

PROTOCOLLO

Desenvolvimento de microssatélites para *Arapaima gigas*

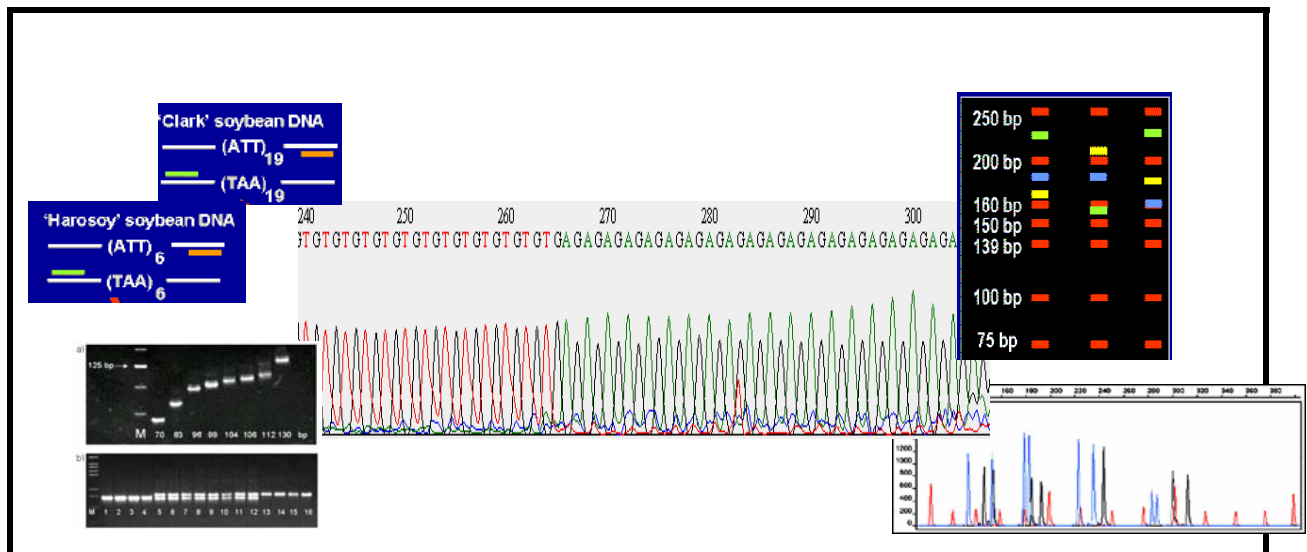
Izeni Pires Farias
Universidade Federal do Amazonas

Tomas Hrbek
University of Puerto Rico

Henner Brinkmann
Université de Montréal

Colaboradores: Doriane Picanço, Claudia Nunes e Enedina Nogueira
Universidade Federal do Amazonas e Pará

* O método aplicado neste protocolo é uma modificação do método desenvolvido por Tenzer et al. (1999) com subsequente modificação do método de Barbara Gautschi (Gautschi *et al.* 2000a, 2000b)



I. INTRODUÇÃO

As seqüências repetitivas foram descobertas por meio de separação em gradientes de densidade do DNA genômico por ultracentrifugação em solução de cloreto de cério. Uma vez que apresentam baixo grau de complexidade e o conteúdo de G+C difere significativamente do restante do genoma, possuem densidade física diferente e por isso formam bandas superiores no gradiente e foram chamados DNA satélite. *Loci* satélites podem ser constituídos de repetições com tamanho de dois a vários milhares de pares de bases. Estão localizados na heterocromatina, principalmente no centrômero (Tautz, 1989, 1993).

De acordo com o tamanho, estes *loci* foram divididos em duas categorias: minissatélites são repetições de 9 a 100 pares de bases, e microssatélites são repetições de 2-6 pares de bases (Murray, 1996). Os microssatélites têm sido classificados de acordo com a natureza das repetições em *perfeito* (sem interrupções), *imperfeito* (com uma ou mais interrupções) e *compostos* (repetições adjacentes de uma seqüência diferente) (Weber, 1990).

Marcadores Moleculares Microssatélite ou Sequências Simples Repetitivas (SSR), também chamados *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS) ou *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP) são pequenas seqüências (*sequence motif*) com 1 a 4 nucleotídeos, repetidos em linha (Figura 1).

Mononucleotídeos	TGCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGATC
Dinucleotídeos	TGCATTGTATATATATATATACTGGATC
Trinucleotídeos	TGCATTGTGATGATGATGATGACTGGATC
Tetranucleotídeos	TGCATTGTGACTGACTGACTGACCTGGATC

Figura 1 – Classificação dos microssatélites de acordo com o número de nucleotídeos repetidos

Os *loci* microssatélite são multi-alélicos codominantes, evoluem através de processos mutacionais decorrentes dos erros da DNA polimerase (*slippage*) ou de *Crossing over* desigual. As taxas de mutação variam de 10^{-3} a 10^{-6} (Hoelzel, 1998). Apesar de suas altas taxas evolutivas, os microssatélites são conservativos em suas regiões flangeadoras e podem persistir por um longo período sem modificações (Zardoya *et al.*, 1996).

Os marcadores microssatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos conhecidas atualmente. As diversas aplicações, tais como mapeamento genético, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos, paternidade e biologia da

conservação, dependem, portanto do desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para estas regiões genômicas serem amplificadas através da PCR.

Diversos métodos têm sido usados para o desenvolvimento desses primers para regiões microssatélites. O método aqui descrito foi modificado por Farias, Hrbek & Brinkmann (unp.) a partir do método desenvolvido por Tenzer et al. (1999) com subsequente modificação do método de Barbara Gautschi (Gautschi *et al.* 2000a, 2000b).

II. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE

1. DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO

As enzimas de restrição ou endonucleases de restrição do Tipo II são proteínas monoméricas ou diméricas e clivam o DNA no mesmo sítio do seu reconhecimento. O sítio de reconhecimento deste tipo de enzima é normalmente uma sequência *palindrômica*, isto é, ela tem um eixo de simetria e a sequência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida na direção oposta (Figura 2).

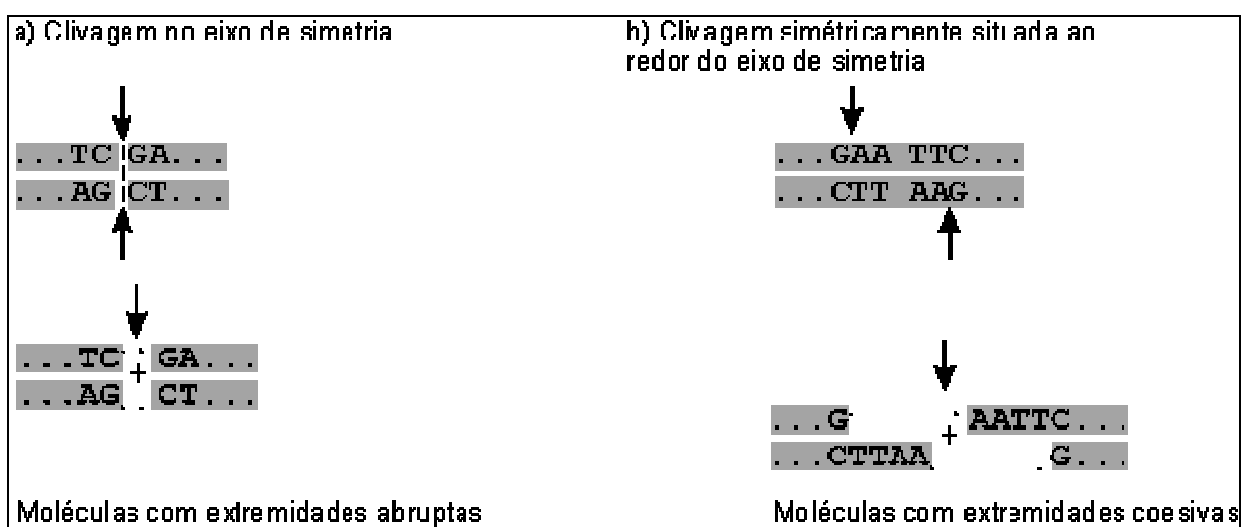


Figura 2 - Dois tipos de clivagem por enzimas de restrição. As setas indicam os sítios de clivagem. As linhas pontilhadas representam o centro de simetria da sequência.

- A digestão do DNA genômico pode ser realizada com a enzima SAU 3AI (2U/μg). Esta enzima possui o sítio de restrição 5' GATC 3' e 3' CTAG.

1) Colocar em um tubo de eppendorf de 0,6 ml:

- . DNA 100 μl (aproximadamente 10 μg)
- . Tampão da enzima 10 μl
- . Enzima 2 μl (2U/μg)
- . Água /milli-Q autoclavada 88 μl

- 2) Misturar gentilmente e deixar em banho Maria a 37° C por 4 hs. (Se usar outra enzima prestar atenção se é a mesma temperatura de desnaturação)
- 3) Visualizar a digestão usando 10 µl do DNA digerido em gel de agarose 1%, usando marcador molecular 1Kb (Figura 3).

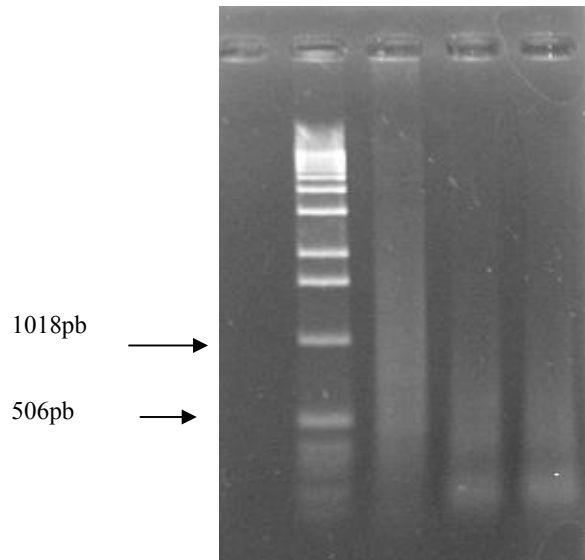


Figura 3 – Observação do resultado da digestão com SAU 3A1.

- 5) Após visualizar em gel, o DNA (195 µl) deve ser precipitado usando:

1/10 vol (19.5 µl) de NaAc 3 M

2 vol (380 µl) de etanol 100%

- 6) Misturar e deixar por 30 minutos em gelo.
- 7) Centrifugar na velocidade máxima (14000 g) a 4° C por 15 min.
- 8) Descartar o sobrenadante, lavar com 1 ml de etanol 70%.
- 9) Misturar bem usando vortex (obs: o pellet deve soltar da parede do tubo).
- 10) Centrifugar por 5 min a 4° C na velocidade máxima.
- 11) Descartar o álcool.
- 12) Secar e ressuspender com 50 µl de TE.

2. SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS

Uma importante consequência da especificidade destas enzimas de restrição é que o número de clivagens feito por cada uma delas no DNA de qualquer organismo é definido e permite o

isolamento de fragmentos deste DNA. Portanto, cada enzima de restrição gera uma família única de fragmentos quando cliva uma molécula de DNA específica. Enzimas que reconhecem sítios de restrição compostos por 4 pares de bases clivam o DNA em média a cada 256 nucleotídeos ($4^4=256$). Aquelas que reconhecem sítios com 6 e 8 pb clivam o DNA em média a cada 4096 e 65536 pb, respectivamente. No entanto, esta média pode sofrer variações significativas, dependendo principalmente da composição de bases do DNA analisado. A família de fragmentos gerados por digestão com enzima de restrição é geralmente detectada pela separação destes fragmentos por eletroforese em gel de agarose. Para a construção da biblioteca genômica enriquecida com regiões microssatélites o ideal é obter fragmentos entre 300 – 900 pb. Para tanto segue o protocolo:

- 1) Correr toda a amostra (50 µl) em gel de agarose a 1% (juntar os pocinhos p/ criar um poço maior, utilizar marcador de 1 kb e migrar por 2h a 60 v).
- 2) Cortar o gel contendo a banda de DNA no tamanho desejado.

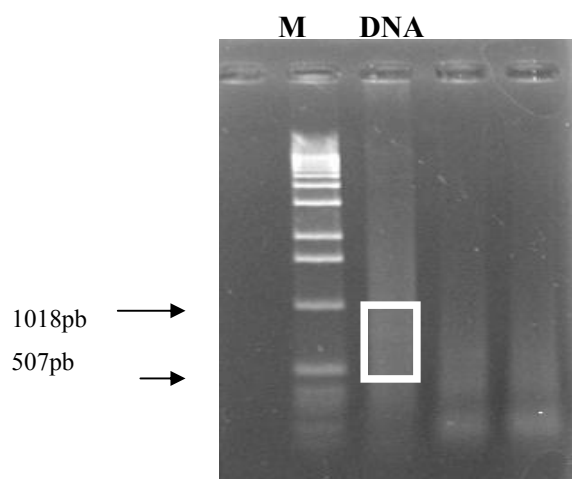


Figura 4 – Seleção de fragmentos entre 900 e 300pb do DNA de *Ucides cordatus* digerido com SAU 3A1.

Purifica-se o produto dos géis contendo DNA dos fragmentos selecionados usando-se kit de purificação de PCR (Amersham, Promega, Qiaquick , etc).

3. REAÇÃO DE ANELAMENTO DOS ADAPTADORES

Os fragmentos selecionados serão, então, ligados à um fragmento de sequência conhecida (*Linker*) para amplificação via PCR. O *Linker* é obtido a partir do anelamento de um par de oligonucleotídeos (adaptadores), e se ligará aos fragmentos através de uma ponta coesiva complementar ao corte da enzima.

➤ Para obter os *Linkers*:

1) Em um tubo de PCR de 200 µl, para uma reação com vol final de 100 µl, adiciona-se:

50 µl de cada oligo adaptador (100 µM de cada)

0.8 µl de NaCl (5M)

49,2 µl de TE pH 8.0

Sequência dos adaptadores:

Er1Bh1Blunt – 5' **CGG AAT TCA GTG GAT CCT GCC** -3'

Er1Bh1GATCSticky -3' **GCC TTA AGT CAC CTA GGA CGG CTAG** -5'

2) Colocar esse mix no termociclador e submeter à 1 ciclo de:

95° C – 3'

65° C – 2'

45° C – 2'

25° C – 1'

4° C – ∞

4. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS LINKERS AOS FRAGMENTOS DE DNA GENÔMICO

As extremidades coesivas produzidas por várias enzimas de restrição permitem dois fragmentos de DNA ligarem-se facilmente, através da formação de pontes de hidrogênio pela complementariedade das bases. A ligação covalente dos fragmentos é realizada pela DNA ligase que requer um grupo OH livre na extremidade 3' de uma das cadeias de DNA e um grupo fosfato na extremidade 5' da outra cadeia (ver figura 4).

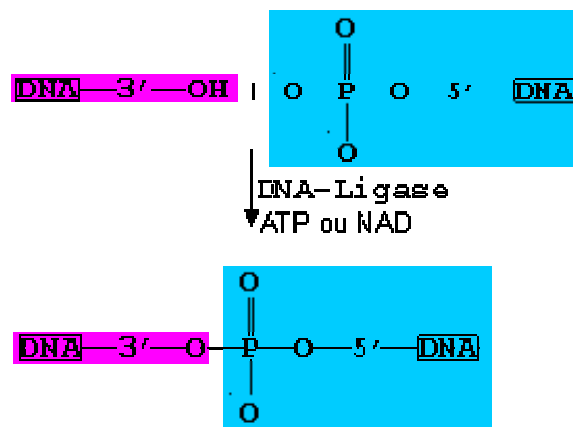
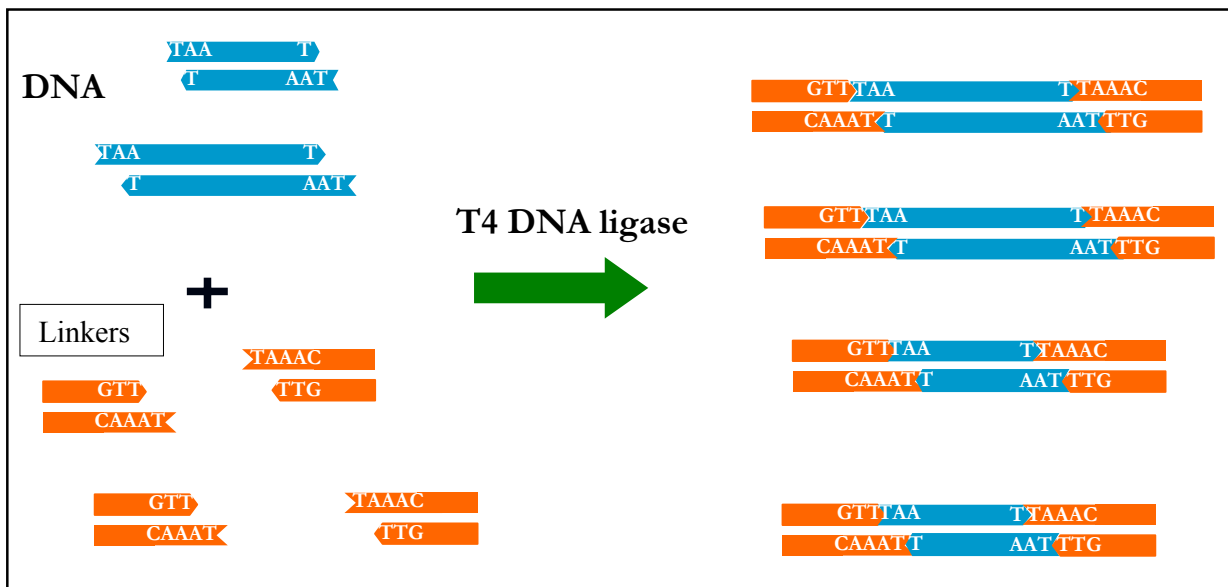


