 - vector plasmídico (100-500ng)
 - DNA "insert" (100-500ng)
 - tampão de ligação (10x), 1µL
 - T4 DNA ligase (1U/µl), 1µL
 - Água ultrapura qbp 20 µL
2. Incubar durante a noite (~16h) a 16°C. Guardar a 4°C

Reagentes

- Tampão de ligação
- T4 DNA ligase
- Água ultrapura

Material

- Microtubos
- Micropipeta P20
- Pontas amarelas

Transformação de *Escherichia coli*

1. Inocular 50ml de meio LB (em Erlenmeyer de 250ml) com uma só colónia da estirpe de *E. coli*. Incubar durante a noite a 37°C, a 250r.p.m.
2. Inocular 400ml de LB (em Erlenmeyer de 2000ml) com 4mL da cultura e incubar nas mesmas condições de temperatura e agitação até DO₅₉₀ de 0,375
3. Transferir a cultura para 8 tubos de 50mL de polipropileno pré-arrefecidos e deixar no gelo durante 5-10min
4. Centrifugar a 1600g durante 7min, a 4°C
5. Ressuspender lentamente cada sedimento em 10ml de solução de CaCl₂ gelada
6. Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C

7. Ressuspender cada sedimento em 10mL de solução de CaCl_2 gelada. Manter a suspensão em gelo durante 30min
8. Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C
9. Ressuspender cada sedimento em 2mL de solução de CaCl_2
10. Distribuir alíquotas de 250 μL por microtubos esterilizados e arrefecidos
11. Congelar imediatamente a -80°C (as células podem ser guardadas durante meses, para transformação posterior)
12. Descongelar uma alíquota de células competentes em banho de gelo e colocar 100 μL num microtubo arrefecido. Manter no gelo
13. Adicionar 10ng de DNA (10 a 25 μL) e misturar com movimentos circulares da ponta da micropipeta. Manter em gelo durante 10min (fazer um controle com células competentes sem adição de DNA)
14. Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo num banho a 42°C e deixar durante 2min
15. Adicionar 1mL de meio LB. Incubar 60min 37°C a 250r.p.m.
16. Espalhar em placa de LB suplementado com o antibiótico apropriado (ampicilina), diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Incubar a 37°C durante 12 a 16 horas

Meios de cultura e reagentes

- Meio LB ("Luria broth")
 - Tryptone 1% (p/v)
 - extracto de levedura 0,5% (p/v)
 - NaCl 1% (p/v)
 - ajustar pH 7,5 com NaOHaq.
 - autoclavar 20min, 120°C, 1bar
- Solução de CaCl_2
 - CaCl_2 60mM
 - glicerol 15% (p/v)
- LB sólido com ampicilina
 - Meio LB
 - agar 2% (p/v)
 - autoclavar a 120°C, 1bar durante 20min
 - Antes da distribuição pelas placas, adicionar ampicilina 100mg/ml esterilizada por filtração, para uma concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Guardar as placas a 4°C

Material

- Erlenmeyers de 250mL e 2000mL esterilizados
- Pipetas de 5mL e 10mL esterilizadas
- Tubos de polipropileno de 50mL
- Banho de gelo
- Microtubos esterilizados
- Micropipetas P20, P200 e P1000
- Pontas amarelas e azuis esterilizadas

Análise de Southern

Fraccionamento do DNA digerido por electroforese em gel de agarose

1. Preparar 50mL de gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE 1x e brometo de etideo 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, verter sobre o tabuleiro com o pente de 1,5mm de espessura colocado e deixar solidificar
2. Preparar as amostras de DNA com tampão de amostra 1x de modo a não excederem 40 μL de volume
3. Com o gel colocado na tina de electroforese e submerso em tampão TAE 1x, aplicar as amostras de DNA e iniciar a electroforese com uma intensidade de campo de 4V/cm
4. Parar a corrida quando o azul de bromofenol tiver percorrido $\sim 3/4$ do comprimento do gel e observar num transluminador de UV's

