

ATIVIDADE TEÓRICO-PRÁTICA

BIOLOGIA MOLECULAR I 27/10/2021

Transformação bacteriana

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.

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 β -lactamase apresentarão resistência a um β -lactâmico como a ampicilina (penicilinas- atuam na formação da parede bacteriana) e permitirão que a bactéria portadora cresça em meio de cultura contendo este antibiótico. No caso do plasmídeo (pBC) a ser empregado nesta aula, este 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. Para a replicação autônoma dos plasmídeos, é essencial uma origem de replicação (*ori*) juntamente com outros elementos de controle.

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 mesmo 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 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 discutido. 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 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 um meio nutritivo em ágar, em condições de seleção apropriadas (presença de antibiótico, no caso cloranfenicol). Posteriormente podem ser crescidas e congeladas para uso posterior.

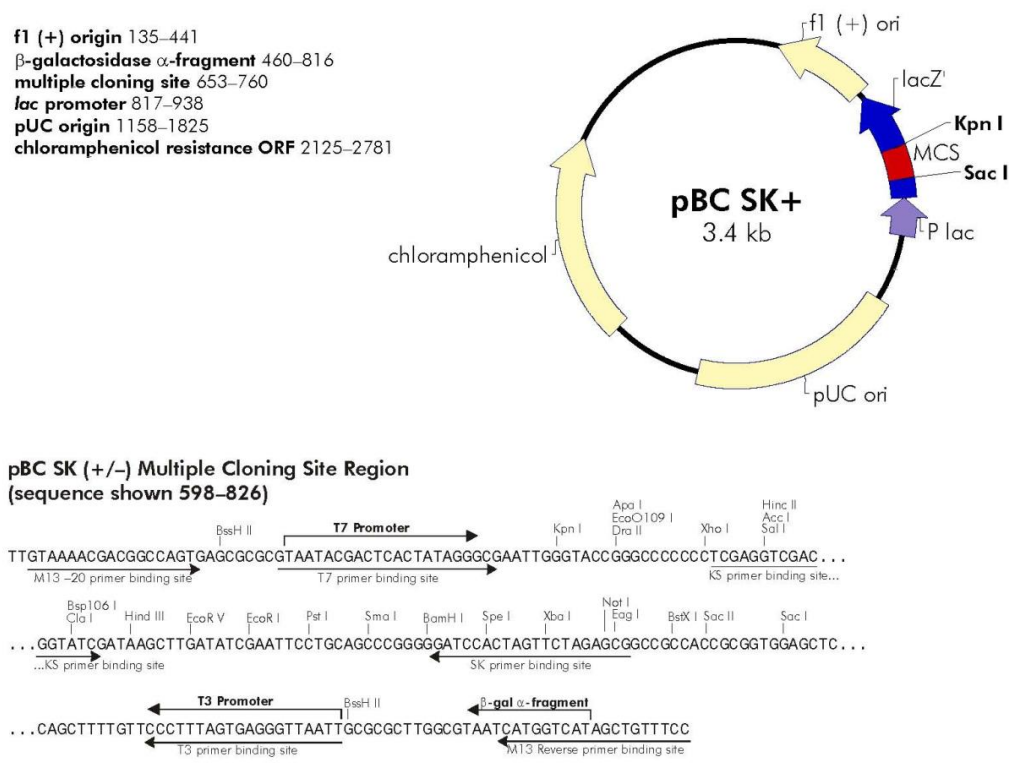


Figura 1– Esquema do vetor pBC SK com suas principais características. Em detalhe aparece a sequência do sítio de clonagem com os sítios para as diferentes endonucleases de restrição.

Experimento 1

Transformação das bactérias.

Será fornecido a cada grupo uma amostra de solução de plasmídeo com concentração conhecida (**0,5 ng/μL**), que será utilizada para transformar bactérias por choque térmico. Cada grupo também receberá dois tubos com as bactérias competentes previamente preparadas para transformação, que devem ser mantidas no gelo, além de placas de petri com meio de cultura para bactérias acrescido do antibiótico cloranfenicol.