Figura 4. DNA ligase cataliza a junção de duas fitas de DNA que são partes da molécula da dupla-hélice.



➤ Para ligar os fragmentos de DNA ao *Linker*

1) Em um tubo de 200 µl, para uma reação com volume final de 100 µl, adiciona-se:

50 µl de água milli-Q

25 µl de DNA (2-3 µg/µl)

10 µl do *linker*

10 µl do tampão da enzima ligase (5X)

5 µl de T4 Ligase (Fina 0.2 U/µl)

Programa:

16°C - 12 h

65°C - 20'

4° - ∞

2) Amplificar e quantificar o produto da ligação em gel de agarose 1 % colocando 5 µl do produto da ligação (migrar junto marcador 1kb).

11.7 µl de água Milli-Q

4 µl do primer *Blunt* a 2µM (2pmol/µl)

3,0 µl de MgCl₂ 25 mM

2,5 µl de dNTP 25 mM

2.5 µl de tampão 10X

0.3 µl de *Taq* DNA polimerase

1.0 µl do produto de Ligação (DNA ligado aos linkers)

Programa (termociclador):

72° C – 5' (para liberar o primer blunt e a enzima extender o resto do fragmento)

30 Ciclos de: 94° C – 35"

53° C – 35"

72° C – 1' 30"

72° C – 7'

4° C - ∞

M DNA

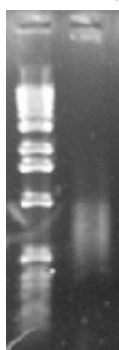


Figura 5. Resultado do PCR teste da Ligação aos adaptadores.

4) Para enriquecer o produto da ligação e evitar a seleção e exclusão casual de fragmentos. O produto da reação de ligação é então amplificado usando-se apenas o primer **Blunt** (25 reações).

- para uma reação com VF de 25 µl:

11.7 µl de água Milli-Q;

3,0 µl de MgCl₂ 25 mM;

2,5 µl de dNTP 25 mM;

2.5 µl de tampão 10X;

4 µl do primer *Blunt* a 2µM (2pmol/µl);

0.3 µl de *Taq* DNA polimerase.

1.0 µl do produto de Ligação (DNA ligado aos linkers).

Programação do termociclador:

72° C – 5'

12 Ciclos de: 94° C – 35"

53° C – 35"

72° C – 1' 30"

72° C – 7'

4° C - ∞

5) Purificar o produto da amplificação da ligação usando kit (Amersham, promega, qiaquick , etc) de acordo com as recomendações (como para cada amostra fizemos vários produtos de PCR, agora podemos juntar 5 reações em cada coluna de purificação).

5. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA HIBRIDIZAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

O enriquecimento da biblioteca de regiões contendo as repetições desejadas é realizado através da hibridização dos fragmentos com uma sonda marcada com biotina. Esta proteína se ligará a avidina contida nas bolas paramagnéticas (Dynabeads) (Figura 5).

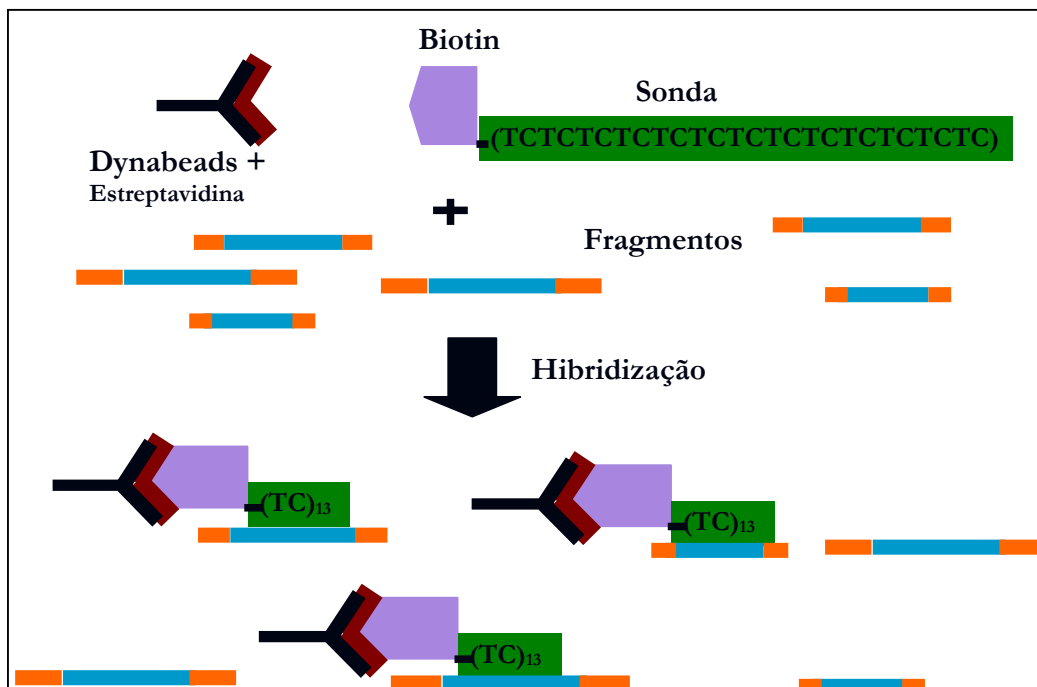


Figura 6 – Enriquecimento da biblioteca de DNA com fragmentos contendo regiões repetitivas.

