|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Bioquímica Industrial | **09/mai/2018** | **Bioquímica Industrial** | **2018** |

**Técnicos: Aline e André**

Número de grupos: 6

**Aula** 8

**Preparação de células competentes de E. coli com CaCl2 e determinação da sua eficiência**

1. **Materiais utilizados**

**Materiais por grupo**

* Micropipetas P1000, P200 e P10
* Ponteiras autoclavadas P1000 (azul), P200 (amarela) e P10 (incolor)
* Bequer de 600 mL com 20 tubos tipo eppendorf de 1,5 mL autoclavados (1) – fechar o bequer com papel e fita crepe.
* Erlenmeyer de 250mL com 60 mL de meio LB-ágar autoclavado (1)
* Erlenmeyer de 125mL com 20 mL de meio LB-ágar autoclavado (1)
* Estante para microtubos (1)
* Erlenmeyer de 125mL com 40 mL de solução de CaCl2 100 mM autoclavado(1)
* Estante para tubo falcon de 50 mL
* Tubo falcon de 50 mL autoclavado (3)
* Microtubo contendo 2 mL de meio SOC (2)
* Microtubo contendo 1 mL de CaCl2 100 mM e glicerol 10 % (1)
* Tubo de centrífuga com tampa e autoclavado para rotor Sorvall SS-34 (1)
* Álcool 70%
* Bico de Bünsen (1)
* Fósforo (1)
* Papel higiênico (1)

**Materiais de uso geral:**

* Balança analítica
* Balança semi-analítica
* Espectrofotômetro
* Centrífuga refrigerada para tubos de 40 mL e microtubos
* Banho de água

**Reagentes**

* Extrato de levedura
* Triptona
* Cloreto de sódio
* Cloreto de potássio
* Cloreto de magnésio
* Ampicilina
* Cloreto de cálcio
* Glicerol
* Etanol PA
* Solução de HCl para acertar pH
* Solução de NaOH para acertar pH
* Etanol comercial
* Água sanitária

**Preparo da Aula**

**Preparar com antecedência**

* Meio de cultura LB líquido preparar 1000 mL
* Para cada grupo: colocar 40 mL de meio LB líquido em erlen de 250 mL e autoclavar (total de 7 grupos).
* Para cada grupo: separar 5 mL de LB líquido em tubo de ensaio, fechar com algodão e papel alumínio e autoclavar
* Para cada grupo: separar 60 mL de LB em erlen de 250 mL, 20 mL em erlen de 125 mL e adicionar em cada um, ágar a uma concentração final de 2 % (meio LB sólido).
* Autoclavar ponteiras e meio de cultura um dia antes da aula
* Inocular um dia antes da aula, o pré-inóculo com 5mL de LB líquido de E. coli DH5α (uma colônia retirada de uma placa fresca ou 1 L a partir de um estoque congelado).
* Quatro horas antes da aula, inocular 0,4 mL do pré-inóculo em 40 mL de meio LB líquido em erlenmeyer de 250 mL (o cultivo da E. coli deverá estar com absorbância de aproximadamente 0,05 em 600 nm, o que equivale a uma diluição do pre-cultivo de 1:100). Incubar a 37 °C com agitação de 180 rpm até atingir a DO 0,6 em 600nm.
* Colocar o cultivo no gelo por 20 min.

**Meio de cultura LB**

Para 1 L:

* 5 g de extrato de levedura
* 10 g de Triptona
* 10 g de NaCl

Acertar o pH em 7,0 com HCl ou Na OH.

