

**Curso de Biotecnologia**

**ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular**

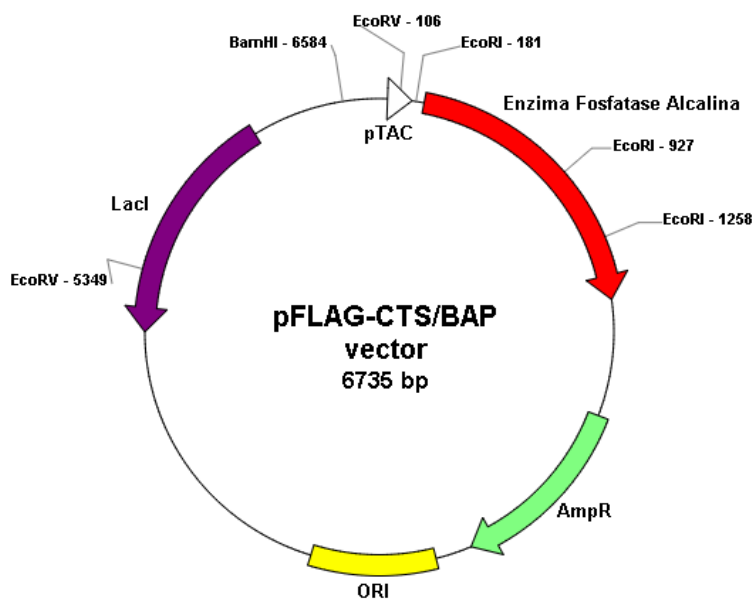
**Atividade Aula 18/09/2025**

**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
Enzima Restrição ( <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI/ <i>Eco</i> RV)	1,0
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O (suficiente para volume final)	20

- Incubar por, no mínimo no tempo e na temperatura ótima da enzima em uso.

## 3- Procedimento de Transformação por Eletroporação:

1. Adicionar, às células eletro competentes de bactéria *E. coli* BL21, 1 μL de DNA de interesse. 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. Recuperar a bactéria, semear em placa de LB ágar contendo o antibiótico de seleção e incubar por 18 h em estufa à 37°C.

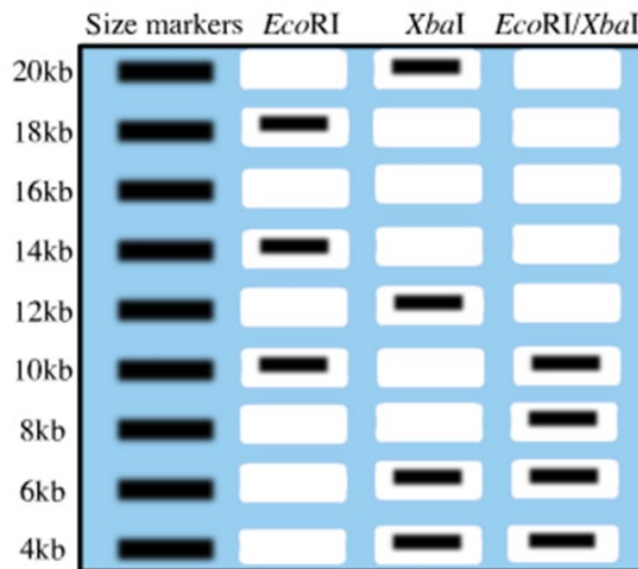
Plasmídeos para transformação:

pGreen (green fluorescent protein)

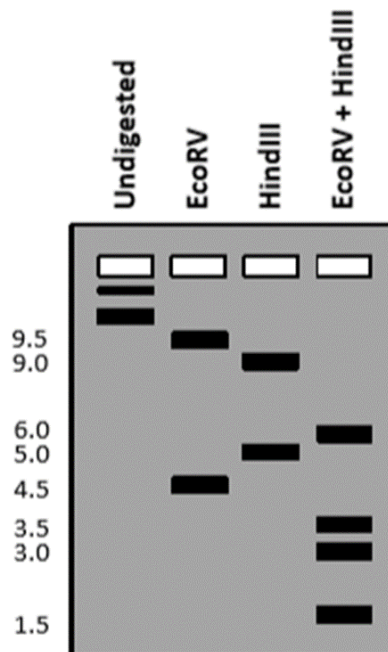
- Marca de Seleção: Ampicilina (Amp) 100 μg/mL

## Exercícios

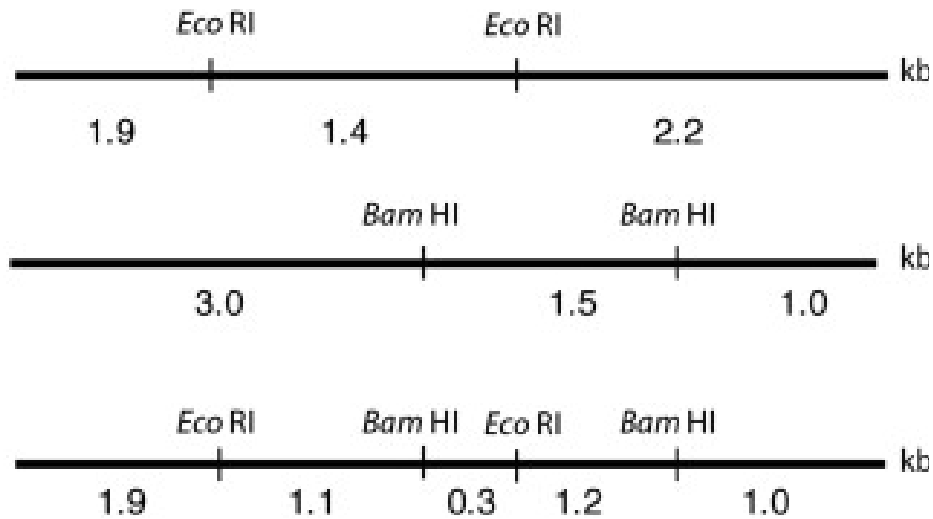
1. Análise com enzimas de restrição, mostra o padrão de bandas de DNA na figura abaixo, utilizando o mesmo como referência, construa o mapa de restrição linear.



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 *Eco*RI, *Bam*HI, *Eco*RV, e mistura *Eco*RI/*Bam*HI/*Eco*RV.