5.1. Reação de Biotinização das sondas

- A sonda escolhida (CT¹², CA¹⁰, ...) deve ser então, marcada com biotina, através de uma reação catalizada pela terminal transferase.
- 1) Ressuspender os probes (repeats de CA ou CT, ou outros) para uma concentração final de 40 µM. A reação é preparada para cada Probe de cada amostra.
- 2) Preparo da solução no tubo de eppendorf 1.5 mL (usar luvas! A biotina é uma proteína):
 - 21 µl de água.
 - 8 µl do tampão 5X da terminal transferase;
 - 8 µl do Probe 100 µM;
 - 2.5 µl de d-UTP biotina[Boehringer Mannheim];
 - 0.5 µl de terminal transferase (compra-se esta enzima separadamente)
- 3) Incubar a reação em banho maria a 37° C por 25 minutos exatos.
- 4) Após os 25 min remover o tubo do banho maria e adicionar:

- **100 µl de etanol 100%**

- **4 µl de acetato de sódio 3M,**

5) Colocar overnight em freezer -20°C .

6) No próximo dia centrifugar a reação de biotinizilação em 13000 RPM por 30 min.

7) Remover o etanol e lavar o pellet com **100 µl etanol 70%**.

8) Centrifugar por 30 min 13000 RPM.

9) Remover o etanol, secar (speed vacuum, estufa ou TA).

10) Ressuspender em **100 µl água Milli-Q**.

11) Manter em geladeira.

5.2. Preparação dos dynabeads:

➤ Os *dynabeads* vêm em uma solução de 0,02 % de NaN_3 que deve ser removida antes de ligar-se ao probe (lavar com tampão B & W). Uma vez que o probe tenha sido ligado, o complexo bead-probe é estável na geladeira por meses (OBS: Não congelar os beads em nenhum momento!).

1) Ressuspender bem o conteúdo do tubo que contem os dybeads;

2) Pegar **200 µl de dynabeads** (fechar bem os tubos);

3) Encostar o ímã na parede do tubo de eppendorf esperar agrupar e remover a solução de estocagem com micropipeta de forma que fique somente os beads no tubo.

4) Adicionar **200 µl da solução PBS/BSA** ;

5) Vortexar manualmente para homogeneizar os beads na solução;

6) Encostar o ímã novamente na parede do tubo e retire a solução de lavagem.

* Repetir a partir do passo 4 mais 2 vezes.

7) Remova a solução novamente com o uso do ímã e adicionar 200µl da solução **B & W** e homogeneizar manualmente.

8) Separar essa solução em alíquotas de 100 µl (2 tubos com 100 µl cada);

9) Estocar na geladeira até que tudo esteja pronto para formar o complexo com o probe.

5.3. Preparo do complexo Biotina-Avidina

1) Adicionar os **100 µl do probe biotinizado** em um dos tubos que contem **100 µl dos beads** (que previamente foi mantido à TA), totalizando 200 µl.

2) Deixar o tubo a TA por 1h;

3) Colocar os tubos com o complexo já formado [(biotina + sonda) + (dynabeads + estreptavidina)] na geladeira até que tudo esteja pronto para pescar os microssatélites.

6. HIBRIDIZAÇÃO DA LIGAÇÃO (linker-ssr) COM O COMPLEXO (biotina-avidina)

A temperatura utilizada na hibridização corresponde à temperatura dos primers dos repeats. Usamos 60° C para os repeats de CA e CT.

5.1. Pré-procedimentos:

- 1) Pré-aquecer o hibridizador para a temperatura adequada (neste caso 60° C);
- 2) Aquecer as soluções **10X SSC (0,2% SDS)** e **2X SSC (0,1%)** no hibridizador (estufa) (se o tubo contendo a solução **5X SSC (0,1% SDS)** apresentar uma cor branca de precipitação, aqueça-o também, mas esfrie em TA antes de usá-lo).
- 3) Transferir o **produto da PCR da ligação** (150 µl) para eppendorf de 200µl e desnaturar o DNA por 5 minutos a 95°C em um termociclador, em seguida mantenha-o no gelo.

5.2. Lavagem do Complexo:

- 1) Lavar **200µl do complexo [(biotina + sonda) + (dynabeads + estreptavidina)]** com 200 µl **tampão B&W**: acrescentar o tampão, agitar manualmente até homogeneizar bem, separar magneticamente (com ímã), pipetar e descartar a solução;
- 2) Lavar mais uma vez com 200 µl de **tampão B&W**;
- 3) Repetir o procedimento com 200µl da solução **5X SSC (0,1% SDS)** (à temperatura ambiente);
- 4) Adicionar 150 µl da solução pré-aquecida **10XSSC (0,2% SDS)**, homogeneizar e iniciar a hibridização (não pipetar a solução).

