

Brasília, DF
Dezembro, 2003

Autores

Luciana Beatriz Dutra
Labuto

Assistente de Operações I,
Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia

Jussara Martins Peres
Lopes

Biologia, graduanda CEUB,
Estagiária Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

Zilma Alves dos Reis
Sousa

Técnica Laboratório, Bolsista
Genoma Café;

Vivian do Nascimento
Andrade

Técnica Laboratório, Bolsista
Genoma Café;

Carlos Rodrigues
Borges Neto

Eng. Agr., Dr. Produção Vegetal
– Técnico de Nível Superior
III, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

Protocolos Otimizados para Arranjos de Clones e Minipreparação de DNA

Introdução

A clonagem consiste na obtenção de múltiplas cópias de um gene para que se possa manipulá-lo quimicamente. A clonagem biológica de um gene consiste em inseri-lo em um vetor, que é um DNA capaz de se multiplicar dentro de um sistema vivo; um exemplo é o plasmídeo bacteriano, que é utilizado em Biologia Molecular como vetor de clonagem. O DNA do genoma do doador é cortado em fragmentos, contendo um ou vários genes e permite que estes fragmentos sejam inseridos individualmente no plasmídeo.

Para a amplificação do DNA recombinante, introduz-se o plasmídeo em uma linhagem de bactéria (transformação bacteriana). Uma vez na célula hospedeira, o vetor irá se replicar de modo normal, mas agora que o DNA do doador é parte de seu comprimento, ele se replica automaticamente junto com o vetor. Desta forma cada plasmídeo recombinante que entra na célula irá formar múltiplas cópias de si próprio. Ocorrem muitos ciclos de multiplicação celular e os vetores recombinantes passam por novos ciclos de replicação.

A Biologia Molecular dispõe de técnicas que viabilizam a remoção dos plasmídeos, que contenham os genes clonados, das células bacterianas, para a realização de alguns procedimentos. O arranjo de clones é o primeiro passo para os procedimentos de minipreparação e consiste, basicamente em organizar em placas de cultura permanente, as colônias bacterianas transformadas.

A minipreparação de plasmídeos é uma técnica largamente utilizada, onde os mesmos são removidos das células bacterianas sem perda de qualidade. Nesta técnica, parte da cultura de bactérias transformadas é centrifugada e submetida a soluções que permitem a exposição e o armazenamento dos plasmídeos após a lise bacteriana. Na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório de Genoma Funcional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia têm sido otimizados protocolos para aumentar a eficiência e reduzir os custos da minipreparação de DNA.

Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi otimizar os protocolos da minipreparação e arranjo de DNA, visando a redução de custos, mas tendo como premissa a manutenção da eficácia das técnicas.

Material e Métodos

Adiciona-se 1mL de meio CG (Circle Grow) + ampicilina 100ng/mL, em cada poço da placa de crescimento de 96 poços. Inoculam-se os poços das placas de crescimento com 2uL da cultura bacteriana e sela-se a placa com adesivo, perfura-se cada poço com uma agulha esterilizada. Coloca-se a placa em agitador horizontal, a 240rpm, à 37° C, durante 18 horas. Decorrido este tempo, retira-se a placa do agitador e centrifuga-se à 3.400 rpm por 6 minutos. Descarta-se todo o sobrenadante. Adiciona-se 240uL de solução GET (Tabela 1) em cada poço da placa e a placa é selada com adesivo, sendo levada ao Vortex para ressuspensão das células. Após a ressuspensão, centrifuga-se a placa a 3.400 rpm por 6 minutos, e em seguida descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 80uL de solução GET (Tabela 1), em cada poço, sela-se com adesivo e leva-se, novamente ao Vortex para ressuspensão das células.

Em uma placa de fundo “U” adicionam-se: 2.5ul de RNase 10mg/mL, 60uL da suspensão de células e 60uL da Solução 2 (Tabela 1), recém preparada, em cada poço. Sela-se a placa com adesivo e promove-se a inversão da placa por 20 vezes, e em seguida a placa é deixada sobre a bancada por 7 minutos, posteriormente dá-se um *spin* a 3.000 rpm.

Adiciona-se 60uL da Solução 3 (Tabela 1) em cada poço da placa, sela-se e inverte-se por 20 vezes, deixando-a sobre a bancada por 7 minutos e centrifuga-se por 8 minutos.

Em seguida leva-se a placa à estufa a 90°C por 30 minutos e coloca-se sobre o gelo por 10 minutos, em seguida a placa é selada e levada à centrífuga à 3.400 rpm, por 6 min., a 20°C.

