

**Aula prática**  
**Transformação de Bactéria**  
**Extração de DNA plasmidial**

# Extração plasmidial

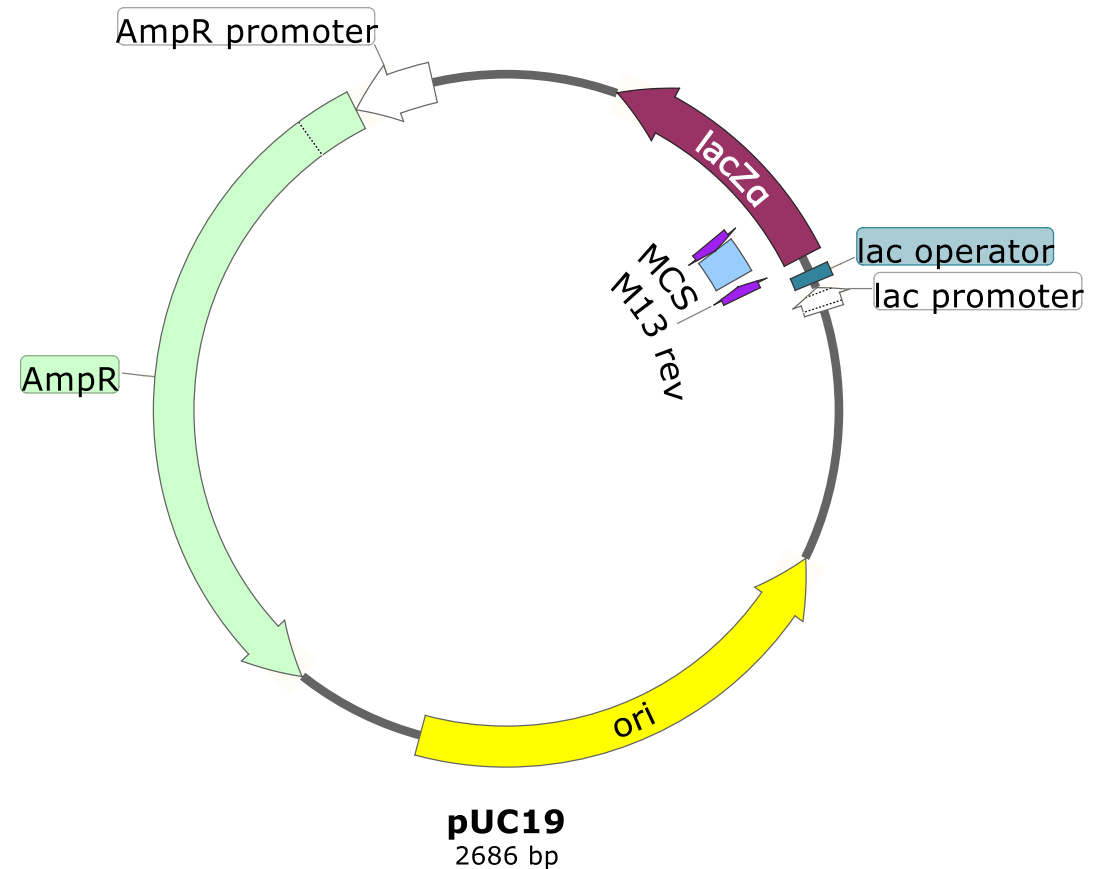
- O que é um plasmídio?
- Para que serve um plasmídio
- Protocolo da extração

# O que é um plasmídio?

- DNA extracromossomal circular
- Confere algum tipo de vantagem a bactéria
- Existem naturalmente com diversas funções:
  - Fertilidade (conjugação)
  - Resistencia (resistência a antibióticos)
  - Tipo Col – produzem bacteriocinas – matam outras bactérias
  - Degradativo – degradar substâncias ambientais tóxicas
  - Virulência – tornar bactéria patogênica
  - Epissomo – pode se inserir ao DNA cromossomal

# Plasmídios usados em biomol

- Normalmente pequeno (até 10kb)
- Possui dois componentes básico:
  - Origem de replicação
  - Marca de resistência



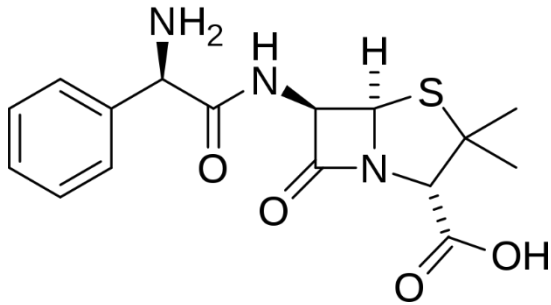
# Origem de replicação

Table 1 Replicons most commonly used in plasmids

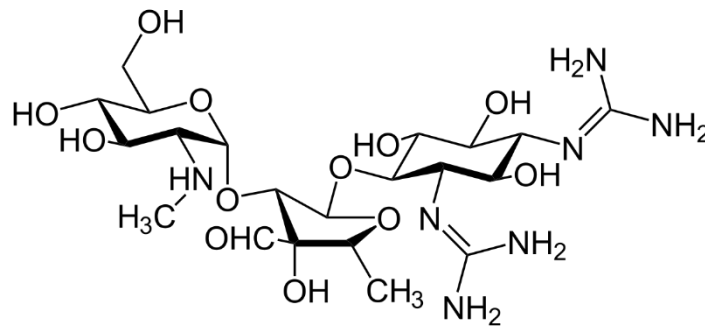
Replicons	Related vectors	Copy number	Capacity	Host
pMB1/ColeI	pBR322 and derivatives	15–20	Up to, at least, 15 kb	<i>E. coli</i>
Mutated pMB1	pUC vectors	500–700	Up to, at least, 15 kb	<i>E. coli</i>
p15A	pACYC184	18–22	Up to, at least, 10 kb	<i>E. coli</i>
pSC101	pSC101	Approximately 5	Up to, at least, 16 kb	<i>E. coli</i>
IncP	RK2	4–40 (adjustable by mutations)	Up to, at least, 60 kbp	Broad host range
IncQ	RSF1010	12	Up to, at least, 14 kbp	Broad host range
R6K	R6K and its derivatives	15–30	Up to, at least, 38 kbp	<i>E. coli</i>
F factor	F plasmid and its derivatives (i.e., bacterial artificial chromosomes [BACs])	1	Often up to 350 kb	<i>E. coli</i>

# Marca de resistência

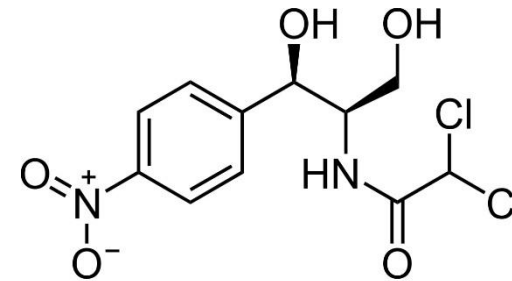
Nome	Classe	Modo de ação
<b>Ampicilina</b>	Betalactâmico	Inibe síntese de parede
<b>Canamicina</b>	Aminoglicosídeo	Liga na subunidade ribossomal 30S – Mis-translation
<b>Cloranfenicol</b>		Liga na unidade ribossomal 50S – inibe translocação
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclina	Liga na subunidade ribossomal 30S – Inibe síntese de proteína (elongação)
Espectinomicina	Aminoglicosídeo	Liga na subunidade ribossomal 30S – Inibe síntese de proteína
Estreptomicina	Aminoglicosídeo	Inibe iniciação da tradução
Carbenicilina	Betalactâmico	Inibe síntese de parede
Bleomicinaa	Glicopeptideo	Induz quebra de DNA
Eritromicina	Macrolideo	Liga na unidade ribossomal 50S ; inibe translocação
Polimixina B	Polipeptídeo	Altera permeabilidade da membrana



