

Curso de Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular

Atividade Aula 26/09/2024

Análise de confirmação de Clones recombinantes

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de Bactéria:

1. Com um palito de dente pegar uma colônia e suspender em 10 uL de água. Ferver a amostra a 95°C por 5 minutos. Utilizar 2 ul da amostra de Bactéria na reação de PCR (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume (uL)
Tampão Enzima 10x	2,5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTPs 10 mM	2
Primer F	1
Primer R	1
Enzima DNA polimerase	1,0
DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)	2
H ₂ O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

a) Desnaturação inicial	95°C -1 5 min.
b) Desnaturação	95°C - 1 min.
Anelamento	48°C - 30 seg.
Extensão	72 °C - 1 min.
(Repetir todos os itens b - 30x)	
c) Extensão final	72°C - 10 min.
d) Manter a reação	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.