**Solução de cloreto de cálcio 100 mM**

* Preparar 300 mL e separar 7 alíquotas de 40 mL em erlenmeyers de 125 mL e esterilizar em autoclave.
* No restante da solução de cloreto de cálcio, adicionar glicerol para uma concentração final de 10 % (o estoque de glicerol deve estar entre 100 e 80 % para diluir o mínimo possível a concentração inicial de 100 mM de cloreto de cálcio). Esta solução de cloreto de cálcio com 10 % em glicerol deve ser colocada em um erlenmeyer de 125 mL e esterilizada em autoclave. Após esterilização, separar em alíquotas de 1 mL em microtubos estéreis de 2,0 mL (as alíquotas que não serão utilizadas na aula poderão ser congeladas e estocadas em freezer a -20 °C).

**Meio SOC**

Para 1 L:

* 5 g de extrato de levedura
* 10 g de Triptona
* 10 g de NaCl
* 0,186 g de KCl
* Acertar o pH em 7,0 com Na OH
* No momento do uso adicionar 5 mL de uma solução esterilizada de MgCl2 2 M e 20 mL de uma solução estéril de glicose 1 M.

O meio após preparado pode ser aliquotado em porções de 2 mL e congelados a -20 °C para uso posterior.

Todos os meios de cultura e soluções esterilizados e não utilizados no mesmo dia, deverão ser estocados em geladeira para uso posterior.

1. **Procedimento experimental**

**Preparo de células competentes**

**TÉCNICOS E MONITORES**

2.1 - Utilizar uma cultura fresca de célula de E. coli DH5 em placa de LB a 37ºC ou um estoque congelado armazenado a -80 °C.

2.2 - Iniciar a pré-cultura no dia anterior ao preparo da célula competente, partindo de uma colônia isolada de uma cultura fresca em placa com meio LB sólido ou diretamente de um estoque congelado a -80 °C. Fazer um pré-inóculo de E. coli DH5α em 5mL de LB líquido, partindo de uma colônia retirada de uma placa fresca ou 1 L a partir de um estoque congelado a -80 °C.

2.3 - De um erlem com 40 mL de LB Líquido, retirar 2 mL do meio de cultura e guardar em microtubo de 2 mL para servir como branco nas leituras no espectrofotômetro. Inocular 10 % (V/V) do pré-inóculo em 38 mL de LB líquido restante. Este inóculo inicial deverá apresentar absorbância de aproximadamente 0,05 em 600 nm. Incubar o inóculo a 37 ° C e 220rpm até obter absorbância 0,6 em 600nm. Realizar medidas retirando 1 mL da cultura no tempo 1 h e 2 h. Em seguida deve-se estimar o tempo necessário para a realização das demais medidas até obter DO de 0,6. Em média a DO duplica a cada 20 min.

2.4 – Durante este período colocar as soluções de cloreto de magnésio 100 mM, cloreto de cálcio 100 mM e glicerol 10% no gelo. Colocar também no gelo todos os frascos que serão utilizados durante as centrifugações e os microtubos, já identificados, onde serão guardadas as alíquotas das células competentes. Ligar a centrífuga refrigerada a 4 °C para a refrigeração do rotor.

**ALUNOS: COMEÇAR A AULA PRÁTICA AQUI**

2.5 – Obtendo-se a DO600nm em torno de 0,6, transferir a cultura de E. coli para um tubo de centrífuga do rotor Sorvall SS-34. Deixar este tubo no gelo até que todos os grupos tenham realizado este procedimento. Em seguida, centrifugar a 4 °C por 6 min a 3.500 rpm. (ATENÇÃO, a partir desta etapa as células devem ser mantidas em gelo o tempo todo).

2.6 – Em ambiente estéril, eliminar o sobrenadante vertendo o tubo suavemente, com muito cuidado para não perder o precipitado de células (pellet).

2.7 - **Ressuspender suavemente** o precipitado de células em 40 mL de MgCl2 100 mM, previamente resfriado em gelo (ATENÇÃO, a cultura deve ser mantida em gelo o tempo todo).

2.8 - Centrifugar a 4 °C por 6 min a 3.500 rpm.

2.9 - Em ambiente estéril, eliminar o sobrenadante vertendo o tubo suavemente, com muito cuidado para não perder o precipitado de células (pellet).