5.3. Hibridização:

- 1) Adicionar **150µl do produto da PCR** da ligação desnaturado à esta solução contendo o complexo lavado;
- 2) Manter esta reação (complexo em 10XSSC (0,2% SDS + produto da ligação amplificado) em rotação no hibridizador por 4 horas (cuidar para que o eppendorf esteja bem fechado). Periodicamente checar o tubo para evitar que os beads se localizem em somente uma parte do tubo de eppendorf (a mistura tem que ser mantida homogênea durante toda a hibridização);

5.4. Separação do hibridizado (sonda + fragmentos de DNA) dos beads:

- 1) Após as 4 horas de hibridização, lavar duas vezes os **beads hibridizados** com **200µl da solução 2X SSC(0,1% SDS)** à temperatura ambiente: a cada lavagem misturar gentilmente invertendo vagarosamente o tubo por 5 minutos, separar magneticamente e descartar a solução;
- 2) Lavar os beads hibridizados com **200µl da solução pré-aquecida 2X SSC(0,1% SDS)**: agitar gentilmente o tubo durante 10 minutos no hibridizador (60°).

- 3) Lavar com **200µl da solução TE/NaCl**: misturar gentilmente invertendo vagarosamente o tubo, separar magneticamente, pipetar a solução e guardar em eppendorf.
- 4) Resuspender os beads hibridizados em **200µl de TE** (neste tampão o DNA deverá se “desligar” dos beads): separe os beads com o ímã e guarde a solução em eppendorf.

* Para reutilizar os beads em outra hibridização adicione aos beads o tampão B & W (200 µl) e mantenha os beads na geladeira.

5.4. Verificação da Hibridização

- 1) Fazer uma PCR normal para verificar o resultado da hibridização (para reação com VF de 25 µL):

- . 11.7 µl de água Milli-Q;
- . 3,0 µl de MgCl₂ 25 mM;
- . 2,5 µl de dNTP 25 mM;
- . 2.5 µl de tampão 10X;
- . 4 µl do primer *Blunt* a 2µM (2pmol/µl);
- . 0.3 µl de *Taq* DNA polimerase.
- . 1,0 µl do produto da hibridização

Programação do termociclador:

$$30 \text{ Ciclos de } \begin{cases} 94^{\circ}\text{C} - 1' \\ 94^{\circ}\text{C} - 1' \\ 55^{\circ}\text{C} - 1' \\ 72^{\circ}\text{C} - 1' \\ 72^{\circ}\text{C} - 5' \\ 4^{\circ}\text{C} - \infty \end{cases}$$

- 2) Correr o produto da PCR junto com marcador de 1kb em gel de agarose a 1% por cerca de 1h a 70V (deve apresentar um rastro semelhante ao observado nas etapas anteriores (entre 300pb e 1KB))

6. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS MICROSSATÉLITES HIBRIDIZADOS

- 1) Fazer a mesma reação da PCR teste só que em 25 replicatas (para cada repeat). O programa a ser utilizado é:

$$15 \text{ Ciclos de } \begin{cases} 94^{\circ}\text{C} - 1' \\ 94^{\circ}\text{C} - 1' \\ 55^{\circ}\text{C} - 1' \\ 72^{\circ}\text{C} - 1' \\ 72^{\circ}\text{C} - 30' * \\ 4^{\circ}\text{C} - \infty \end{cases}$$

* Importante saber: A Taq polimerase adiciona uma Adenina ao 3' end no produto do PCR como um artefato do PCR, a qual é perdida logo após o término da reação. O TOPO TA cloning kit inclui um vector (plasmídeo) que apresenta uma Timina extra no final 3', o qual deve parear com a 3'- Adenina do produto do PCR. Desta forma, este kit é especialmente desenvolvido para ligar fragmentos frescos de PCR.

2) purificar imediatamente o produto dessa PCR usando kit não milipore (Amersham, promega, qiaquick, etc). Como para cada amostra fizemos vários produtos de PCR, agora podemos juntar 5 reações em cada coluna de purificação. Recuperar o produto final em 40 µl de tampão. No final teremos 120µl de produto para ser usado na ligação (se o seu produto de PCR está em uma concentração de 200ng/µl, use este stock para a ligação, apesar do kit sugerir apenas 10ng de DNA).

7. LIGAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO AO VETOR

O produto do PCR é então ligado ao vetor imediatamente após a purificação, usando o Original TOPO TA Cloning Vector kit (Invitrogen) (use cerca de 200 ng de DNA ao invés de 25ng do produto de PCR como sugerido pelo kit).

7.1. Reação de Ligação

1) Misturar os reagentes em temperatura ambiente e deixar atuar por 25 minutos

- DNA = 4.5µl

- Topo vector = 0.5 µl

- Salt (ATP, MgCl₂) = 1µl

8. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS:

Após o isolamento de uma informação genética, por exemplo um fragmento de DNA obtido pela clivagem com enzimas de restrição, este fragmento deverá ser inserido numa outra molécula de DNA diferente, capaz de amplificar aquela informação genética em centenas de cópias. Este processo de amplificação é obtido através do uso de moléculas de DNA que são os chamados *vetores de clonagem molecular*.

Atualmente, os tipos básicos de vetores usados na tecnologia do DNA recombinante apresentam características especiais que os tornam excelentes veículos de clonagem em diferentes situações.

O plasmídeo é o principal tipo de vetor atualmente em uso na biologia molecular. Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA dupla fita, circular, contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico. São elementos genéticos extra cromossomais que variam de 5 a 400 Kbp (1Kbp = 1000 pares de bases) e

comumente estão presentes em duas ou mais cópias por célula, podendo chegar a centenas. Os plasmídeos presentes num grande número de cópias são usados como veículos de clonagem desde que capacitem a amplificação do segmento do DNA neles clonado. Para ser um bom vetor de clonagem, um plasmídeo deve conter as seguintes propriedades (Figura 8):

- a) possuir uma *origem de replicação* (O), ou seja, uma sequência de DNA que permita que o vetor seja replicado na célula hospedeira,
- b) apresentar sítios únicos de clivagem para enzimas de restrição. O conjunto destes sítios é denominado de *Sítio Múltiplo de Clonagem* (SMC) e é o local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem,
- c) possuir um gene que codifica um produto que distingue a célula com plasmídeo da célula sem plasmídeo. Por exemplo, muitos vetores de clonagem carregam o gene que confere resistência à ampicilina (Amp^R). As células que recebem tais vetores são capazes de crescer em meio contendo o antibiótico, enquanto que as células que não o receberam acabam morrendo.

