

# ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

## BIOLOGIA MOLECULAR I - 09 E 16 DE NOVEMBRO DE 2022

### Transformação bacteriana e Extração de DNA plasmidial bacteriano

#### Introdução

Plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômico, circulares e que apresentam replicação independente do cromossomo bacteriano. Estas moléculas, embora não sejam vitais para a célula bacteriana hospedeira, em *habitats* naturais, podem conferir vantagem adaptativa em condições específicas. Estas vantagens podem ser resistência a antibióticos e a metais pesados, produção de enzimas de vias metabólicas específicas, incluindo produção ou catabolismo de moléculas orgânicas complexas.

Estes plasmídeos podem apresentar a capacidade de se transferir para outros hospedeiros que poderão ser de genótipos ou espécies diferentes. Este processo de transferência é denominado conjugação, e é dependente do produto do gene *mob*, que corta o DNA a ser transferido na origem de transferência (*oriT*). Na replicação autônoma dos plasmídeos, é essencial uma origem de replicação (*ori*) juntamente com outros elementos de controle.

#### Resistência a antibióticos.

Genes de resistência a antibióticos são as marcas seletivas mais usadas em plasmídeos bacterianos, pois permitem selecionar células portadoras do plasmídeo de interesse mediante a adição de antibiótico ao meio de cultura, visto que células sem o plasmídeo são sensíveis ao antibiótico. Por exemplo, plasmídeos contendo o gene que codifica uma enzima  $\beta$ -lactamase apresentarão resistência a um  $\beta$ -lactâmico como a ampicilina (penicilinas- atuam na formação da parede bacteriana) e, portanto, permitirão que a bactéria portadora cresça em meio de cultura contendo este antibiótico. No caso do plasmídeo (pBC) a ser empregado nesta aula, ele carrega o gene para resistência a cloranfenicol (atua nos ribossomos inibindo síntese proteica), pois codifica a enzima CAT (cloranfenicol acetil transferase), que acetila o antibiótico, inativando sua ligação aos ribossomos.

#### Aula 1-

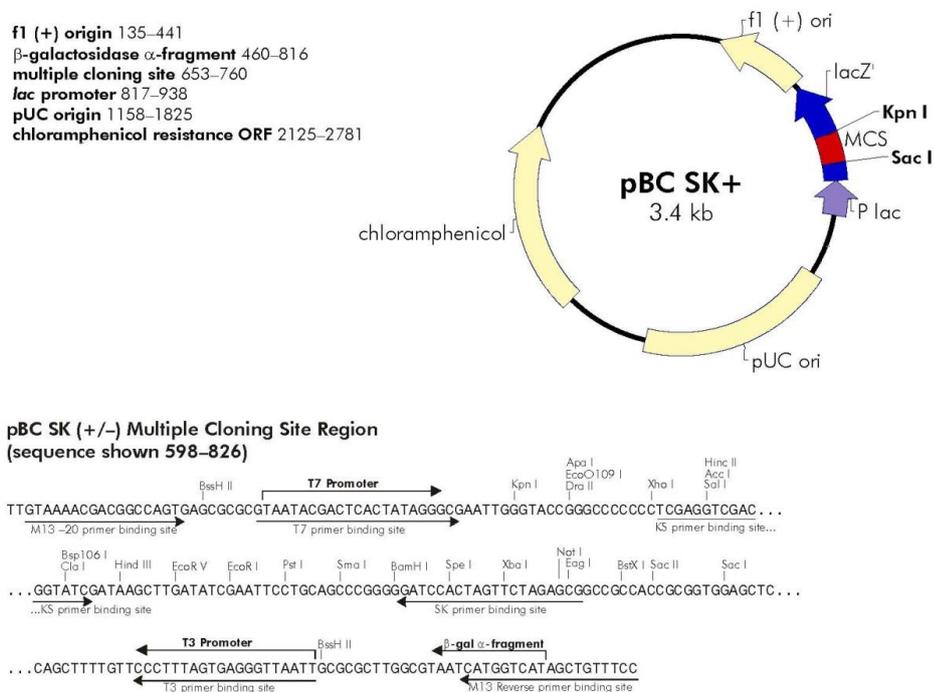
#### Transformação bacteriana

A introdução de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em células é conhecido como transformação ou transfecção. Em bactérias ocorre a internalização do DNA que pode integrar no genoma celular, ou, no caso dos plasmídeos, se manter de forma episomal (ou extra cromossômico) citoplasma das células. Esse é um

processo que ocorre naturalmente para muitas bactérias (e mesmos procariontes em geral), que assim podem adquirir novos genes que poderão auxiliá-las a ganhar capacidade adaptativa em determinados locais.