Transferência de Southern

5. Tratar o gel com 10 volumes de HCl 0,25M durante 10min e suave agitação
6. Decantar esta solução, lavar o gel com água desionizada, cobrir o gel com solução alcalina de desnaturação e incubar nas mesmas condições durante 25min
7. Decantar esta solução, lavar o gel com água desionizada, cobrir o gel com solução de neutralização e incubar nas mesmas condições durante 30min
8. Cortar uma membrana de nylon com a mesma área do gel (não tocar directamente na membrana, nem com luvas) e hidratar durante 5min mergulhando em água desionizada. Substituir a água por tampão SSC 10x e deixar até à utilização da membrana
9. Fazer a montagem do sistema de transferência capilar, colocando num vidro por cima duma tina com tampão SSC 10x, por ordem ascendente: uma tira de papel Whatman 3MM com as extremidades mergulhadas no tampão SSC 10x, o gel com a superfície superior para baixo, a membrana de nylon, duas folhas de papel Whatman 3MM com a área do gel, toalhetes de papel para limpar as mãos com uma espessura de cerca de 4cm e um peso de 500g. Todo o sistema deve ser montado com as tiras de papel Whatman 3MM previamente molhadas em tampão SSC 10x
10. Deixar a transferência processar-se durante a noite
11. Remover a membrana de nylon com uma pinça, agarrando-a sempre pelas extremidades e mergulhá-la em SSC 5x durante 30seg
12. Colocar a membrana sobre papel Whatman 3MM (com a superfície com o DNA para cima) para absorver o excesso de tampão e proceder ao *crosslink* do DNA numa câmara de UV's com a membrana húmida. Guardar a membrana entre duas folhas de papel Whatman 3MM até utilização

Preparação da sonda por PCR (reação de polimerase em cadeia) e marcação com fosfatase alcalina

13. Em microtubos de 200 μ L, preparar a seguinte mistura de reacção de PCR para *GUP1* e um controle negativo com omissão do DNA molde (manter sempre a mistura reaccional em gelo):

Componente	Quantidade (μ L)
Tampão de reacção	5
dNTP's	1
Primer 1	1
Primer 2	1
MgCl ₂ (25mM)	2
<i>Taq</i> DNA Polymerase (Fermentas)	0,5
DNA genómico	100ng-1 μ g (1 μ L)
H ₂ O ultra-pura	q.b.p. 50 μ L

14. Colocar o tubo no aparelho de PCR e proceder à amplificação com o seguinte programa (incluir no programa *hot start* e um passo final de arrefecimento a 4°C):

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	2min	
55°C	30seg	1
72°C	1min	
94°C	30seg	
55°C	30seg	28
72°C	1min	
94°C	30seg	
55°C	30seg	1

- | 72°C | 5min |
|--|------|
| 15. Analisar 5µL do produto da reacção por electroforese em gel de agarose 0,8% | |
| 16. Na visualização do gel sob iluminação UV, fazer um corte com um bisturi no gel imediatamente à frente da banda correspondente ao fragmento amplificado | |
| 17. Cortar uma porção de papel de filtro (3MM) com um tamanho semelhante ao do corte no gel e introduzi-lo nesse corte | |
| 18. Colocar o gel na tina de electroforese e ligar a corrente e deixar correr mais 2-5min | |
| 19. Remover o papel e colocá-lo num microtubo de 200-500µL com a face do DNA para baixo. Furar o fundo do tubo com uma agulha e colocá-lo dentro de um microtubo de 1500µL | |
| 20. Centrifugar durante 30seg à velocidade máxima | |
| 21. Purificar o DNA colhido por extracção com fenol/clorofórmio e precipitação com isopropanol e dissolver o sedimento em TE | |
| 22. Diluir 5x a solução de <i>cross-linker</i> (AlkPhos Direct, Amersham Pharmacia Biotech) com a água fornecida pelo <i>kit</i> | |
| 23. Pipetar 10µL de sonda para um microtubo novo e desnaturar em banho de água fervente durante 5min | |
| 24. Arrefecer imediatamente o DNA, colocando o microtubo em gelo 5min | |
| 25. Adicionar 10µL de tampão de reacção e misturar suavemente | |
| 26. Adicionar 2µL de reagente de marcação e misturar suavemente | |
| 27. Adicionar 10µL de <i>cross-linker</i> (já diluído) e misturar bem | |
| 28. Incubar a 37°C durante 3-4h e guardar em gelo até utilização | |