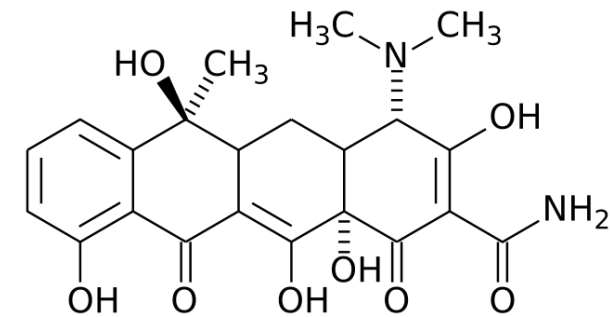
**Ampicilina**



**Canamicina**



**Cloranfenicol**



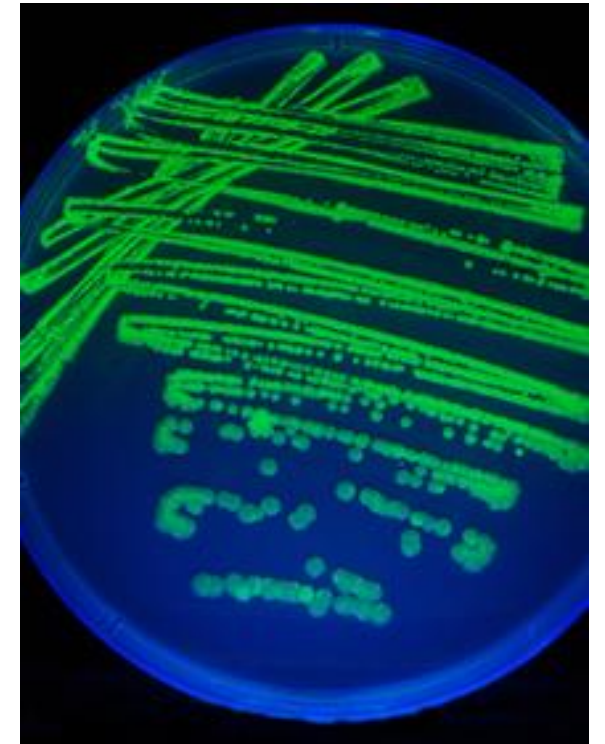
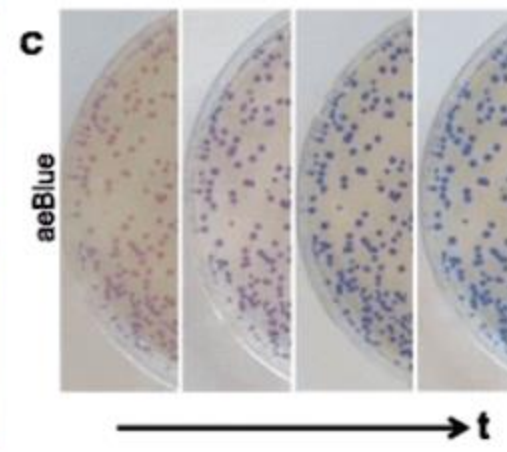
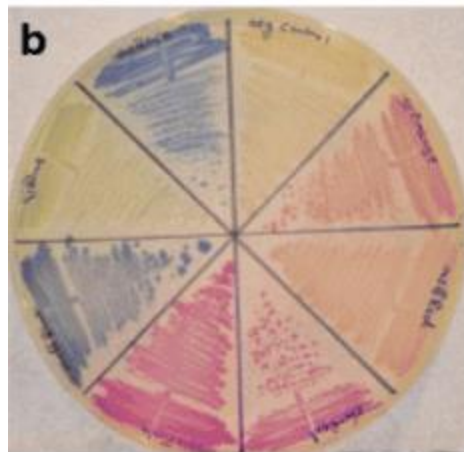
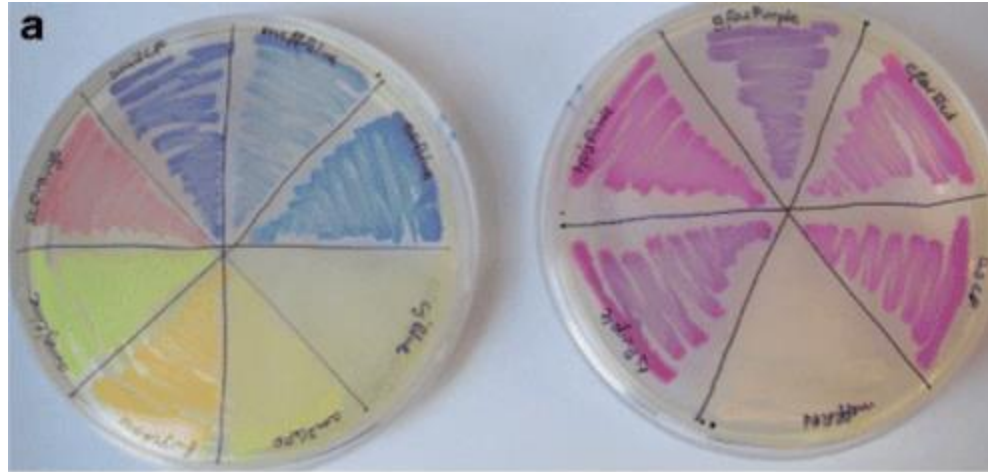
**Tetraciclina**

**Pra que usamos plasmídios?**

# Pra que usamos plasmídios?

Expressar proteínas

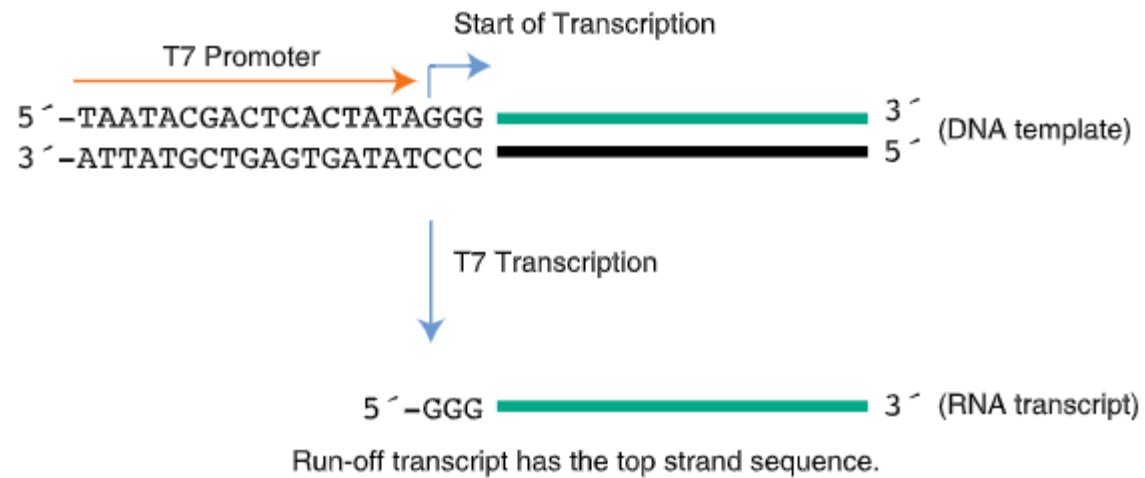
- Insulina
- GH
- Celulase
- Protease
- Lipases





