**Doseamento do DNA plasmídico por espetrofotometria**

Os ácidos nucleicos (DNA, RNA) são detetados por análise do seu espetro de absorção. As bases púricas e pirimídicas dos nucleótidos absorvem luz ultravioleta (UV) apresentando um pico de absorção máxima a cerca de 260 nm. Assim, quanto mais elevada for a absorção de luz pela amostra de ácido nucleico, maior será a sua concentração. Com base nestas propriedades, a quantificação de ácidos nucleicos pode ser feita num espetrofotómetro (‘*Nanodrop*’) expondo a amostra a luz UV a 260 nm, em que um fotodetetor mede a luz que atravessa a amostra e mede a densidade ótica (*optical density* – OD).

Para estimar a concentração de DNA utiliza-se a seguinte relação: 1 OD260 = 50 μg/ml DNA dupla-hélice (Regitano, 2001; Sambrook, 2002), através da fórmula:

[DNA μg/ml] = OD x 50 μg/ml x fator de diluição

Para calcular a quantidade de DNA total obtido:

DNA (µg) = concentração de DNA x volume total da amostra (ml)

As proteínas (sobretudo devido aos aminoácidos aromáticos e nomeadamente aos resíduos de triptofano) absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade (contaminação com proteínas) das preparações de ácidos nucleicos.

1. A avaliação da concentração do DNA plasmídico será feita recorrendo ao Genova Nano (sala 2.4.40 – ‘*Nanodrop*’, utilizando o mesmo princípio da espetrofotometria mede a concentração de DNA, com a grande vantagem de necessitar apenas de volumes muito pequenos de amostra (1 – 2 μl).
2. Utilizar o modo ‘*Multi-wavelength*’ e fazer o branco com a solução de ressuspensão do DNA plasmídico (i.e., ddH2O).
3. Avaliar a concentração e pureza das amostras através das leituras a 260 nm e das razões 260/280 nm e 260/230 nm, respetivamente.

**Polymerase chain reaction (PCR)**

**Mistura de reação** (microtubo de 200 µl – volume final 20 µl)

Tampão [10x]: 2 µl

MgCl2 [25 mM]: 2 µl

*Primer* PjetFwd [5 pmol/µl]: 2 µl

*Primer* PjetRev [5 pmol/ul]: 2 µl

dNTP [5 mM]: 2 µl

DNA: 50 ng de DNA plasmídico (Pjet1.2sp2300, concentração cerca de 100 ng/µl)

*Taq* DNA polimerase [1U/µl]: 0,5 µl

ddH2O: perfazer até 20 µl

**Programa:**

1. 94 ºC – 2 min. (desnaturação inicial)
2. 94 ºC – 1 min. (desnaturação)
3. 60 ºC – 1 min. (emparelhamento / *annealing*)\*
4. 72 ºC – 3 min (extensão: 1 min por cada 1000 bp)
5. Repetir os passos de 2 a 4 – 29x
6. 72 ºC – 10 min
7. 4 ºC, até retirar do PCR
8. Congelar a -20 ºC até utilização

\*Nota: A temperatura de emparelhamento foi determinada após cálculo da temperatura de emparelhamento dos *primers* utilizando a fórmula: [2x(A+T) + 4x(G+C)]

*Primer* PjetFwd: 5´– CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC – 3´

*Primer* PjetRev: 5´– AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG – 3´

**Digestão com enzimas de restrição**

**1.** Digerir o plasmídeo recombinante Pjet1.2sp2300 com enzima de restrição *Xho*I.

5' C T C G A G 3'

3' G A G C T C 5'

**2.** Mistura de reação (microtubo de 1,5 ml – volume final 25 µl):

– plasmídeo Pjet1.2sp2300 [≈100 ng/µl]: 250 ng (2,5 µl ou calcular o volume correspondente)

– enzima *Xho*I (10 U/µl): 1 µl

– tampão de reação (10x): 2,5 µl

– ddH2O até perfazer um volume total de 25 µl

**3.** Incubar a 37 ºC, durante a noite. Congelar a -20 ºC até utilização.