

119

**Circular
Técnica**

Campina Grande, PB
Junho, 2008

Autores

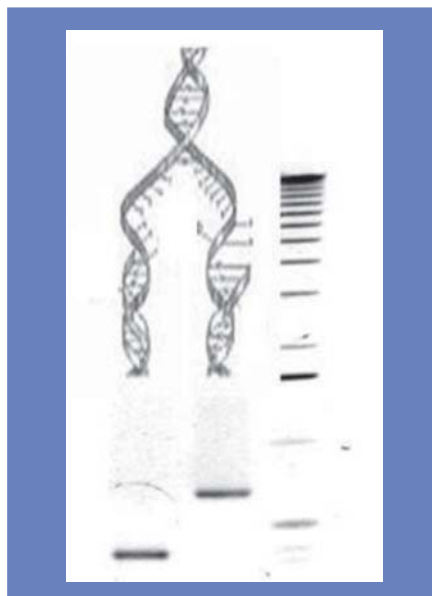
Roseane Cavalcanti dos Santos
Eng. agrôn. D.Sc. da Embrapa
Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143,
Centenário, 58.428-095, Campina
Grande, PB. E-mail:
caval@cnpa.embrapa.br

Carlíane Rebeca Coelho da Silva
Bacharelada em Ciências Biológicas,
UFPE

Liziane Maria de Lima
Bióloga, D.Sc. da Embrapa Algodão,
E-mail: liziane@cnpa.embrapa.br

Péricles de Albuquerque Melo Filho
Profº Associado, DEPA-UFRPE. Rua
Don Manoel de Medeiros, s/n, Dois
Irmãos, 52171-900

Protocolo Simplificado para Maxipreparação de DNA Plasmidial



As práticas de transformação genética de plantas utilizadas em vários laboratórios fazem parte de um conjunto de atividades dinâmicas que, devido à relevância do objetivo a que se propõem, tem exigido cada vez mais praticidade e redução dos elevados custos desta atividade no segmento da engenharia genética.

Uma das atividades mais realizadas nas práticas de transformação de plantas, especialmente quando se adota

a prática de microinjeção, é a maxipreparação plasmidial (maxiprep), que consiste na purificação em grande volume de DNA plasmidial contendo o gene codificante. Rotineiramente, utiliza-se um mínimo de 100 ng/ μ L de DNA plasmidial, cuja qualidade de extração é primordial para o sucesso nas atividades de transformação.

Atualmente, encontra-se disponível em várias empresas do segmento de biologia molecular, uma série de kits para procedimentos de maxipreparação. A base geral dos procedimentos envolve lise das células com uma solução alcalina, seguida de purificação do DNA plasmidial por meio de colunas de resina. O procedimento é rápido, menos de uma hora, porém o valor destes kits situa-se em torno de U\$ 600,00 para até 25 preparações.

De acordo com a metodologia utilizada pela equipe do grupo Sosnick da Universidade de Chicago, as maxipreps são procedidas por meio de protocolos de rotina em que a *lise* alcalina é adotada, seguida de vários processos de purificação com álcoois de cadeias diferentes, além do uso de polietileno glicol e de cloreto de lítio para precipitação de RNAs. Isso demanda dois dias para a finalização de todo o procedimento necessário à produção, em torno de 100 ng/ μ L a partir de 250 mL de meio de cultura.

Apesar do rendimento satisfatório, o tempo gasto para a obtenção do DNA plasmidial por este método é considerado longo, tendo em vista a

necessidade de obtenção do produto em larga escala a ser utilizado nas práticas de transformação. Com intuito de otimizar este processo, alguns protocolos de maxiprep foram testados, baseados nos descritos pela equipe do grupo Sosnick da Universidade de Chicago e nos descritos em Sambrook et al. (1989) e Labuto et al. (2003). Como resultado, será descrito um protocolo validado em temperatura ambiente na maioria dos processos, na qual o DNA plasmidial obtido é íntegro, de bom rendimento e com etapas de execução mais simples, de modo a atender às demandas rotineiras.