No caso desse experimento, serão empregadas células de *Escherichia coli*, cujo processo de transformação requer que as células sejam inicialmente preparadas com tratamentos específicos para permeabilização da membrana e da parede celular. Nesse caso, a transformação bacteriana pode ser realizada por dois métodos principais: **choque térmico** ou **eletroporação**. A transformação por choque térmico, método comumente chamado de transformação com cloreto de cálcio, é um método fácil e relativamente barato de transformação. Consiste na preparação das células, para torná-las **competentes**, por tratamento com cloreto de cálcio ou outro íon divalente (cloreto de lítio ou magnésio). O verdadeiro mecanismo molecular envolvido na entrada de material genético nas bactérias é ainda desconhecido. No entanto, acredita-se que os íons neutralizam as cargas negativas da membrana bacteriana e do DNA diminuindo a repulsão entre eles. Após um choque térmico na temperatura de 37° a 42°C, são gerados poros na membrana e o DNA pode alcançar o interior da célula. Na eletroporação as bactérias são submetidas a um choque elétrico breve que induz o aparecimento de poros na membrana bacteriana, possibilitando o ingresso do DNA plasmidial.

Após a transformação as bactérias devem ser plaqueadas em placas de petri contendo meio nutritivo LB em ágar, em condições de seleção apropriadas (presença de antibiótico, no caso cloranfenicol). Posteriormente podem ser crescidas e congeladas para uso posterior.



**Figura 1**– Esquema do vetor pBC SK com suas principais características. Em detalhe aparece a sequência do sítio de clonagem com os sítios para as diferentes endonucleases de restrição.

## Experimento 1

### Transformação do Plasmídeo em bactérias.

Será fornecido a cada grupo uma amostra de solução de plasmídeo com concentração conhecida (verificar concentração no tubo), que será utilizada para transformar bactérias por choque térmico. Cada grupo também receberá também dois tubos com as bactérias competentes para transformação, além de placas de *petri* com meio para plaqueamento das bactérias.

### Protocolo de transformação

- a) Descongelar as bactérias em um tubo *Eppendorf*, na temperatura ambiente.
- b) Cada tubo tem 50  $\mu\text{L}$  de bactérias competentes.
- c) Colocar 5  $\mu\text{L}$  de DNA no tubo correspondente. O outro tubo servirá de controle, onde não será adicionado DNA plasmidial.
- d) Incubar em gelo por 30 minutos.
- e) Transferir rapidamente para banho um a  $42^{\circ}\text{C}$  e incubar 2 minutos (cronometrados!).
- f) Incubar em gelo por 1 minuto
- g) Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de meio líquido LB e manter sob agitação por 1 hora.
- h) Semear 100  $\mu\text{L}$  de cada transformação em uma placa de LB+Cloranfenicol. Usando as perolas de vido para distribuir o inóculo de forma homogenia.
- i) Incubar a placa de bactérias em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

## Aula 2

### Extração de DNA plasmidial e análise em eletroforese em gel de agarose.

Para extração do DNA plasmidial, a célula deverá ser lisada e o plasmídeo purificado a partir da solução contendo restos da parede celular, da membrana e de outros componentes celulares. Normalmente, a lise da célula é feita por meio de um tratamento em meio básico (lise alcalina), onde é adicionado o detergente SDS que desnatura as proteínas e dissolve os lipídios, e NaOH que desnatura todo o DNA (cromossômico e plasmidial). Por neutralização com acetato de potássio, o DNA plasmidial (cccDNA: “covalently closed

circular DNA”) renatura rapidamente, pois as duas cadeias não se separaram completamente devido aos super-enovelamentos, fato este que não ocorre com o DNA genômico que é formado com cadeias longas. Assim, o DNA genômico é precipitado juntamente com as proteínas e o restante dos componentes celulares, enquanto que os plasmídeos renaturados permanecem em solução.

O DNA plasmidial pode ser analisado através de vários métodos, para se verificar sua integridade. O método mais comum é realizar uma migração eletroforética das amostras. Nesse caso, as amostras são aplicadas no gel horizontal, ao qual é aplicada uma corrente elétrica. As moléculas de DNA migram para o polo positivo, devido a sua carga negativa (dada pelos agrupamentos fosfato). Como o plasmídeo é circular, ele apresenta um formato super-enovelado (forma I), que, por estar mais compactado, permite uma migração mais rápida do que o plasmídeo circular contendo pelo menos uma quebra (circular relaxado- forma II). No gel, a presença de intercalantes fluorescentes (como o brometo de etídeo) permite a visualização das moléculas de DNA em um equipamento conhecido como transiluminador de luz ultravioleta.