# Pra que usamos plasmídios?

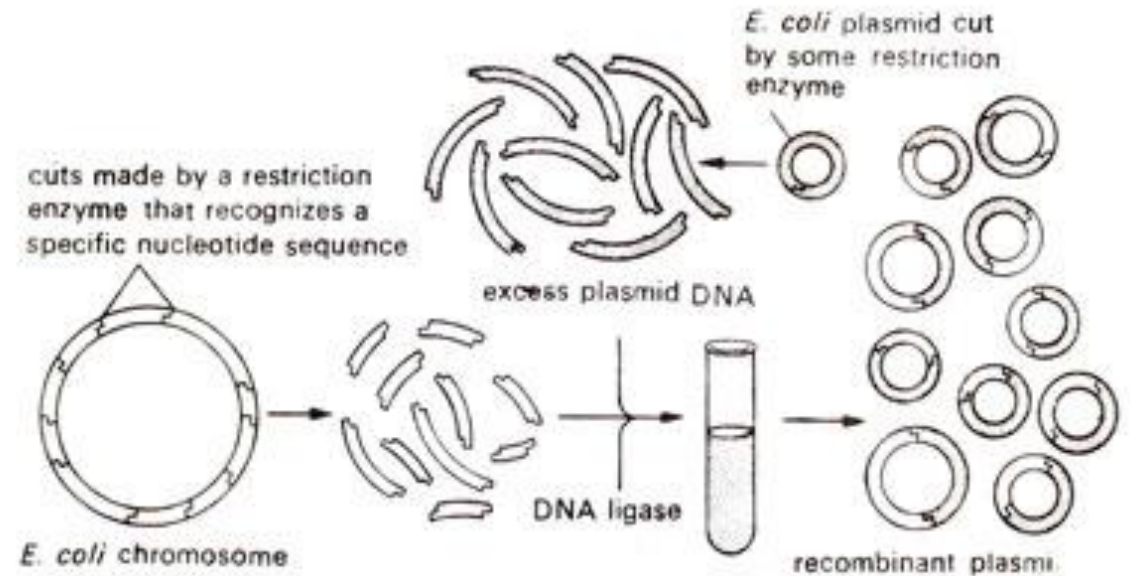
Figure 1. Transcription by T7 RNA Polymerase



- Produzir RNA in vitro

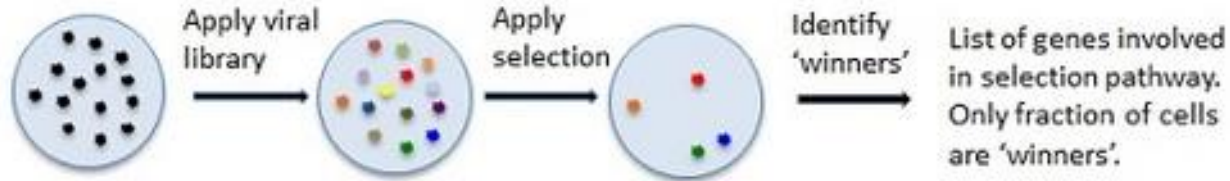
# Pra que usamos plasmídios?

- Bibliotecas de gDNA
- Sequenciar genomas inteiros (antigamente)
- Ex: Haemophilus influenzae
- Genoma: 1.830.138bp
- 19,687 plasmídios sequenciados por Sanger
- 14 sequenciadores por 3 meses



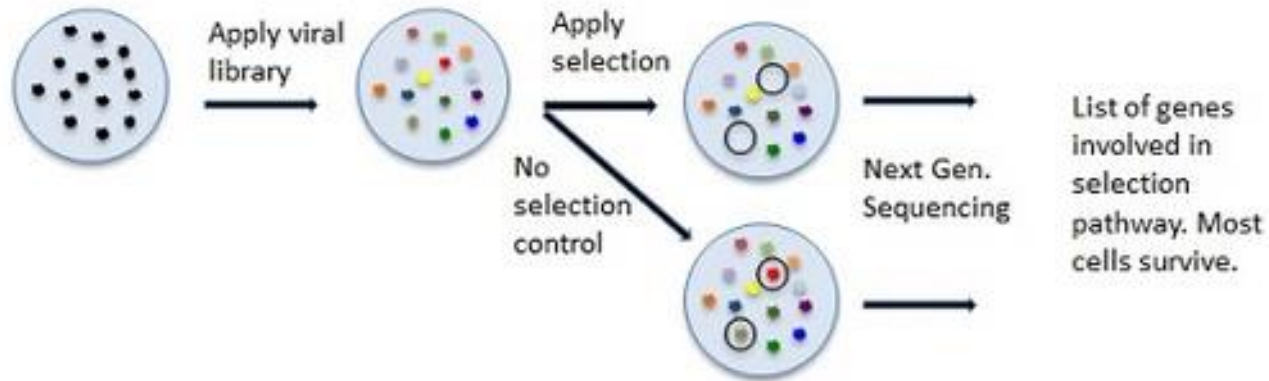
# Pra que usamos plasmídios?

## Positive screen



The use of appropriate controls (positive and negative) is the responsibility of the researcher. **This is a simplified overview ONLY.**

## Negative screen

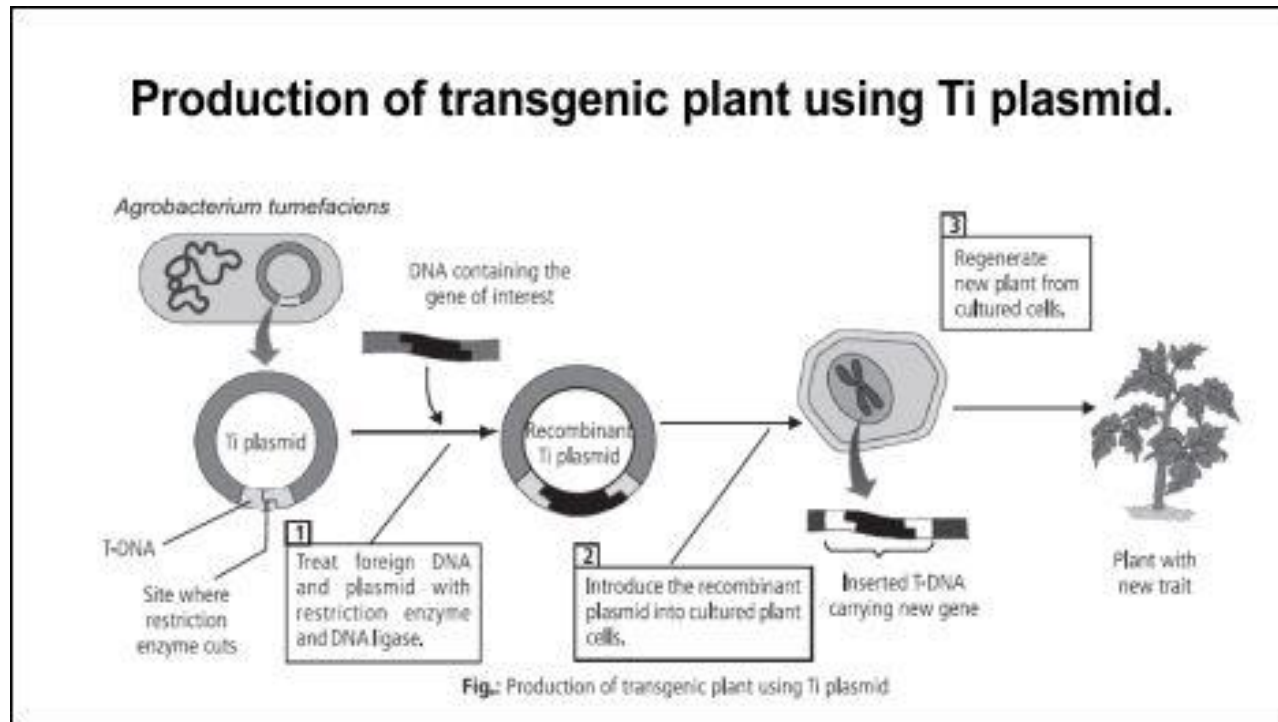


## Bibliotecas de DNA

Estudar genes por fenótipo

# Pra que usamos plasmídios?

- Modificar organismos



Plantas

a.



b.



