

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL POR BOILING PLASMID DNA EXTRACTION BY BOILING

Marcelo Alves Ferreira e Charlotte Cesty Borda de Saenz

Centro Universitário Faculdades Metropolitanas Unidas, Trabalho realizado no Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Faculdades Metropolitanas Unidas, Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O presente trabalho tem o intuito de realizar uma extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli* sem contaminantes como RNA, DNA genômico e proteínas. Para isso foi desenvolvido um protocolo de extração de DNA plasmidial utilizando o método de boiling, que utiliza a fervura a 100°C para degradar RNA, proteínas e contaminantes, para assim obter uma amostra mais pura e uma extração mais eficiente, além de utilizar menos reagentes. Foi verificado que a extração por boiling é mais eficiente, pois degradou o RNA contaminante, proteínas e DNA genômico sem afetar os plasmídeos, que se mostraram com um bom rendimento e íntegros. Portanto, esta técnica é mais eficiente tanto pela obtenção dos plasmídeos sem contaminantes quanto pelo custo inferior de reagentes, também reduzindo a contaminação do meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: DNA plasmidial; boiling; extração; *Escherichia coli*; amostras puras.

ABSTRACT

This study aims to perform an extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* without contaminants like RNA, genomic DNA and proteins. For this we have developed a protocol for extraction of plasmid DNA using the method of boiling, which uses the boil at 100 °C to degrade RNA, proteins and contaminants, so as to obtain a sample purest and most efficient extraction, and use less reactants. It was found that the extraction by boiling is more efficient because it had degraded RNA, proteins and genomic DNA without affecting the plasmids, which showed good yield and integrity. Therefore, this technique is much more efficient for obtaining the plasmids as free of contaminants lower the cost of reagents, while also reducing contamination of the environment.

KEY-WORDS: plasmid DNA; boiling; extraction; *Escherichia coli*; pure samples.

INTRODUÇÃO

O DNA plasmidial é comumente utilizado em clonagem gênica e revela interesse para as áreas de pesquisa em bibliotecas genômicas (expressão gênica) e para os laboratórios genéticos e bioquímicos. O processo de clonagem envolve a inserção do gene de interesse no vetor plasmidial.¹ Além do DNA cromossômico, a célula bacteriana contém pequenas moléculas de DNA circular, denominadas plasmídeos. Estes mantêm uma existência independente do cromossomo; no entanto, sua duplicação é sincronizada com a da bactéria, garantindo assim sua transmissão para as bactérias-filhas. Em Engenharia Genética, genes "estranhos" à bactéria podem ser incorporados aos seus plasmídeos e assim, tais bactérias passam a produzir as proteínas que esses genes codificam.²

Certos plasmídeos possuem genes responsáveis pela síntese de enzimas que destroem um antibiótico antes mesmo que ele faça mal a bactéria. Os plasmídeos portadores de genes que conferem resistência a drogas são chamados PLASMÍDEOS R (R Resistência).

No caso da *Escherichia coli* existe um gene chamado lacZ, que é requerido para o transporte e o metabolismo da lactose em *Escherichia coli* e outras bactérias entéricas. Esse gene codificado pelo operon, o lacZ permite a produção da enzima β -galactosidase, que digere a lactose em glicose e galactose. Esse gene também tem a função de produzir uma coloração azul nas colônias. Quando é efetuado um inserto de outro gene, o gene lacZ é interrompido, produzindo colônias brancas, desse modo funcionando como um marcador de seleção, permitindo verificar quais colônias ocorreram o inserto e quais não ocorreram.

No processo de clonagem gênica, a etapa da extração de DNA plasmidial é uma das mais importantes para a confirmação da inserção ou deleção de genes.

Com o intuito de aperfeiçoar essa etapa, foi desenvolvido um protocolo de extração de DNA plasmidial mais pura e eficiente, eliminando proteínas, RNA e demais contaminantes além de utilizar menos reagentes. Esta técnica é

denominada Boiling, em referência ao procedimento de fervura à 100°C. Para a extração de DNA plasmidial foram utilizados o protocolo de Maniatis ⁴ como controle e a técnica de boiling ³ substituindo a solução III do miniprep por 1 minuto de fervura. O DNA plasmidial foi digerido com *Eco* RI e *Hind* III com a técnica de RFLP, para avaliar o polimorfismo.

METODOLOGIA

Foram repicadas colônias de *Escherichia coli* em 5 ml de meio LB + 5 µl de antibiótico e incubadas a 37°C overnight em agitação constante de 200 RPM. Para observar os resultados obtidos da extração foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% por 40 minutos a 90 volts.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No anexo I, a extração por miniprep apresentou RNA contaminante além de ter apresentado pouca quantidade de DNA plasmidial. O anexo I-B evidencia o método de boiling, que desnaturou o RNA contaminante e apresentou um bom rendimento de DNA plasmidial.