A figura a seguir ilustra as principais características estruturais de um plasmídeo.

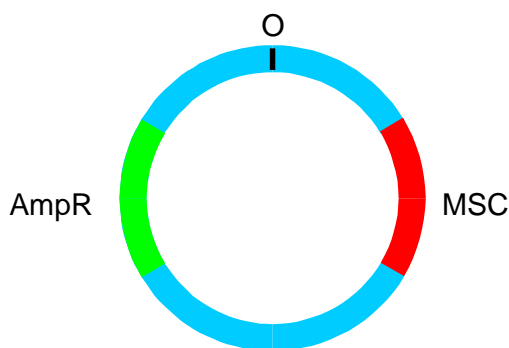


Figura 8. Esquema de um plasmídeo típico usado em clonagem molecular

Um dos passos fundamentais no processo de clonagem molecular é o uso de enzima de restrição que produz extremidades compatíveis durante a clivagem do DNA a ser clonado (inserto) e a do DNA receptor (vetor). Uma vez que o DNA foi ligado ao vetor, esta molécula híbrida (Figura 9) deverá ser introduzida numa célula hospedeira, geralmente bactérias, por um processo chamado de transformação, para que o vetor possa sofrer replicações e conseqüentemente amplificar o número de cópias do inserto. A bactéria transformada será facilmente reconhecida pela aquisição de um novo fenótipo dado pelo plasmídeo, ou seja, capacidade de crescer em meios contendo antibiótico.

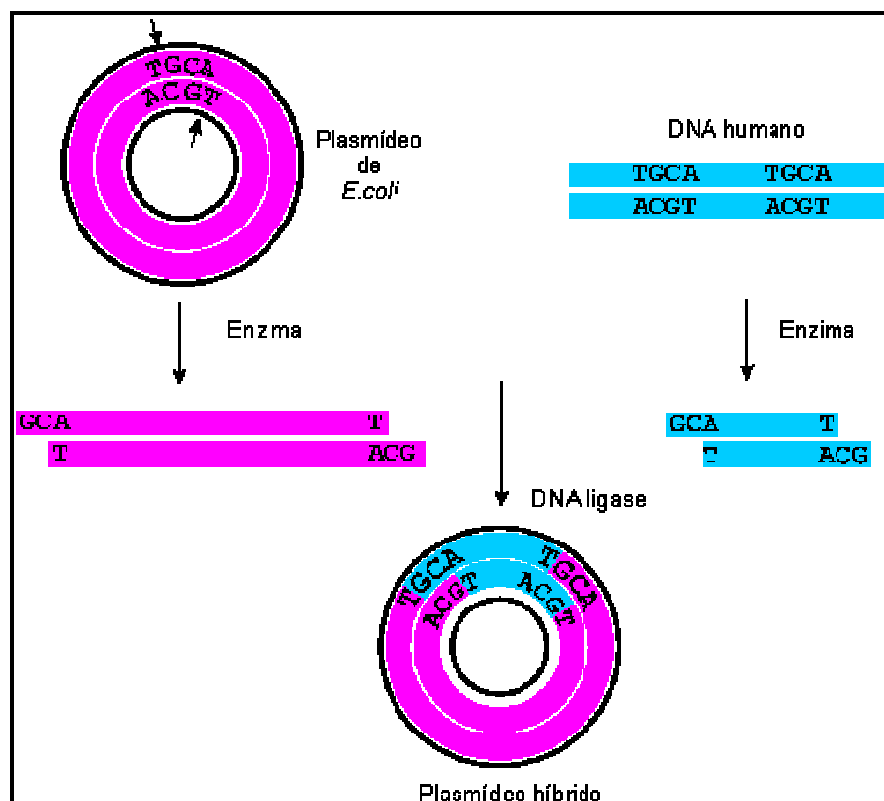


Figura 9. Construção de uma molécula de DNA híbrida a partir de fragmentos de diferentes organismos obtidos com o uso de enzima de restrição.

8.1. Preparo das células competentes

* SE ESTIVER USANDO CÉLULAS DO KIT **TOPO TA CLONING**

- 1) Adicionar o material da ligação (6 µl) **passo 7.1** em tubos contendo 50 µl de células competentes;
- 2) Incubar no gelo por 5 a 30 minutos;
- 3) Submeter o sistema a um choque térmico de 42°C por 30 segundos sem agitação;
- 4) Imediatamente transferir o sistema para o gelo e adicionar 250 µl de meio SOC a temp. ambiente
- 5) Incubar os tubos horizontalmente a 37°C e manter em baixa agitação por 1 hora. Este material está pronto para ser inoculado em placas de cultura.

OBS: Inocular em placas de cultura volumes de material entre 10 a 50 µl . Para assegurar um melhor crescimento das placas contendo pequeno volume (p. ex 10 µl), adicionar 20 µl de meio Soc ou meio LB- líquido.

*SE ESTIVER USANDO CÉLULAS PARA TRANSFORMAÇÃO PELO MÉTODO DE Tris-cálcio

PRÉ- INÓCULO

1. Coletar uma colônia bem isolada de bactéria (hospedeira)
2. Inocular em um tubo contendo 5 ml de **meio LB -líquido** e incubar a 37°C durante a noite.

INÓCULO

3. Inocular 0,5 ml desta cultura em 50 ml de LB- líquido.
4. Incubar a 37°C sob forte agitação (100-150 rpm) por 3 a 4 horas até a densidade da cultura atingir 0,3 a 0,4 O.D. medidos a 600 nm.
5. Coletar as células de 50 ml de cultura, utilizando um tubo estéril, centrifugando-se em baixa velocidade (2.500 x g por 15 min a 4°C).

