

Curso de Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular

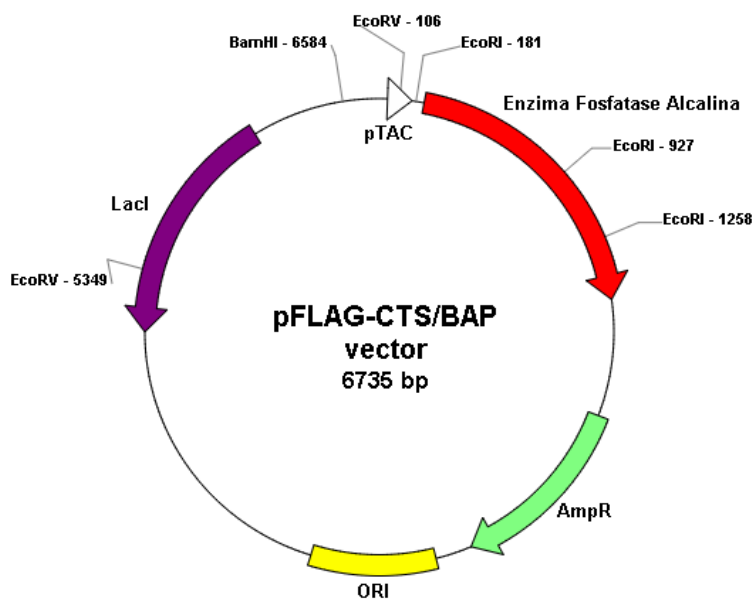
Atividade Aula 19/09/2024

DNA recombinante

Enzimas utilizadas em Clonagem molecular.

Transformação de células competentes

1. Procedimento de Digestão DNA plasmidial:



Preparar a clivagem do vetor separadamente, com as enzimas de restrição selecionadas, conforme o esquema:

Componentes da mistura	Volume (µL)
DNA plasmidial pFLAG-CTS-BAP	15
Tampão da enzima (10x)	2
Mix/Enzima Restrição (<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI/ <i>Eco</i> RV)	1,0
H ₂ O (suficiente para volume final)	20

- Incubar por, no mínimo, 30 minutos na temperatura ótima de atividade da enzima.
- Analisar as amostras por eletroforese em gel de agarose 1%.

2- Procedimento de Ligação:

Preparar a ligação do vetor com o fragmento de interesse de acordo com as instruções do fabricante do kit de ligação, conforme o esquema:

Componentes da mistura	Volume (μL)
Fragmento DNA plasmidial	9
DNA vetor plasmidial	1
Tampão da enzima (10x)	2
Enzima T4 DNA ligase	1
H ₂ O (suficiente para volume final)	20

- Incubar por, no mínimo, 1h, na temperatura ótima da enzima.

3- Procedimento de Transformação por Eletroporação:

1. Adicionar, às células competentes de bactéria *E. coli* BL21, 1 μL da reação de ligação. Misturar com o auxílio da micropipeta;

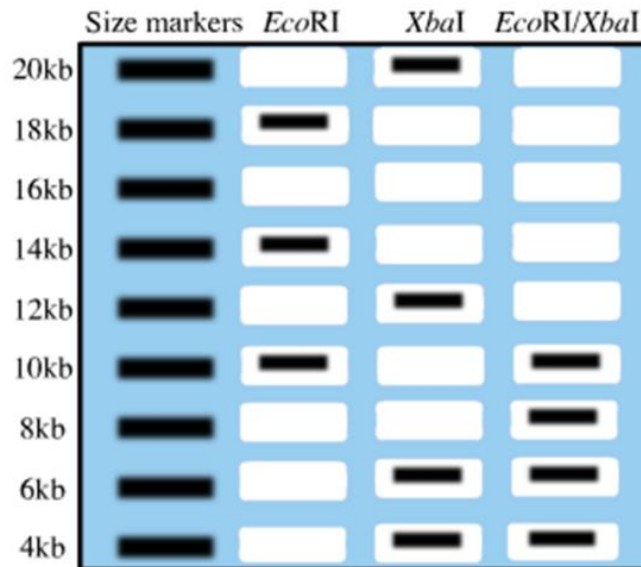
2. A mistura será mantida em gelo e transferida para a cubeta de eletroporação de 0,2 cm. A eletroporação será realizada utilizando o aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf, USA), 2250V, seguindo os parâmetros recomendados pelo fabricante;