No anexo II, foi feita a aplicação da técnica de RFLP com uso da enzima de restrição *Eco* RI na canaleta 1 e da *Hind* III na canaleta 2, evidenciando que de fato ocorreu a desnaturação do RNA. E o anexo II-B mostra o uso do boiling para a extração de DNA plasmidial, evidenciando o bom rendimento de plasmídeos e o RNA degradado.

CONCLUSÃO

O boiling apresentou maior rendimento na extração e seu uso reduziu o custo do método, contribuiu para a degradação de RNA e DNA genômico sem afetar o DNA plasmidial, portanto esse procedimento acelera a obtenção de uma amostra pura, reduzindo contaminantes para o meio ambiente. Não foi necessária a encubação da amostra em gelo para precipitação de sais após o boiling.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valentini SR. **Preparação Plasmidial de Bactéria**. Disponível em: http://www.fcfar.unesp.br/laboratorio_sandro_valentini/pdf/
2. Gomes JV. **Engenharia genética tecnologia do DNA recombinante**. Disponível em: http://www.libertaria.pro.br/tdna_recombinante_intro.htm
3. Zamengo D. **Aperfeiçoamento da técnica de extração plasmidial**, 2012.
4. Maniatis T. **Preparation and transformation of Competent E. coli using Calcium Chloride**. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, Protocol 25 1982; 1

Anexo I

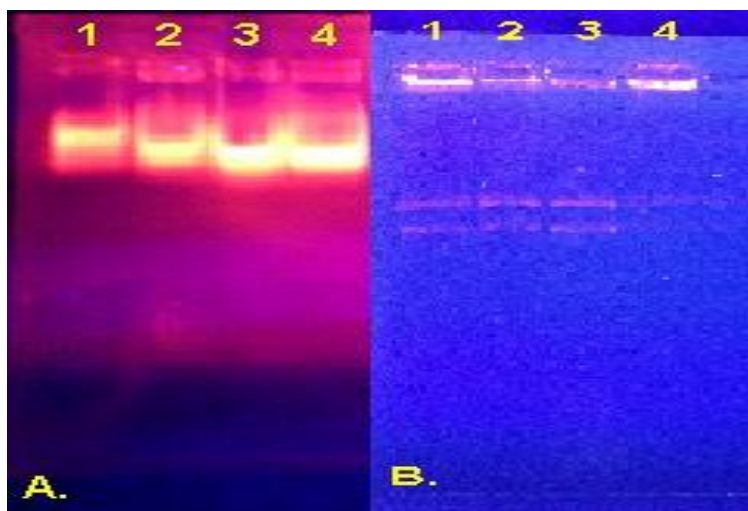


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1%. **A.** Extração de DNA plasmidial por miniprep. **B.** Extração de DNA plasmidial por boiling.

Anexo II

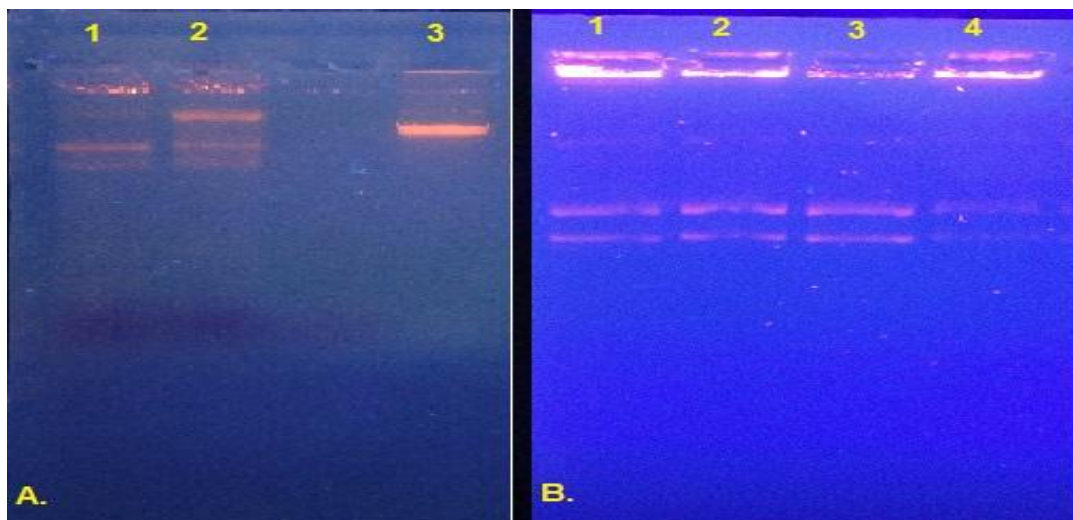


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Extração de DNA plasmidial por boiling. **A.** Canaletas 1 e 2: RFLP da extração de DNA plasmidial da amostra da canaleta 2 da figura B. Canaleta 3: DNA lambda. **B.** Extração de DNA plasmidial por Boiling.