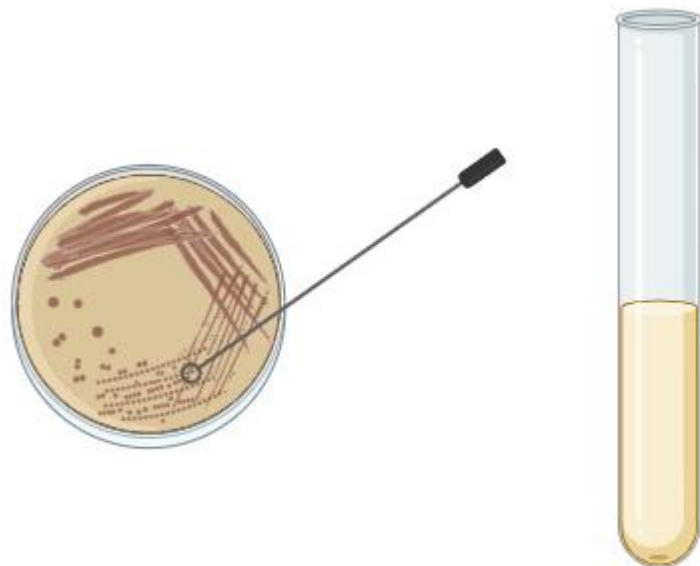
Animais

# **Extração - Protocolo**

# Protocolo

Etapas já realizadas  
pelas técnicas do  
LBBM

- Crescer célula (já foi feito pelas técnicas)
  - Overnight
  - Com antibiótico

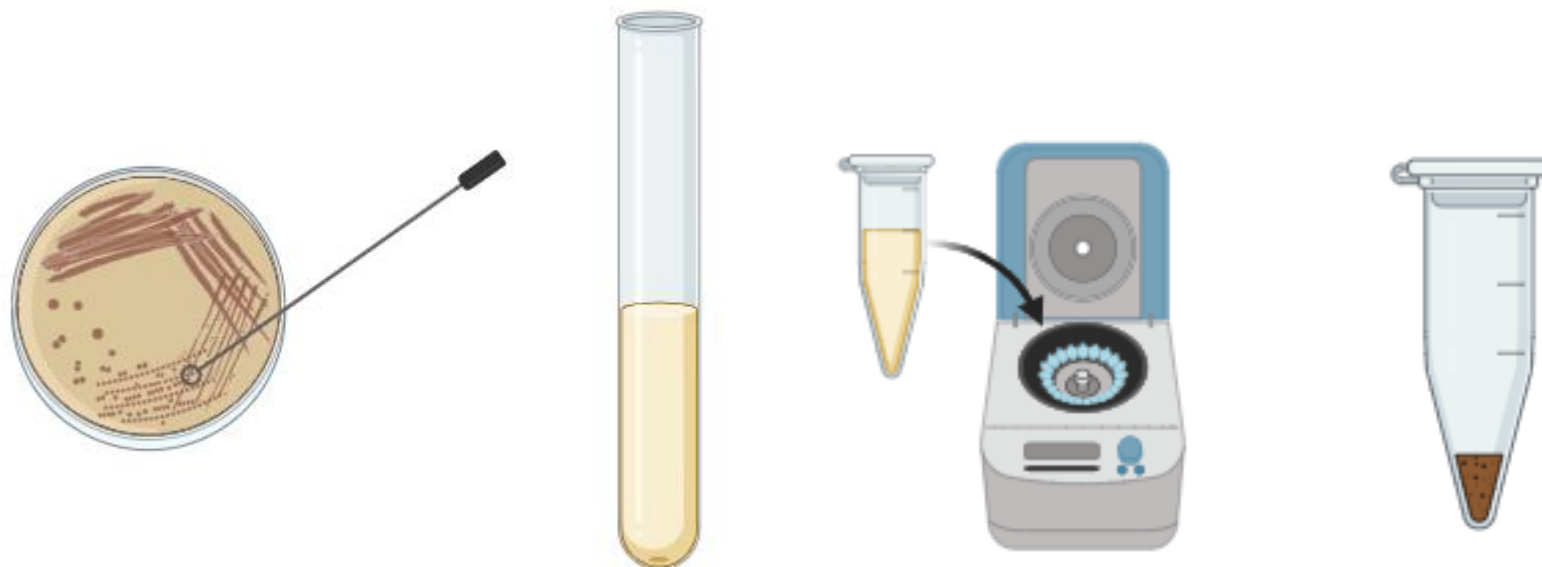


# Protocolo

Etapas já realizadas  
pelas técnicas do  
LBBM

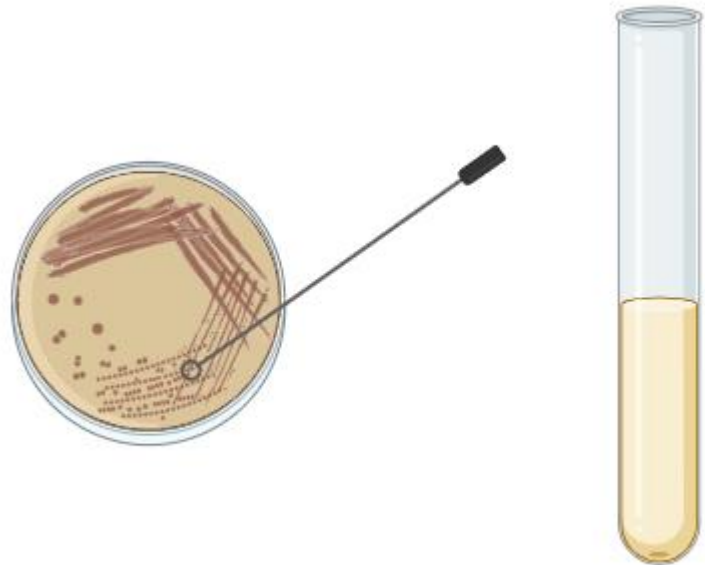
- Crescer célula
  - Overnight
  - Com antibiótico

- Coletar célula
- Descartar  
sobrenadante  
(meio)

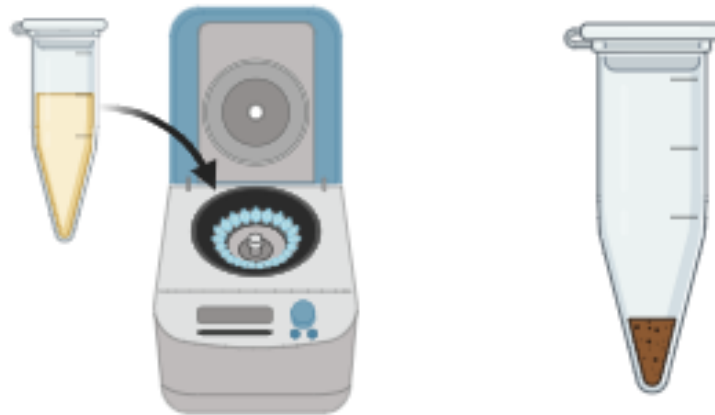


# Protocolo

- Crescer célula
  - Overnight
  - Com antibiótico



- Coletar célula
- Descartar sobrenadante (meio)



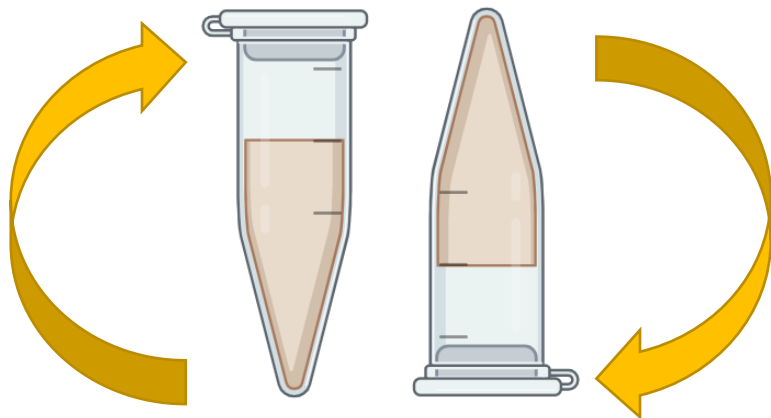
- Ressuspender célula em tampão de ressuspensão





