

Doseamento do DNA plasmídico por espectrofotometria

Os ácidos nucleicos (DNA, RNA) são detetados por análise do seu espectro 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 espectrofotómetro ('Nanodrop') expondo a amostra a luz UV a 260 nm, em que um fotodetector mede a luz que atravessa a amostra e mede a densidade ótica (optical density – OD ou Abs).

Para estimar a concentração de DNA utiliza-se a seguinte relação: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$ dupla-hélice (Regitano, 2001; Sambrook, 2002), através da fórmula:

$$[\text{DNA } \mu\text{g/ml}] = \text{OD} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{fator de diluição}$$

Para calcular a quantidade de DNA total obtido:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}) = \text{concentração de DNA} \times \text{volume total da amostra (ml)}$$

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 A_{260}/A_{280} 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 espectrofotometria 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 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 PjetFw [5 pmol/µl]: 2 µl

Primer PjetRev [5 pmol/µl]: 2 µl

dNTP [5 mM]: 2 µl

DNA: 20 ng – 50 ng de DNA plasmídico (Pjet1.2sp2300, concentração cerca de 50 ng/µl)

Taq DNA polimerase [1U/µl]: 1 µl

ddH₂O: perfazer até 20 µl

Programa:

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

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

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 XhoI.



2. Mistura de reação (microtubo de 1,5 ml – volume final 25 µl):
 - DNA: 250 ng de DNA plasmídico (Pjet1.2sp2300, concentração cerca de 50 ng/µl)
 - enzima XhoI (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 °C, durante a noite. Congelar a -20 °C até utilização.