3. Após eletroporação, 1 mL de meio LB líquido será adicionado e a cultura será incubada por 1 h, a 37°C,

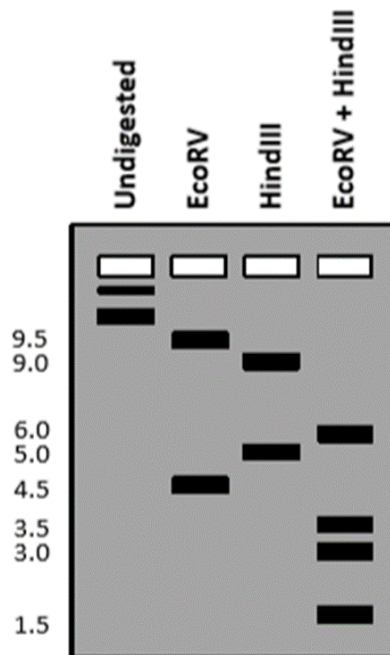
4. Semear em placas de LB ágar contendo o antibiótico Ampicilina (100 ug/ml) e incubar por 18 h em estufa à 37°C.

Exercícios

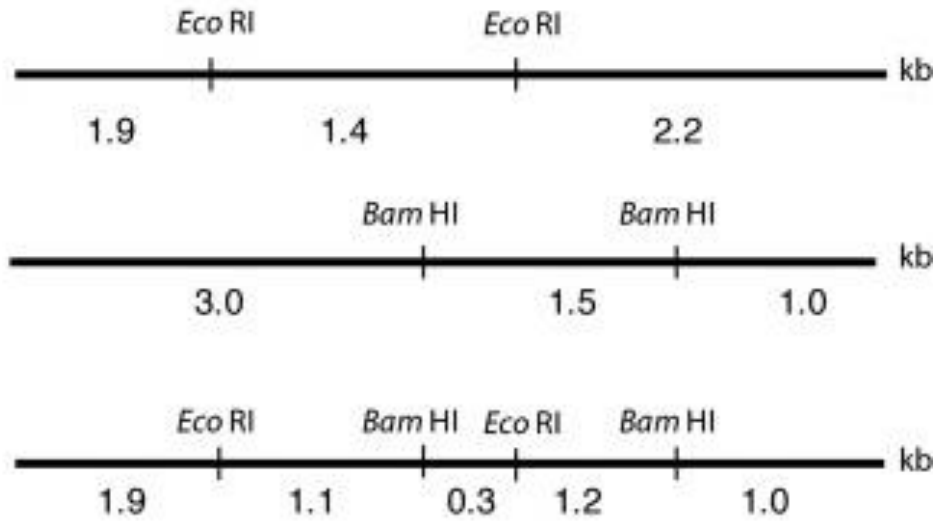
1. Análise com enzimas de restrição, mostra o padrão de bandas de DNA na figura abaixo, utilizando o mesmo como referência, construa o mapa de restrição linear.



2. Análise com enzimas de restrição, mostra o padrão de bandas de DNA na figura abaixo, utilizando o mesmo como referência, construa o mapa de restrição linear.



3. Análise com enzimas de restrição, mostra o mapa de restrição linear de bandas de DNA na figura abaixo, utilizando o mesmo como referência, construa a figura da eletroforese e desenhe o plasmídeo circular.



4. Utilizando o mapa de restrição do plasmídeo abaixo, desenhe o mapa lineal e a figura de eletroforese da restrição utilizando as enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV*, e mistura *EcoRI/BamHI/EcoRV*.