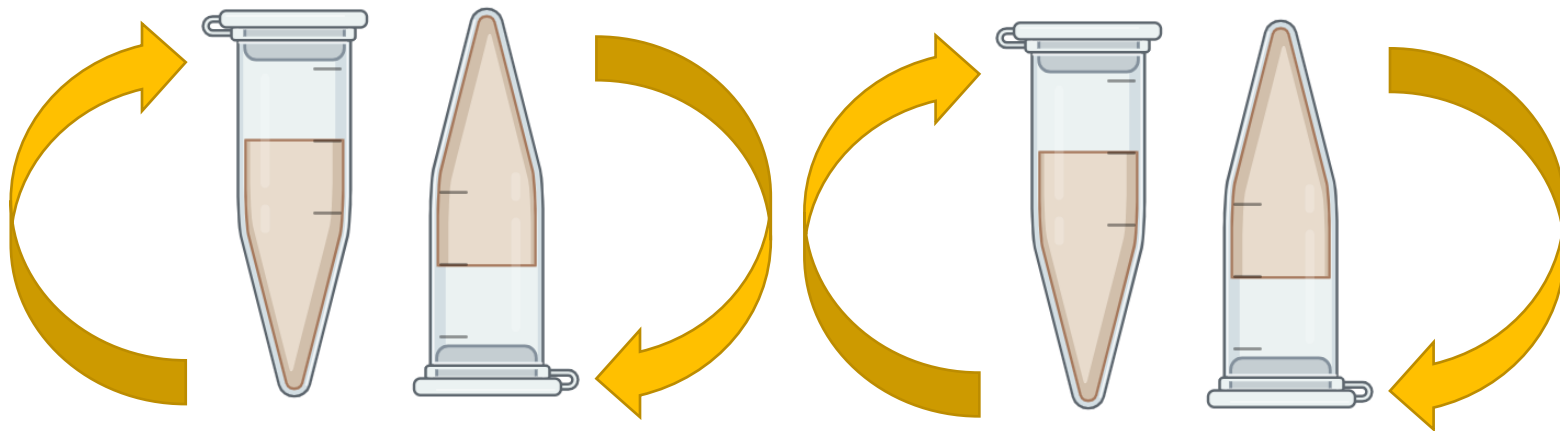
# Protocolo

- Lisar em solução alcalina
- Misturar **DELICADAMENTE** por inversão



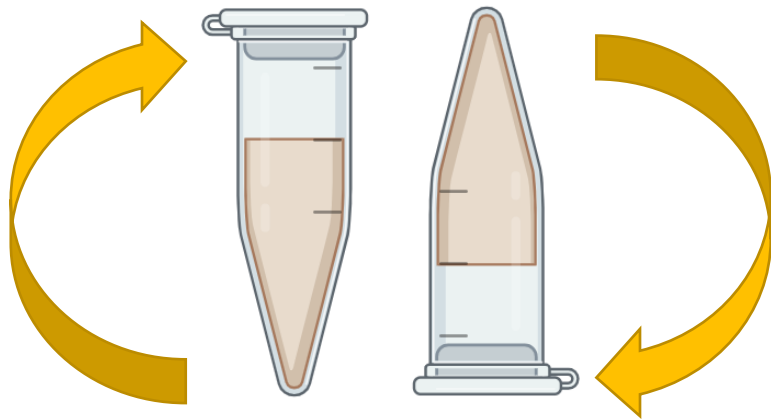
# Protocolo

- Lisar em solução alcalina
- Misturar DELICADAMENTE por inversão
- Neutralizar
- Misturar DELICADAMENTE por inversão

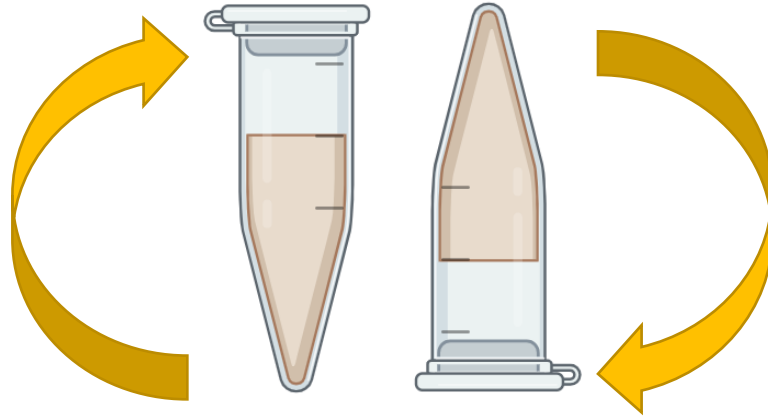


# Protocolo

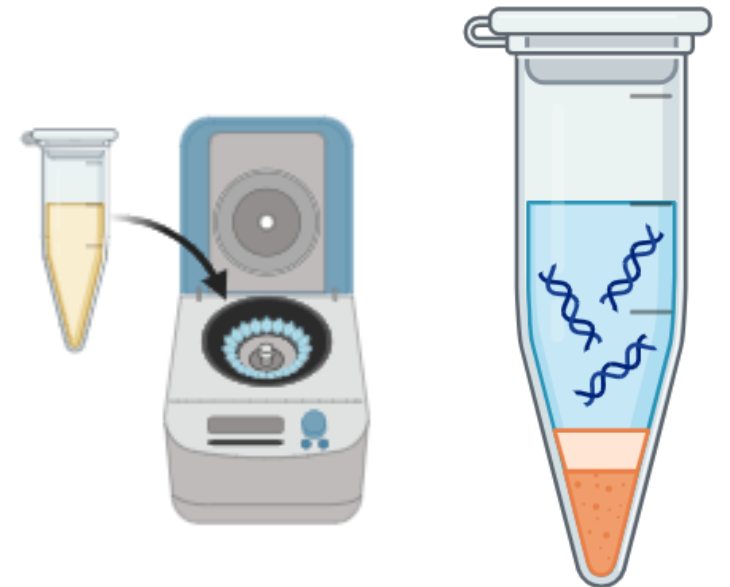
- Lisar em solução alcalina
- Misturar DELICADAMENTE por inversão



