

Extração de DNA plasmídico em pequena escala

‘Miniprep’

A extração do DNA plasmídico será realizada pelo “**Método de lise alcalina**” (Birnboim e Doly, 1979)

1. A partir de um sedimento (*‘pellet’*) de células de *Escherichia coli* congelado a -20 °C (o *‘pellet’* foi obtido a partir de uma centrifugação (1 min, 14 000 g) de 1,5 ml de cultura bacteriana transformada com o plasmídeo Pjet1.2 com o inserto *‘sp’* com cerca de 2 300 pares de bases (sp2300)). Ressuspender o *‘pellet’* em 100 µl de solução I (50 mM glucose, 25 mM TrisHCl, pH 8, 10 mM EDTA).
2. Incubar 10 min a 4 °C.
3. Adicionar 200 µl de solução II (0,2 M NaOH, 1% SDS), homogeneizar por inversão até a suspensão clarificar totalmente.
4. Incubar 5 min em gelo (ATENÇÃO: não deixar ultrapassar os 5 min).
5. Adicionar 150 µl de solução III (3 M NaAc, pH 4,8), homogeneizando por inversão. Incubar 5 min em gelo.
6. Centrifugar 10 min, a 14 000 g.
7. Recolher o sobrenadante para um microtubo de 1,5 ml, contendo 1 ml de etanol absoluto frio, homogeneizar por inversão e deixar precipitar à temperatura ambiente.
8. Centrifugar 5 min a 14 000 g. Remover o sobrenadante.
9. Lavar o *‘pellet’* de DNA precipitado com 1000 µl de EtOH a 70% e centrifugar como anteriormente. Remover o sobrenadante e deixar secar o DNA plasmídico ao ar.
10. Ressuspender o DNA em 20 µl de ddH₂O e conservar, devidamente etiquetado (turma/data), a -20 °C.

Nota: As incubações podem realizar-se à temperatura ambiente, desde que esta não exceda os 20 °C.

SOLUÇÕES (função e composição):

Solução I – Ressuspensão das células

Tris HCl: um tampão que mantém o pH estável

EDTA: um agente quelante de iões Mg^{2+} e Ca^{2+} , essenciais para a atividade enzimática da DNase

Glucose: um açúcar que mantém a pressão osmótica e como tal a integridade celular

Solução II – Lise

NaOH: uma base participa na ruptura da parede celular e desnaturação de DNA

SDS: um detergente que solubiliza as membranas celulares e desnatura proteínas)

Solução III – Neutralização

NaOAc (CH_3COONa): um ácido que neutraliza a ação de NaOH e conduz à renaturação do DNA plasmídico (o DNA cromossómico, porque é de grandes dimensões, renatura de um modo irregular formando complexos insolúveis)

Após centrifugação:

'*Pellet*': sedimento de material insolúvel (células, proteínas, DNA genómico, DNA plasmídico, etc)

Sobrenadante: o que não foi depositado após centrifugação (ex. meio de cultura ou suspensão com material biológico solúvel (ex. DNA plasmídico no ponto 7.) ou etanol)

Precipitação e lavagem:

Etanol absoluto: precipita ácidos nucleicos (neste caso DNA plasmídico), excluindo as moléculas de água da molécula de DNA

Etanol 70%: lavagem para remoção de sais

Secagem e ressuspensão:

Ao ar

H₂O ultrapura

'*sp*' – gene de uma protease serínica putativamente envolvida no processo de reconhecimento de patógenos em videira