TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR I

01. Nome da disciplina: Técnicas de Biologia Molecular I

02. Departamento: Biotecnologia

03. Responsável: Prof. Fabricio Rochedo Conceição

04. Colaboradores: Dr. Marcelo Mendonça

05. Código da disciplina: 688020

06. Carga horária: 51 horas

07. Créditos: 03 (0 - 0 - 3)

08. Semestre: 1º e 2º

09. Pré-Requisitos: Biologia Molecular

10. Ementa: Uso de enzimas de restrição; eletroforese de DNA em gel de agarose; amplificação de DNA por PCR; clonagem molecular usando vetor plasmideal; preparação de células competentes; transformação de E. coli; seleção e caracterização de clones recombinantes; expressão de proteína recombinante; eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Western blot.

11. Programa Analítico:

Dia 1 Introdução
Digestão de DNA com enzimas de restrição
Eletroforese do DNA em gel de agarose
Elaboração de meio de cultivo
Elaboração da PCR
Inoculação de bactérias em meio líquido

Dia 2 Eletroforese do material amplificado por PCR e das digestões
Ligação do vetor com os insertos
Elaboração de células competentes
Transformação de E. coli com o DNA ligado
Semeadura das bactérias transformadas

Dia 3 Eletroforese do DNA ligado em gel de agarose
Triagem dos clones recombinantes pela técnica de “microprep”
Inoculação de clones recombinantes em meio líquido
Semeadura de BL21 DE3 Star em agar LB

Dia 4 Extração de DNA plasmideal
Eletroforese do DNA extraído em gel de agarose
Análise do DNA extraído com enzimas de restrição
Eletroforese do DNA digerido em gel de agarose
Transformação de Star a partir de colônia (choque térmico) com plasmídeos recombinantes (preparo de pré-inóculo para indução)

Dia 5 Indução da expressão em pequena escala
SDS-PAGE para verificar a expressão das proteínas recombinantes

Dia 6 Western blot
Discussão dos resultados; Avaliação

12. Referências:

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3a Ed.

GREEN, MR, SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1936 p., 4a ed.

LEWIN, B. Genes IX. 2009. Porto Alegre, Artmed, 9a Ed.