- Neutralizar
- Misturar DELICADAMENTE por inversão

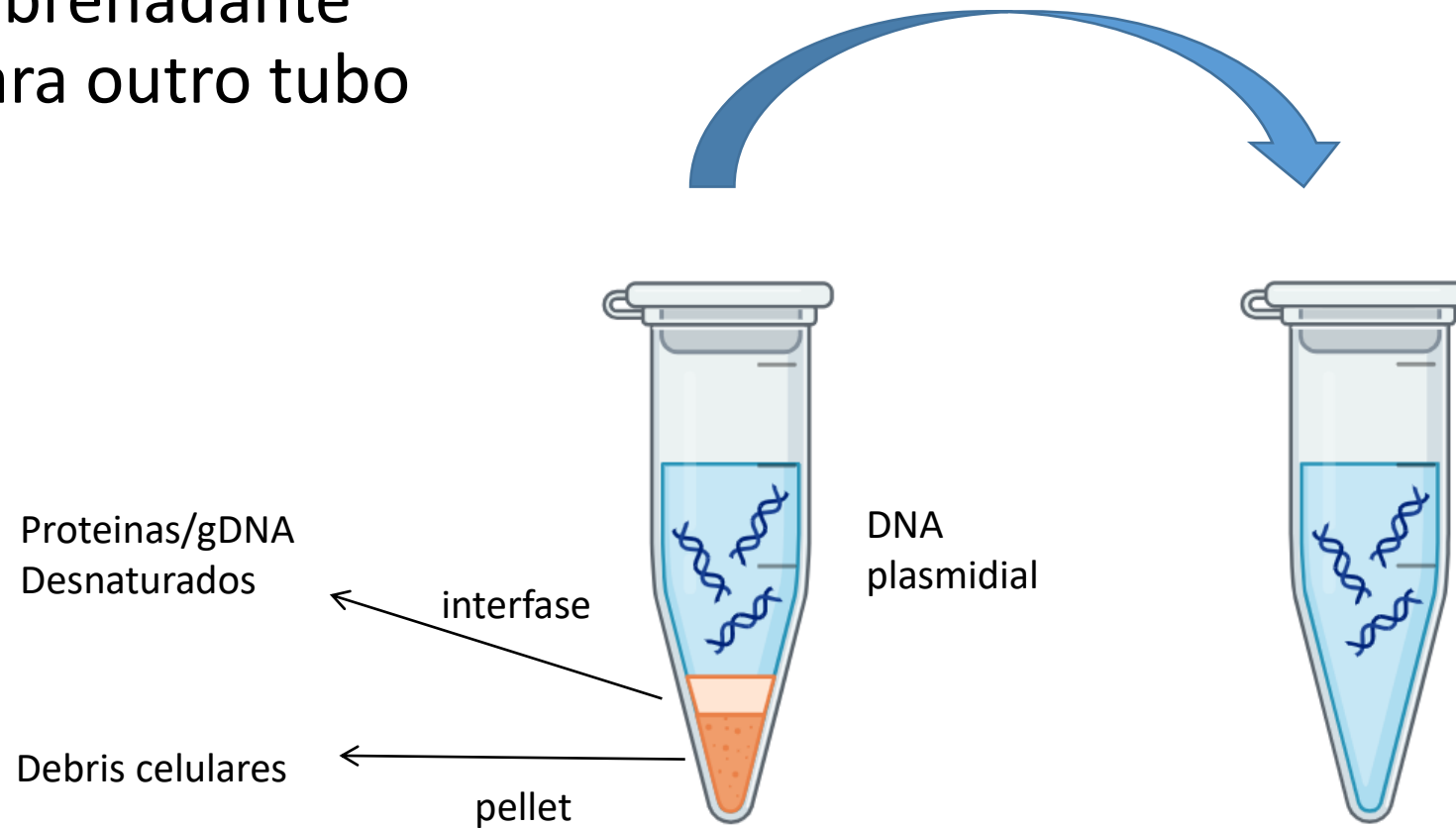


- Remover debris celular centrifugando



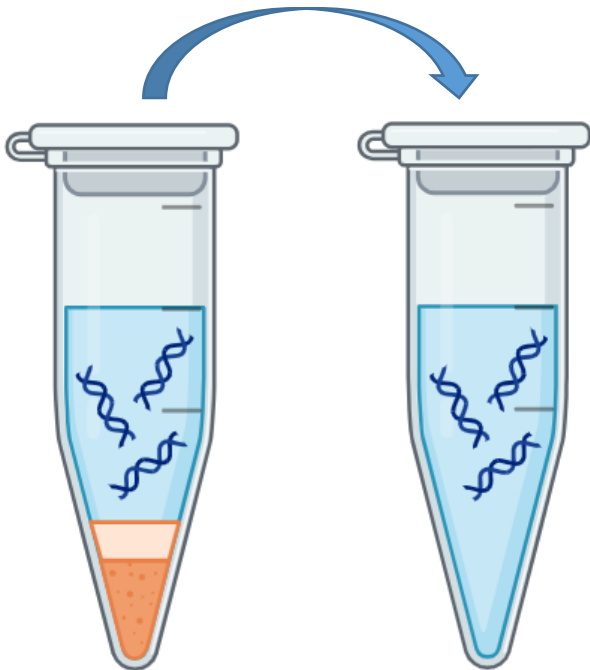
# Protocolo

- Passar sobrenadante para outro tubo

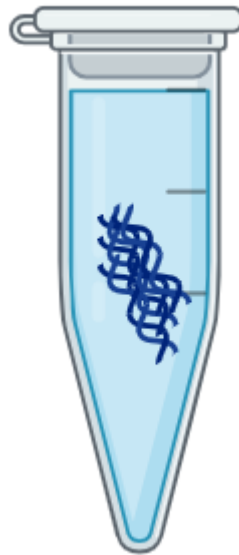


# Protocolo

- Passar sobrenadante para outro tubo

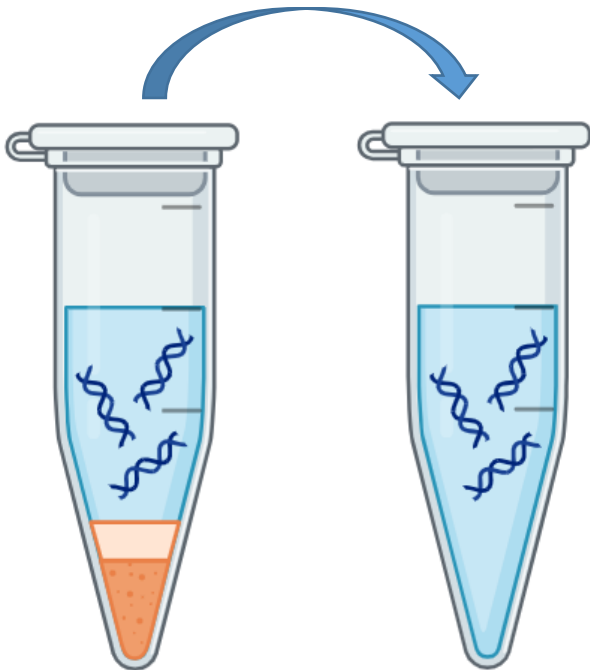


- Precipitar DNA plasmidial com álcool

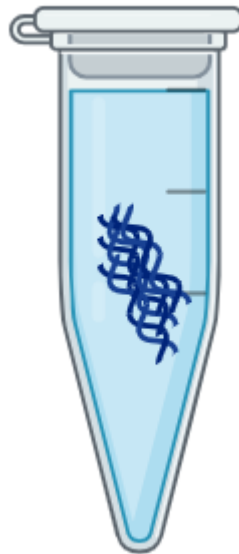


# Protocolo

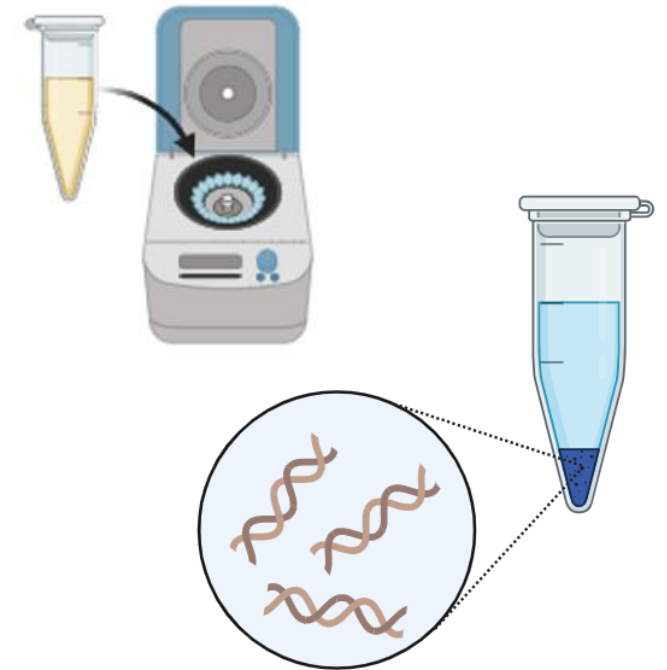
- Passar sobrenadante para outro tubo



- Precipitar DNA plasmidial com álcool

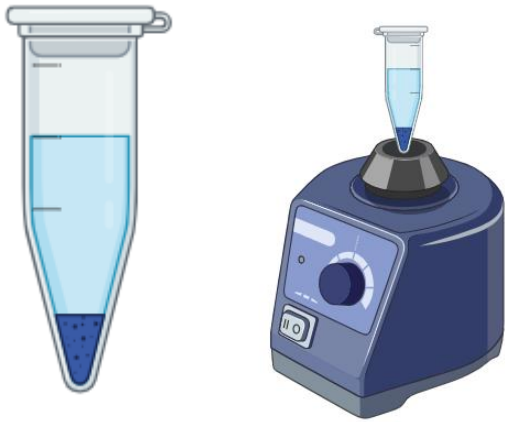


- Centrifugar para pelletar o DNA



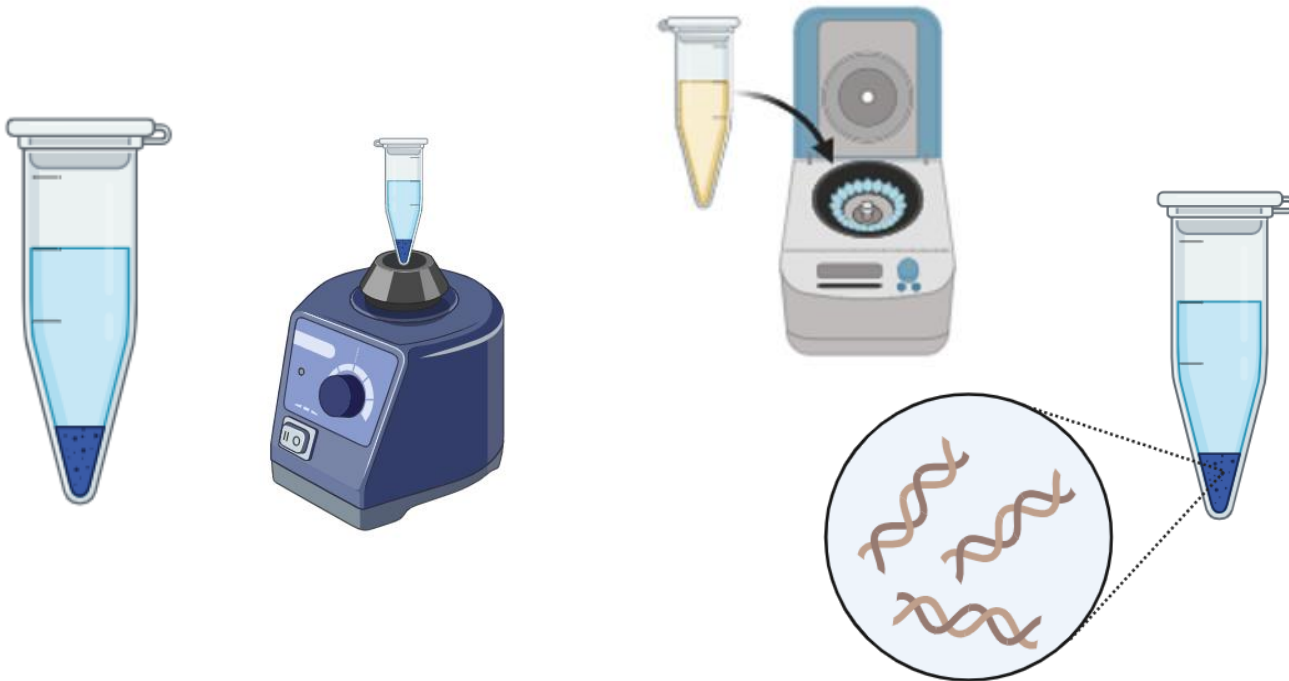
# Protocolo

- Lavar pellet com etanol 70%



# Protocolo

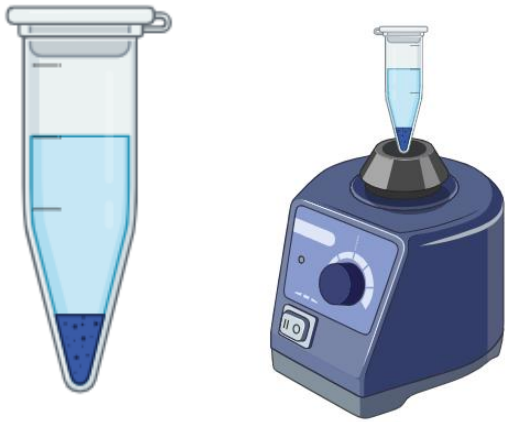
- Lavar pellet com etanol 70%
- Centrifugar para pelletar o DNA



