



Clonagem da sequência promotora do gene da protamina para expressão tecido específica

Autor(es): OLIVEIRA, Plinio Aguiar; SANTOS JR, Alceu Gonçalves; MOREIRA, Carla Giovane Ávila; CERQUEIRA, Gustavo Maia; TAVARES, Rafael Aldrighi; ALMEIDA, Diones Bender; COSTA, Marco André Paldes; MOREIRA, Heden Luiz Marques

Apresentador: Plinio Aguiar de Oliveira

Orientador: Heden Luiz Marques Moreira

Revisor 1: Vitor Hugo Borba Manzke

Revisor 2: Bernardo dos Santos Vaz

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Resumo:

O presente trabalho teve como objetivo clonar uma região parcial da protamina no vetor de expressão eucariótico p3xEGFP. Para obtenção da sequência do promotor da protamina de camundongo foram desenhados primers com o programa Vector (Invitrogen, Inc) a partir da sequências depositada no Genbank. Os primers: PMR-MUSF e PMR-MUSR para camundongos foram desenhados contendo sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI para permitir a clonagem no sítio de clonagem múltipla. Os produtos de PCR foram precipitados utilizando uma solução de PEG 29% + NaCl 2M, passado em vortex e deixado em BM a 37 oC por 30 min. Após os tubos foram centrifugados as 13.200 RPM por 30 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescentado 125 µL de etanol 70% gelado. Na sequência o material foi centrifugado por 10 min a 13.200 RPM e o sobrenadante vertido fora. O pellet foi seco em estufa a 55 oC e ressuspendido em 40 µL de tampão TE. Os produtos de PCR purificados foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI (Fermentas, Canada). O vetor p3xEGFP foi multiplicado anteriormente em E.coli e extraído utilizando o Kit GFX Micro Plasmid Prep kit (Amersham Biosciences). Na sequência o vetor foi linearizado utilizando as mesmas enzimas de restrição EcoRI e BamHI para permitir a clonagem deste fragmento na região 5' upstream da sequência da EGFP. A checagem da digestão foi realizada em gel de agarose 1% corado com Gelgreen (Biotin, USA) e visualizada em transluminador de UV. Após a checagem da digestão o plasmídeo foi desfosforilado durante uma hora em BM utilizando 40 do vetor e 1 µL de CIP e 10X tampão da enzima. Após a desfosforilação a enzima foi desnaturada a 65 oC por uma hora. Após a desfosforilação o produto foi purificado novamente. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor p3xEGFP com T4 DNA ligase (Fermentas), gerando o plasmídeo p3xEGFP-PRM. A linhagem bacteriana BL21D3 TOP10F de E. coli foi transformada com o vetor recombinante p3xEGFP-PRM e as colônias positivas foram selecionadas pela resistência a antibiótico kanamicina/neomicina. Os clones positivos foram checados por digestão com enzimas de restrição e amplificação por PCR, com primers específicos para a sequência clonada. Após confirmação os clones foram multiplicados para obtenção dos plasmídios para transfecção.