## **Experimento 2**

(na véspera)

### **Análise da placa e inóculo para extração DNA Plasmidial**

#### **Preparo do Inóculo**

- a) Cada grupo receberá suas placas de Petri contendo as colônias resultantes da transformação.
- b) Contar as colônias e determinar a eficiência de transfecção (número de colônias viáveis/  $\mu\text{g}$  de DNA).
- c) Utilizando um palito esterilizado, coletar uma colônia bacteriana isolada e inoculá-la em 3 ml de meio de cultura LB contendo cloranfenicol ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- d) Após inoculação, a suspensão de células deverá ser incubada por 18 -24 horas a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante ( $\sim 200 \text{ rpm}$ ).

## Experimento 3

### Extração de DNA plasmidial - Lise Alcalina em pequena escala (MiniPrep)

- a) Transferir 1,5 mL da cultura bacteriana para um microtubo e centrifugar a 12000 x g, por 30 segundos.
- b) Remover o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta, deixando o precipitado de células com a menor quantidade possível de meio de cultura.
- c) Ressuspender o sedimento com 100 µL de solução I. Agitar bem em vortex para completa dispersão das células.
- d) Adicionar 200 µL de solução II e misturar 5 vezes por inversão rápida do microtubo (não usar o vortex), certificando se que todas as células tenham entrado em contato com a solução.
- e) Colocar os tubos no gelo.
- f) Adicionar 150 µL de solução III. Misturar mantendo o microtubo invertido e agitando lentamente com movimentos circulares por aproximadamente 10 seg.
- g) Centrifugar a 12000 x g, por 5 min e **transferir o sobrenadante** para um novo microtubo.
- h) Adicionar 2 volumes de etanol absoluto, misturar no vortex e incubar por 2 minutos à temperatura ambiente para precipitar o DNA.
- i) Em seguida centrifugar a 12000 x g, por 5 minutos.
- j) Remover cuidadosamente o sobrenadante por inversão e manter o tubo em posição invertida sobre papel absorvente. Remover gotas de sobrenadante que tenham ficado aderidas às paredes do microtubo.
- k) Lavar o DNA precipitado (o qual não é visualizado) com 1 mL de etanol 70%.
- l) Centrifugar a 12000 x g, por 2 minutos.
- m) Remover cuidadosamente o álcool por inversão e manter o tubo em posição invertida sobre papel absorvente.
- n) Deixar o DNA secar ao ar durante por aproximadamente 10 minutos.
- o) Dissolver o DNA em 50 µL de tampão TE ou água ultra-pura esterilizada, misturando brevemente em vortex. Avaliar a qualidade do DNA por meio de eletroforese em agarose.

## Experimento 4

### Eletroforese em gel de agarose (0,8%)

**Os géis de agarose previamente acrescidos de corante já serão levados prontos para esta aula**

#### Aplicação das amostras

- a) Pipetar 5 µL da amostra de DNA plasmidial e adicionar aos tubos 2 µL contendo tampão de amostra para eletroforese. Homogeneizar com a pipeta.
- b) Com auxílio da micropipeta, aplicar toda a amostra nos poços do gel de agarose.
- c) Utilizar os poços das extremidades para aplicação do padrão de corrida.
- d) Ajustar a voltagem de acordo com o tempo de corrida desejado (média utilizada 100V) e acompanhar a migração das amostras no gel de agarose.
- e) Analisar o gel sob radiação ultravioleta e tirar foto dos resultados obtidos.

## **Materiais**

### **Extração de DNA plasmidial:**

•Solução I:

Glicose 50 mM;  
Tris. HCl 25 mM, pH8,0;  
EDTA 10 mM, pH8,0.

•Solução II:

NaOH 0,2 N (diluído previamente de uma solução estoque a 10N);  
SDS 1%.

•Solução III:

Acetato de potássio 5 M, 60 ml;  
Ácido acético glacial, 11,5 ml;  
H<sub>2</sub>O (ultra-pura), 28,5 ml.

## **Referências**

Sambrook J, MacCallum P, Russel D. 2000. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

## **Questões para Relatório**

- 1) Que resultado seu grupo obteve após a transformação? Qual a eficiência de transfeção? (expressar sua resposta em termos de número de colônias viáveis por µg de DNA).
- 2) Qual é a função de cada uma das soluções (I, II e III) durante a extração de DNA plasmidial?
- 3) Porque é necessário realizar a precipitação do DNA com etanol durante o procedimento de miniprep?
- 4) Após a observação do resultado da extração de DNA plasmidial no gel, identificar a migração do DNA na forma I e forma II?
- 5) Após a visualização no gel, o que mais pode ser observado além de DNA plasmidial?