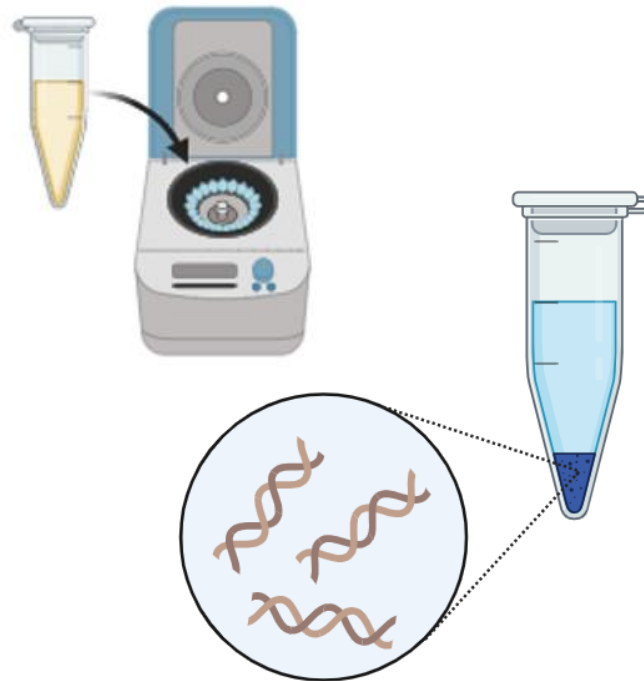


# Protocolo

- Lavar pellet com etanol 70%



- Centrifugar para peletar o DNA

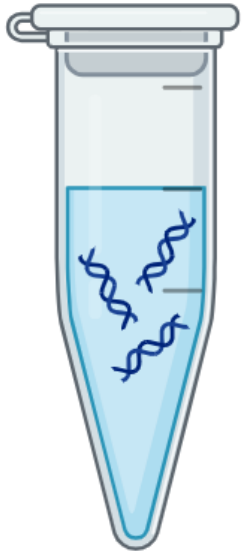


- Secar DNA



# Protocolo

- Recessuender DNA

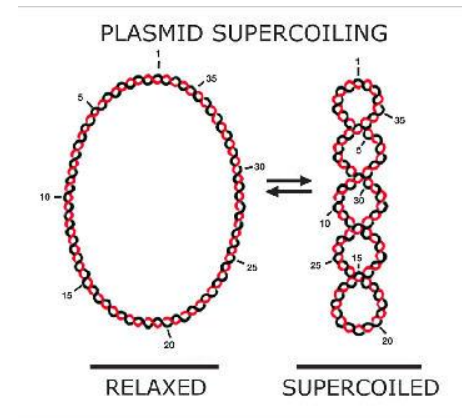
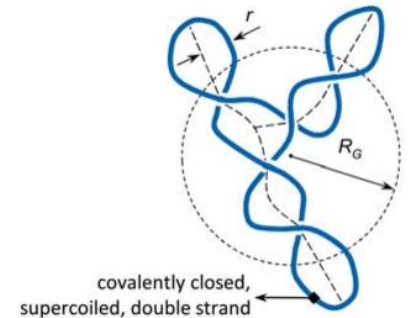


# Funções das soluções

- Tampão de ressuspensão
  - Tris-HCl: Tamponante
  - EDTA: Quelante de cations – Inibe nucleases e desestabiliza LPS/envelope
  - Glicose: Tampona durante condição básica da lise ( $pK_a=12.16$ )
- Tampão de lise
  - SDS: Lise da membrana citoplasmática
  - NaOH: Desnatura proteínas e DNA.
    - Porque DNA plasmidial não é totalmente desnaturado?
      - Mesmo tendo separação parcial das fitas por ele ser coiled coil ele se mantém unido
- Tampão de neutralização
  - Acetato de potássio: Neutraliza pH, renatura DNA, precipitação do SDS
- Etanol: precipitar DNA

