

55. Digestão de DNA com endonucleases de restrição

1. Prepare a reação:

*Reação calculada para um volume final de 20µL e suficiente para digerir até 1µg de DNA.

Reagentes	Quantidades
DNA – [] 0,750µg/µL	1,25µL
Enzima	1µL
Buffer	2µL
Água ultrapura	15,25µL

2. Misture a reação com um vórtex e centrifugue por 20 segundos na velocidade máxima.
3. Incube por 1 hora no banho-maria (ou *heating block*) ou *overnight* na temperatura recomendada.
4. Após a incubação inative a reação pela adição de *loading buffer* (pronto para analisar em gel de agarose) ou então inative a reação à 65°C por 10 minutos (pode ser precipitado por etanol para uso subsequente).

OBS:

- **Volume da reação:** o volume da reação pode variar de acordo com a concentração de DNA a ser digerida e concentração da enzima. Volumes de até 20-40µL podem ser diretamente utilizados em gel de agarose, porém se pode usar volumes maiores.
- **DNA:** a concentração de DNA dependerá da finalidade, porém recomenda-se a utilização variando entre 0,4µg até 4µg.
- **Enzima:** adicione o número de unidades (U) necessário para digerir a quantidade de DNA. Uma U de enzima é a quantidade suficiente e necessária de enzima

capaz de digerir 1µg de DNA durante 1 hora de reação. A enzima é conservada em glicerol e este inibe a reação quando em concentrações superiores de 10%, então nunca adicione mais de 10% do volume total da reação de enzima.

- **Buffer:** cada enzima possui um buffer específico na qual sua atividade é ótima. Normalmente os buffers são providos juntos com as enzimas em uma concentração 10x, desta forma apenas adicione 1:10 do volume da reação do buffer.

- **ddH₂O:** complete o volume final da reação com água destilada e de preferência estéril ou autoclavada.

-**BSA:** algumas enzimas requerem a adição de BSA, recomenda-se a concentração de 100ug/mL. Para facilitar prepare uma solução de 1000µg/mL e apenas adicione 1/10 do volume total da reação.