

6. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Gisele Batista Veneroni

Luciana Correia de Almeida Regitano

As enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, reconhecem uma seqüência específica de bases em uma molécula de DNA, e clivam a molécula naquela seqüência ou próximo dela. A seqüência de reconhecimento é chamada de sítio de restrição. Diferentes enzimas de restrição reconhecem e clivam diferentes sítios de restrição.

Elas são indispensáveis na análise da estrutura dos cromossomos, no seqüenciamento de DNA, no isolamento de genes, na criação de moléculas novas de DNA que podem ser clonadas e em técnicas como RFLP. Uma característica marcante de muitos desses sítios de clivagem é que eles possuem uma dupla simetria rotacional, isto é, a seqüência de reconhecimento é palindrômica e os sítios de clivagem são simetricamente posicionados.

6.1. DIGESTÃO DO DNA – Tiroglobulina

	<i>Emix 1X</i>	<i>Emix X</i>
Água Milli Q	0,5 µL	_____ µL
BUFFER 10X	1,4 µL	_____ µL
<i>Mbol</i> (10 U/µl)	0,1 µL	_____ µL
Total	2 µL	_____ µL

Por reação colocar: 2,0 µl Emix de digestão + 12µl DNA amplificado (produto de PCR). Realizar esta reação em uma placa de PCR ou em microtubos médios, mas sempre sobre o “gelinho”.

A reação de digestão será incubada a 37°C em aparelho Thermomixer 5436 (Eppendorff).

O volume final da reação será de 14 µL, sendo 12 µL de produto de amplificação e 2 µL de Emix de digestão. Este último consiste de 10 mM TrisHCl (pH 8.0); 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM 2-mercaptoetanol; 0,1 mg/mL de BSA e 1 unidade da endonuclease de restrição *MboI* (depende do fabricante). A reação de digestão será incubada a 37°C (depende do fabricante) por 3 horas.

Para análise dos genótipos, os produtos das digestões serão separados em gel de agarose 4% com tampão de eletroforese TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA pH 8,0), submetidos à voltagem de 3 V/cm e, corados com Brometo de Etídeo incorporado no gel. Em cada poço do gel serão aplicados 14 µL do produto de digestão acrescidos de 2,8 µL de *loading buffer* numa proporção de 5:1 respectivamente e, no primeiro poço de cada fileira do gel será aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb também acrescido de *loading buffer* na mesma proporção acima.

Os fragmentos serão detectados sob iluminação UV e registrados por uma câmera fotográfica digital. Os tamanhos dos fragmentos serão estimados por comparação com padrão de tamanho de DNA de 100 pb em cada gel e assim será possível determinar os genótipos de cada animal.

Os “primers” utilizados na PCR amplificam uma região de 545 pares de bases do gene da tireoglobulina, como ilustrado a seguir:

>gi|790|emb|X05380.1| Bovine thyroglobulin gene exon 1 and flanks

AAGCTTCCTGCTGCCTTTTGGTTGTCTGACGTCCTGGGACAGAGGGGAAAGGG
GGATGACTACGAGTATGACTGTGCGTGTGTTTGGCTTATCTCATCAAATCTCTA
 CATTCTGTGTTAATG**GATC**TGCCTGTTTTGTTCCCTGCCATATCCTCATGGCCT
 AGAATAGTGTCTGCTTCTCTATCAGACTCTAAAGAAACATTGCTAGGAGGGGAAG
 GAAGGAGCATGGATGAGGAGGGAGGGAGCATTGTGTTTCTCTCACGGTGGGCC
 TGAACGTGTGGCCCACCAAGTTGTTAACTTTGGCCTTTACCCCTGAAGATGAATT
 ATGAAGCCACACCCCAGTTCTTCCTTGGTGGCTCAGATGGTCAAGAATCCACC
 TGCAATGCGGGAGACCTGGGTTT**GATC**CCTGGGTTGGGA**GATC**CCCTGGA
 GAAGGGAATGGCTACCCACTCCAGTATTCTGGCCTGGAGAATCCCATGGACAG
 AGGAGCCTGGCGGGATGCAGTCCATGGGGTCTCAGAGAGTCAGATGTGACTGA
 GCGACTTTCACACACATTTCGTCCCTGGTTCTGCTCCCCTACAGCCTCCACAAGA
TTTTCAC*CCCACACTGGCCACATGAGTGTCTCCAGGGGAACAGACGCAGGTG
 GAGGACCTCCTTGTGACCAGCAGAGAAAACAGGGTGGGCACTGCTTCCCTGAG
 TGCCTGTGGGTGGGGGCTAAGTACCCACAGCAGTGCTATAAAGGCTCCTTGGC
 CAGAGCCCTAAGGTGGGCAGCAGCTTCTAACCCTTCTCCCTGGAAGGCTCCCA
 AGATGGCCCTGGCCCTATGGGTCTTCGGTCTGCTGGACTTAATCTGCTTGGCAT
 CCGCCAACATCTTTGGTAAGTTCTGACCCTGCGGTCTCAGAGCATCGGGTTGG
 GAGGGACCTCTGAGGCCAACTCCTTGTTAGCCAGGACCTGCCCCAGGGCCATG
 GAACATTTGTGACCTCATTTAATCCTCAGTGTCCCGAGGTCAGTTATGCACTCTT
 TCCTTTTCAGATGAAGAGACAGAGGGTCTGAGAAGTCACAGAGTCAGTGATC

Obs. Os sítios de anelamento dos *primers* estão sublinhados.

Em negrito, podem ser observados os sítios de restrição