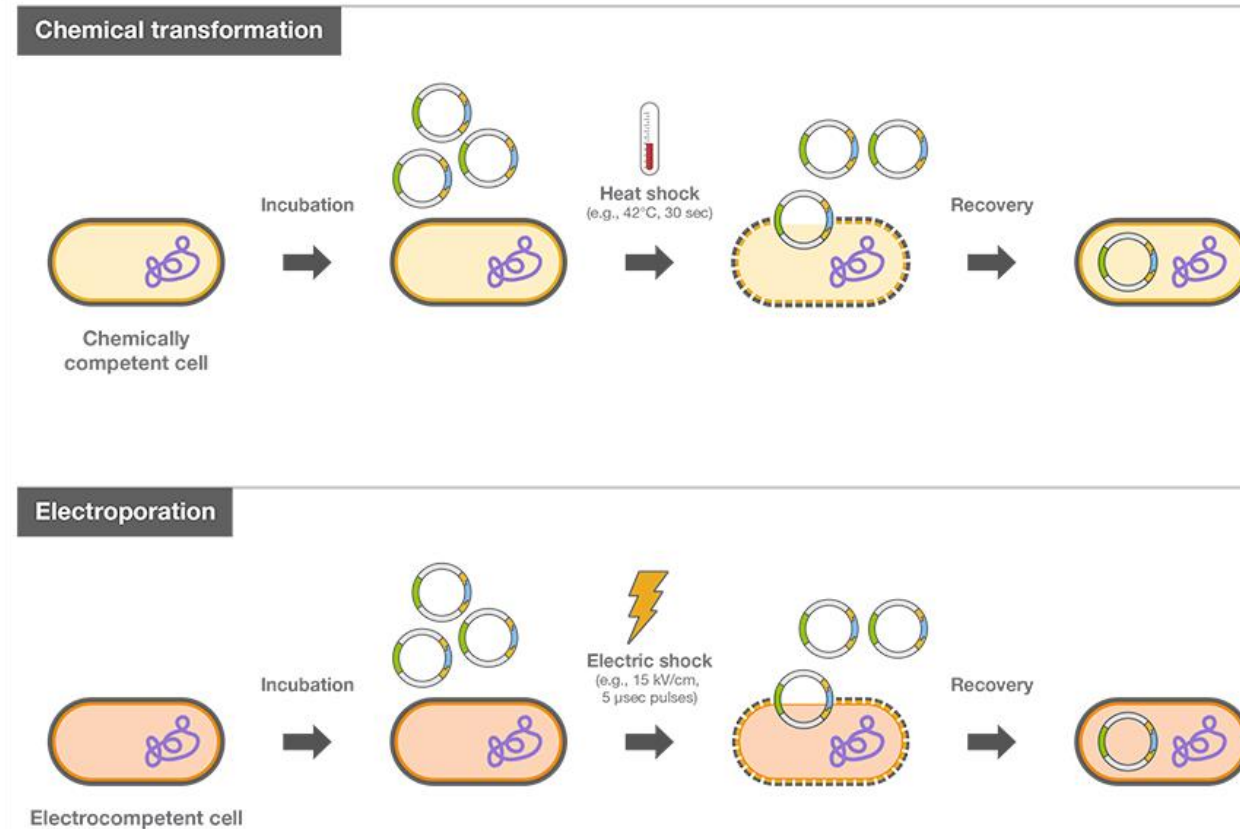
# Funções das soluções

- Tampão de ressuspensão
  - Tris-HCl: Tamponante
  - EDTA: Quelante de cations – Inibe nucleases e desestabiliza LPS/envelope
  - Glicose: Tampona durante condição básica da lise ( $pK_a=12.16$ )
- Tampão de lise
  - SDS: Lise da membrana citoplasmática
  - NaOH: Desnatura proteínas e DNA.
    - Porque DNA plasmidial não é totalmente desnaturado?
      - Mesmo tendo separação parcial das fitas por ele ser coiled coil ele se mantém unido
- Tampão de neutralização
  - Acetato de potássio: Neutraliza pH, renatura DNA, precipitação do SDS
- Etanol: precipitar DNA



# Transformação de bactéria

- Introdução de plasmídeo na bactéria

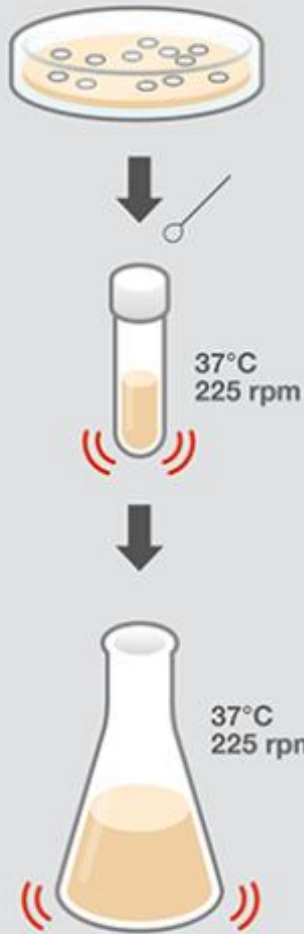


# Como é feita a célula competente?

Etapa já feita pelas técnicas

- Resumidamente:
  - Crescer até fase log
  - Lavar e armazenar em um tampão contendo:
    - Glicerol: crioprotetor (para proteger durante o congelamento)
    - $\text{Ca}^{2+}$  : torna a célula mais permeável
      - Existem protocolos alternativos com outros aditivos:
        - Manganês  $\text{Mn}^{2+}$ , potássio( $\text{K}^+$ ), cobalto ( $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ), rubídio ( $\text{Rb}^+$ ), DMSO, DTT
- Para células eletrocompetente: Só água e glicerol – não pode ter sal

Cell growth at 37°C



Cell preparation at 4°C

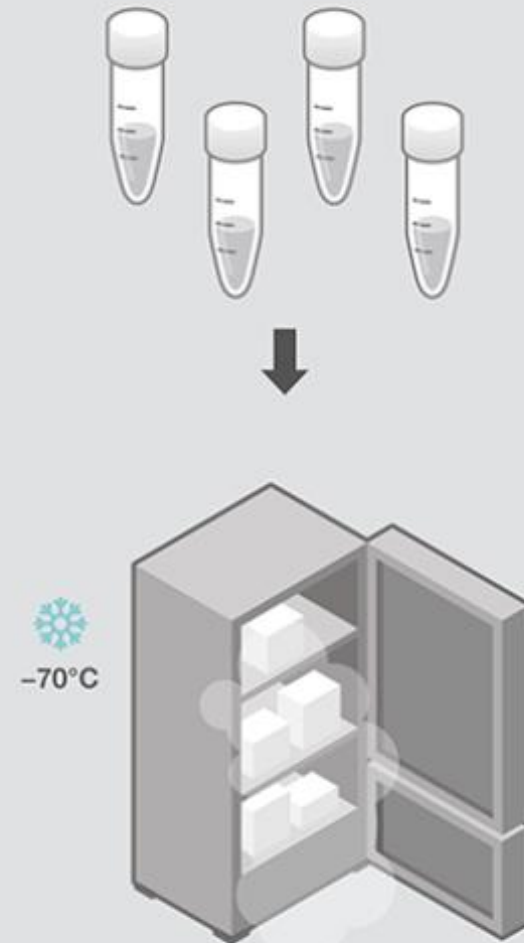
For chemical competency



For electrocompetency



Aliquoting and storage at -70°C



# Transformação

- Adicionar DNA na célula
- Incubar no gelo por 30 minutos
- Choque térmico
- Adicionar meio e incubar a célula por 1h para expressão dos genes de resistência
- Plaquear
- Crescer overnight

Na próxima prática:

- Eletroforese de DNA em gel de agarose
- Análise de eficiência de transformação