Descrição do método

1. Utilizar o inóculo a partir de uma única colônia, que será inoculada em 250 mL de meio LB, contendo ampicilina (50 mg/mL) ou o antibiótico apropriado; incubar sob agitação a 250 rpm durante 18 h a 37 °C. Decorrido este tempo, retirar o inóculo do agitador e centrifugar a 5.000 rpm por 10 minutos em tubos falcon de 50 mL; descartar o sobrenadante.
2. Adicionar, ao precipitado, 5 mL do tampão GTE (Glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8); dissolver com o auxílio de uma pipeta ou utilizando-se o Vortex em velocidade média.
3. Após a ressuspensão, proceder à lise das células adicionando-se ao tubo 10 mL da solução de lise de NaOH/SDS (NaOH 0,2 M, SDS 1%); inverter o tubo lentamente por 10 segundos ou até que a solução se torne clara.
4. Adicionar, rapidamente, 7,5 mL da solução do acetato de potássio 5 M (pH 4.8) para neutralizar o NaOH da etapa anterior e precipitar o DNA genômico. Nesta fase, a solução torna-se branco-opaca devido à presença do SDS. Inverter o tubo lentamente por 10 segundos e centrifugar a solução a 10.000 rpm por 10 minutos.
5. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar 20 mL de isopropanol gelado para precipitar os ácidos nucleicos; estocar o tubo no gelo por 10 minutos, em seguida, centrifugar a amostra a 5.000 rpm por 20 minutos.
6. Descartar o sobrenadante e centrifugar rapidamente para retirar o excesso de isopropanol; dissolver o precipitado em 1 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5); transferir para um microtubo de 1,5 mL.
7. Para digerir os RNAs remanescentes, adicionar, ao tubo, 30 μ L de RNase A (10 mg/mL) e submeter à agitação em Vortex em velocidade média; incubar a 37 °C por 30 minutos em banho-maria.
8. Acrescentar ao tubo, 400 μ L da solução PEG/NaCl (polietileno glicol 30%, NaCl 1,6 M) para precipitar o DNA plasmidial; incubar por 1 hora.
9. Centrifugar o tubo em velocidade máxima por 1 min; descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 400 μ L de tampão TE .
10. Adicionar o mesmo volume (400 μ L) de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) para a extração das proteínas remanescentes. Inverter o tubo por 1 minuto e centrifugar à velocidade máxima por 5 minutos.
11. Transferir, cuidadosamente, a fase aguosa para um novo microtubo e adicionar 100 μ L de acetato da amônia 7,5 M; inverter o tubo por 10 segundos; acrescentar 1 mL de etanol absoluto para finalizar o processo de precipitação do DNA plasmidial; incubar o tubo em gelo por 10 minutos.
12. Centrifugar a amostra em velocidade máxima por 5 minutos; descartar o sobrenadante; fazer uma centrifugação rápida e retirar o excesso de etanol; dissolver o precipitado em 200 μ L de TE ou água ultra pura.

Para validar o protocolo, utilizou-se uma colônia *Escherichia coli*, célula INVF alfa (Invitrogen), contendo uma construção composta pelo vetor pUC 57 (2.7 Kb) + cassete de expressão do gene cry1a (3 Kb), ligado in frame no vetor nos sítios das enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Após a maxipreparação, uma alíquota de 3 μ L foi usada para digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Promega) por 2 horas a 37 °C. Na Figura 1, encontra-se uma amostra da maxipreparação (5,7 Kb) em gel de agarose (1%) e o resultado da respectiva digestão, comprovando a pureza da amostra.

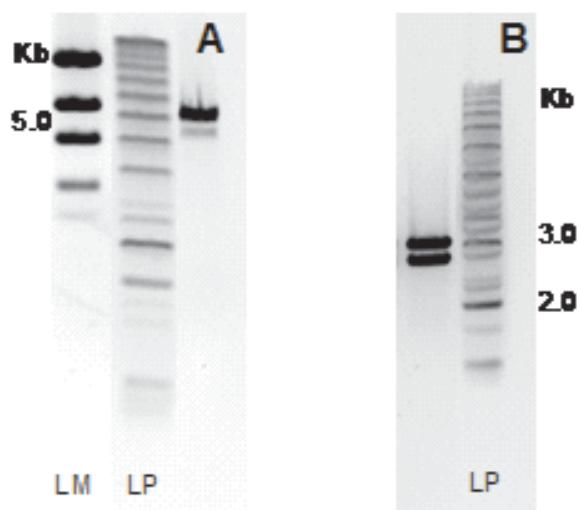


Fig.1. Maxiprep (A) e Digestão (B) do vetor pUC 57 (2.7 Kb) + cassete de expressão do gene cry1a (3 Kb). Para a maxipreparação aplicou-se 1 μ L de DNA em gel de agarose (1%) e para digestão, utilizou-se 3 μ L da maxipreparação. Marcador de peso molecular: HM- High Mass (Invitrogen), LP-.Ladder Plus (Invitrogen).

Conclusão

A otimização deste protocolo de extração de DNA plasmidial é de grande aplicabilidade para os que necessitam de grande volume de DNA para as

operações de rotina. O tempo de execução é de menos de 3 horas e tem rendimento entre 100 - 200 ng/ μ L de DNA plasmidial. A quantidade do DNA pode ser aumentada, utilizando-se maior volume de inóculo. A execução é simples e pode ser utilizada em qualquer laboratório de biologia molecular a um custo bem mais baixo considerando-se os kits disponíveis no mercado.

Referências Bibliográficas

LABUTO, L. B. D.; LOPES, J. M. P.; SOUSA, Z. A. R.; ANDRADE, V. N.; BORGES NETO, C. R.

Protocolos otimizados para arranjos de clones e minipreparação de DNA. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 22).

SOSNICK LAB. Disponível em: <<http://sosnick.uchicago.edu/>> Acesso em: 03 mar. 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.

Molecular cloning: laboratory manual. Harbor: Cold Spring Harbor Lab., v.1, 1989.

Circular Técnica, 119

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58428-095 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª Edição
Tiragem: 500

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva

Secretário Executivo: Valter Freire de Castro

Membros: Fábio Aquino de Albuquerque

Giovani Greigh de Brito

João Luiz da Silva Filho

Maira Milani

Maria da Conceição Santana Carvalho

Nair Helena Castro Arriel

Valdinei Sofiatti

Wilton Macedo Coutinho

Expedientes: Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro

Revisão de Texto: Maria José Silva e Luz

Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de S. Filho

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de S. Filho