Hibridação

29. Aquecer a 50°C 15mL de *AlkPhos Direct hybridisation buffer* numa garrafa de hibridação (~0,125ml/cm² de membrana)
30. Colocar a membrana na garrafa com a superfície sem DNA encostada ao vidro e sem bolhas de ar. Proceder à pré-hibridação no forno de hibridação a 50°C, 15min e 60r.p.m.
31. Adicionar a sonda marcada directamente no tampão de hibridação e deixar hibridar durante a noite nas mesmas condições da pré-hibridação
32. Verter o tampão de hibridação para um tubo Falcon de 15mL (para armazenar a -20°C) e adicionar o tampão de lavagem primário (2-5mL/cm² de membrana) pré-aquecido a 50°C. Incubar no forno de hibridação a 50°C durante 10min
33. Desprezar o tampão de lavagem primário e proceder a nova lavagem com tampão fresco e nas mesmas condições
34. Transferir a membrana para uma tina contendo um excesso de tampão de lavagem secundário. Lavar com agitação suave, 5min à temperatura ambiente
35. Repetir a lavagem anterior

Produção e detecção do sinal

33. Escoar o tampão de lavagem secundário e colocar a membrana com o DNA para cima numa superfície limpa não absorvente (não deixar secar a membrana).
34. Pipetar assepticamente o reagente de detecção e cobrir completamente a membrana. Deixar reagir durante 2-5min. Escoar o excesso de reagente de detecção
35. Embrulhar a membrana com filme de plástico aderente e colocá-la numa *cassette* de revelação
36. Em câmara escura, recortar uma folha de filme de autoradiografia (Hyperfilm™ ECL) com a mesma área da membrana e colocá-la encostada à membrana. Fechar a *cassette* e incubar 1h à temperatura ambiente
37. Em câmara escura, remover o filme e revelá-lo, mergulhando 5min em revelador (Agfa), 5min em água desionizada para lavagem e 5min em fixador (Ilford Hypam)

Reagentes

Agarose MP

Tampão TAE 50x

- Tris base 242g
- Ácido acético glacial 57,1ml
- Na₂EDTA·2H₂O 37,2g
- Água desionizada q.b.p.1000ml

- TAE 1x: Tris acetato 40mM, EDTA 2mM
- Tampão de amostra (6x conc.)
- 6.1g Tris, 3.7g EDTA, pH 8.0 para 1L
 - Azul de bromofenol 0,25% (p/v)
 - xileno de cianol FF 0,25% (p/v)
 - glicerol 30% (p/v)
- Brometo de etídeo 0,5µg/ml
- HCl 0,25M, 100mL
- Solução alcalina de desnaturação, 100mL
- NaOH 0,5M
 - NaCl 1,5M
- Solução de neutralização, 100mL
- Tris.Cl 0,5M, pH 7,5
 - NaCl 1,5M
- SSC 20x, 250mL
- NaCl 3M
 - Citrato trissódico 0,3M
 - pH 7,0 com HCl 1M
- Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico
- 25 volumes de fenol equilibrado, pH 8,0
 - 24 volumes de clorofórmio
 - 1 volume de álcool isoamílico
- Isopropanol
- Tampão TE
- Tris.Cl 10mM, pH 8,0
 - EDTA 1mM, pH 8,0

Material

Sistema de electroforese com fonte de corrente eléctrica
Papel Whatman 3MM
Bisturi, tesouras
Microtubos de 1,5 e 0,2mL
Banho de água fervente e de água a 50°C
Banho de gelo
Micropipetas P20, P200 e P1000
Pontas amarelas e azuis
Tubos Falcon de 15mL

Referências

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.). 1996. *Current Protocols in Molecular Biology* Vols. 1-3, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15; <http://irc.igd.cornell.edu/Protocols/DoyleProtocol.pdf>
- Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E. coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition. Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-verlag, Berlin