2.10 - **Ressuspender suavemente** o precipitado de células em 40 mL de CaCl2 100 mM, previamente resfriado em gelo (ATENÇÃO, a cultura deve ser mantida em gelo o tempo todo).

2.11 - Centrifugar a 4 °C por 6 min a 3.500 rpm.

2.12 - Em ambiente estéril, eliminar o sobrenadante vertendo o tubo suavemente, com muito cuidado para não perder o precipitado de células (pellet).

2.13 – **Ressuspender suavemente** o precipitado de células em 1,5 mL de CaCl2 100mM previamente resfriado em gelo e deixar em repouso no gelo por 40 min.

SALA DE AULA

2.14 – Adicionar 375 L de glicerol 80% previamente resfriado em gelo e homogeneizar suavemente com pipeta automática.

2.15 – Guardar 10 frações de 100 L em microtubos de 1,5 mL previamente resfriados em gelo. O restante poderá ser descartado.

2.16 - Separar duas alíquotas das células para transformação e quantificação da sua eficiência. As demais serão levadas para congelamento e estocagem a -80ºC para uso posterior.

**Determinação da eficiência de transformação das células competentes**

2.17 - 2 microtubos (item 2.16) serão usados para quantificar a eficiência de transformação das células competentes de E. coli DH5. Marcar um deles que será utilizado como controle.

2.18 - Misturar 20 ng do plasmídeo (2 L) – pUC19 de concentração 10 ng /L (DNA que será inserido no meio intracelular) com 100 L de E. coli DH5 competente, mantida em gelo. Incubar 10 min. no gelo. No tubo marcado como controle, adicionar 2 L de água estéril.

2.19 – Choque Térmico “Heat shock” – incubar as células por 90s **(EXATOS!!)** a 42°C e colocar no gelo imediatamente por 1 minuto. Adicionar 900 L de meio SOC a temperatura ambiente.

2.20 - Incubar de 45 a 60 minutos a 37°C e 200 rpm, para regeneração das células.

2.21 - Montar 04 placas de Petri **(Técnicos).** Três placas serão preparadas, respectivamente, com a mistura de 20 mL de meio LB-agar mais 20 L de ampicilina 100 mg/mL. Adicionar a mistura nas placas (20 mL em cada) e deixar solidificar com a tampa parcialmente aberta para evitar a condensação de água (cerca 15 minutos). Uma única placa deverá ser preparada somente com meio LB-ágar sem antibiótico.

2.22 – Com o auxílio de micro esferas de vidro, inocular e 50 e 100 L da transformação com o PUC-19 em placas distintas com antibiótico. Do tubo contendo a transformação controle, plaquear 100 Lem uma placa com antibiótico (controle negativo das células) e outros 100 L na placa sem antibiótico (controle positivo das células). **ATENÇÃO, as placas devem ser identificadas corretamente quanto ao meio de cultura, a presença ou não de antibiótico (LB+Amp ou LB) e quanto ao que foi inoculado com a sua respectiva quantidade (XXL DH5 + PUC-19 ou XXL DH5 + água)**.

2.20 – Após inóculo, descartar as micro esferas de vidro em recipiente apropriado, aguardar cerca de 3 minutos para o meio absorver a fase líquida inoculada e incubar a 37°C por 12 horas com a tampa da placa voltada para baixo.

2.21 – No dia seguinte contar as colônias e realizar o cálculo da eficiência de transformação das células competentes. Verificar o resultado obtido nas placas inoculadas com o controle.

**Questões para o relatório**

1. Calcule a eficiência da transformação, sabendo que eficiência é o número de células transformadas por micrograma de DNA.
2. Quais são outros métodos para obter células competentes e seus fundamentos?
3. Por que se usa uma etapa de “Heat shock” na transformação?
4. Por que se faz um controle da *E. coli* em placa com e sem ampicilina? Qual o resultado esperado?