Após retirar a placa da centrífuga, transfere-se todo o volume do lisado de cada poço da placa para uma placa de filtro, já acoplada a uma placa de fundo “V” e centrifuga-se por aproximadamente 5 min., à 3.400 rpm, a 20°C.

Retira-se a placa de filtro e adiciona-se, 90ul de isopropanol 100%, em cada poço contendo o filtrado. A placa é selada com novo adesivo resistente a álcool, invertida por 20 vezes e centrifugada por 45 min., 3.400rpm, a 20°C.

Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 200ul de Etanol 70%, (4°C), em cada poço da placa. Centrifuga-se por 5 min., a 3.400 rpm, a 20°C.

Repete-se o descarte do sobrenadante e centrifuga-se a placa invertida sobre o papel toalha, por 3 min., centrífuga à 900 rpm, à 20°C. A placa é levada à estufa à 37°C durante 15 min., em seguida ressuspende-se o *pellet* de DNA em 40 ul de água MilliQ.

Feito isto, o DNA extraído é quantificado em gel de agarose a 1%, e fotografado em *Eagle Eye*, juntamente a um DNA controle, cuja concentração é conhecida, e através de comparação de bandas, é possível determinar, aproximadamente, a concentração do DNA extraído. A concentração ideal deve estar entre 100-300 ng no caso de plasmídeos, por exemplo.

Os materiais e reagentes utilizados nos procedimentos acima descritos estão listados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1: Soluções utilizadas na minipreparação de DNA.

Solução I (GET)	Solução II	Solução III
Glicose – 20%	NaOH – 4M	Acetato de Potássio – 5M (Autoclavado)
EDTA – 0,5M (pH = 8,0)	SDS – 10%	Ácido Acético Glacial
TRIS -1M (pH = 7,4)	H ₂ O Autoclavada	H ₂ O Autoclavada
H ₂ O Autoclavada	— — — —	— — — —

Tabela 2: Materiais e reagentes utilizados no arranjo de clones

Quantidade p / Placa	Necessária	Material	Embalagem	Preço em US\$	Preço por Placa em US\$
2.2 g		Meio Circle Grow (g)	2.300 g	500,00	0,48
1		MEGA-titer plate	100 unidades	180,00	1,80
1		COSTAR, nº Cat. 3799	1 unidade	5,00	5,00
1		Adesivo - SIMPORT, Cat. T329-3	100 unidades	70,00	0,70
0.01g		Ampicilina (g)	25 g	160,00	0,06
0.8 mL		Glicerol (L)	1.000 mL	70,00	0,06

Tabela 3 Materiais e reagentes utilizados na minipreparação de DNA.

Quantidade p/ 1 Placa	Necessária	Material	Embalagem	Preço em US\$	Preço por Placa em US\$*
1		COSTAR, Cat. 3365	100 unidades	280,00	2,80
1		COSTAR, Cat. 3363	100 unidades	280,00	2,80
1		Placa de filtro MILLIPORE, Cat.MAGVN 2250	10 unidades	128,00	12,80
1.87g		Acetato Na ou K	500g	34,00	0,12
9 ml		Isopropanol	1000mL	35,00	0,32
14 ml		Etanol	1000mL	35,00	0,49
5 mg		RNAse	100 mg	80,00	5,00
2		Adesivo - SIMPORT, Cat. 4306311	100 unidades	86,00	1,72
3		Ponteiras 5-250 ul	Caixa com 96 unidades	2,00	6,00

* Além dos valores apresentados nas tabelas, deve-se computar ao preço de cada placa seqüenciada os gastos com frete/despesa com importação (5%) e overhead (10%).

Resultados

Nos últimos 18 meses o protocolo acima citado, tem sido utilizado com sucesso na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório de Genoma Funcional, para grande parte dos projetos em andamento, necessitado apenas de pequenos ajustes. A otimização do protocolo de minipreparação permitiu a reutilização da Placa de Filtro e das placas de fundo "U" e "V". Então, cada placa pode ser utilizada por 2 vezes, o que diminui o gasto nesta etapa à metade, ou seja de US\$ 12,80 iniciais para US\$ 6,40, por placa

A otimização conseguida com uma reutilização das placas de fundo "U", fundo "V" e de filtro, durante a minipreparação, resultou na economia US\$9,20 por 96 novas amostras.

Circular Técnica , 23

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2003): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Maria José de Oliveira Duarte
Membros: Maurício Machaim Franco

Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Luciano Lourenço Nass

Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz

Expediente