Atenção: a partir desta etapa as células nunca devem ser submetidas a trauma mecânico, como por exemplo, forte agitação.

6. Descartar o sobrenadante, (o máximo possível) e ressuspender as células em 10 ml de solução **Tris-Cálcio**.
7. Centrifugar as células a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender delicadamente o sedimento em 1 ml de solução **Tris Cálcio**. Deixar no gelo durante pelo menos 45 minutos. As células , neste ponto , são consideradas “competentes” para transformação com plasmídeo ou com DNA de fago e poderão ser guardadas no gelo por até 24 horas antes de serem utilizadas. Alguns pesquisadores costumam mesmo congelar bactérias competentes, porém a eficiência da transformação pode diminuir bastante.
9. Transferir 100µl de células competentes para um tubo (pré- resfriado a 0°C)
10. Adicionar 1-10 µl de DNA (plasmídio)
OBS: Nesse protocolo adicionar os 6 µl de produto de ligação (passo 7.1)
11. Manter o sistema no gelo por 1 hora.
12. Submeter o sistema a um choque térmico de 37°C por 5 minutos (ou 42°C por 2 minutos)
13. Deixar o sistema a temperatura ambiente
14. Adicionar 0,8 a 1 ml de **meio LB- líquido** e incubar o sistema a 37°C por 1 hora (com fraca ou nenhuma agitação)
15. Plaquear as células transformadas em **meio LB-ágar** contendo o antibiótico (agente seletivo) na concentração desejada.
16. Incubar a 37°C

9. REPIQUE DAS COLÔNIAS POSITIVAS

- 1) No dia seguinte após a incubação das placas, repicar os clones crescidos em placas com 96 poços específicas para crescimento bacteriano (placa estéril com tampa), contendo em cada poço(Well) 150µL de meio LB- líquido com ampicilina (100µg/mL).
- 2) Com palito estéril, transferir cada clone crescendo em placas para cada poço
- 3) Incubar a 37°C durante à noite.

10. AMPLIFICAÇÃO DOS SSR

- 1) Depois de crescidas durante a noite, retirar uma alíquota das células e fazer PCR, usando os primers M13.

11,7 µL de H₂O

3 µL de MgCl₂ (25mM)

2,5 µL de tampão (10X)

2,5 µL de dNTP (2.5mM)

2 µL de cada primer (M13F e M13R)(2,0pmol/ µL)

0,3 µL de taq (5U/µL)

1µL DNA (células)

Programação do termociclador:

35 Ciclos de $\begin{cases} 94^{\circ}\text{C} - 5' \\ 92^{\circ}\text{C} - 1' \\ 50^{\circ}\text{C} - 40'' \\ 72^{\circ}\text{C} - 1':30'' \\ 72^{\circ}\text{C} - 5' \\ 4^{\circ}\text{C} - \infty \end{cases}$

- 2) Purificar o produto amplificado usando kit não milipore (Amersham, promega, qiaquick, etc).

11. SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS PARA DESENHO DOS INICIADORES:

- 1) Usar os primers internos (T3 e T7) para sequenciar os fragmentos através da reação:

2 µL de ET

2 µL de tampão

2 µL de primer

4 µL de DNA

$$35X \begin{cases} 95^{\circ}\text{C} - 20'' \\ 55^{\circ}\text{C} - 15'' \\ 60^{\circ}\text{C} - 1' \\ 4^{\circ}\text{C} \end{cases}$$

12. SOLUÇÕES

TBE (10X)

Tris base – 216 g

Ácido bórico – 110 g

EDTA 0,5M (pH 8,0) – 80 mL

Dissolver em 2 L de H₂O 3D e filtrar

TE (1X)

Tris 10mM

EDTA 0.5 – 0.1mM

TE/NaCl

TE 1M = 990 ul

NaCl 5M = 10 ul

B&W (Binding & Washing Buffer (2X))

Tris-HCl 10mM (pH 7.5)

EDTA 1mM

NaCl 2M

PBS/BSA (Tampão Salino Fosfato 7,4)

250 ml Na₂HPO₄

3,9 gm NaCl

0,1% de BSA

SSC (20X) (Salinium sodium citrate)

(ver em Maniatis ou comprar pronto)

SDS 10%

1 g de SDS

10 mL de água milli-q

Manter à temperatura ambiente

SSC 5X /SDS 0.1%

- 2.5 mL de SSC (20X)

- 100 µl de SDS 10%

- Completar o volume com água milli-Q para 10mL.

SSC 10X /SDS 0.2%

- 5 mL de SSC (20X)

- 200 µl de SDS 10%

- Completar o volume com água Milli-q para 10 mL.

SSC 2X/ SDS 10%

- 1 mL de SSC 20X

- 100 µl de SDS 10%

MEIO LB- sólido P/ 1L

- 10g de NaCl

- 10g de peptona ou triptona

- 5 g de extrato de levedura

-15g de agar

MEIO LB- líquido p/1L

-10g de NaCl

- 10g de peptona ou triptona

- 5 g de extrato de levedura

MEIO SOC p/ 6 mL

- 2% de Tryptona

- 0.5% de extrato de levedura

-10mM NaCl

- 2.5mM KCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM MgSO₄
- 20mM glucose

AMPICILINA

- Solução estoque: 10mg/mL
- Solução de trabalho, (em meio de cultura): 100 µg/mL

TRIS-CÁLCIO

{ CaCl₂ 1M; Tris-HCl 1M pH= 7,5

-1mL de tris-cálcio 1M

-7 mL CaCl₂ 1M

completar para 100mL de água e ferver no microondas