Protocolo de transformação

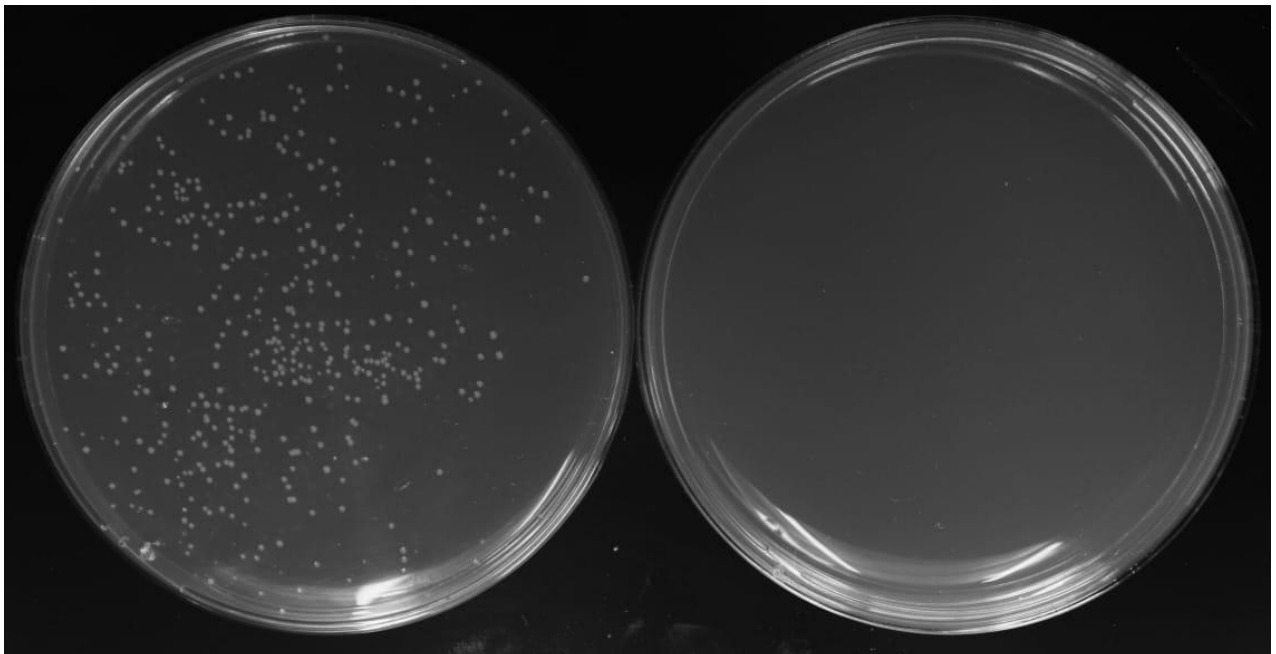
- Manter as bactérias no gelo até que estejam completamente descongeladas. Cada tubo tem 50 μL de bactérias competentes, marcá-los como “1” e “2”.
- Colocar 1 μL da solução de DNA no tubo 1. O outro tubo (2) servirá de controle, onde não será adicionado DNA plasmidial.
- Incubar em gelo por 30 minutos.
- Transferir rapidamente para banho um a 42°C e incubar 2 minutos (cronometrados!).
- Incubar em gelo por 1 minuto.

- f) Adicionar **700 μL** de meio líquido LB e manter sob agitação por 1 hora a 37°C .
- g) Semear **100 μL** de cada transformação em uma placa de LB+Cloranfenicol.
- h) Incubar a placa de bactérias em estufa a 37°C por 24 horas.

Foi realizado o procedimento de transformação descrito acima. Em um dos tubos com bactéria competente foi adicionado DNA, enquanto o outro foi mantido como controle, sem adição de DNA. O resultado das duas transformações está abaixo.

Responda:

- 1) **Interprete os resultados obtidos. A transformação funcionou? Como você pode ter certeza?**
- 2) **Caso tenha funcionado, faça o cálculo da eficiência de transformação (número total de transformantes / μg de DNA).**
- 3) **Como você interpretaria os resultados, caso houvesse crescimento bacteriano nas placas resultantes das transformações 1 e 2?**
- 4) **Como você interpretaria os resultados caso não houvesse crescimento bacteriano nem na transformação 1, nem na transformação 2?**



Resultado do experimento. Na esquerda, resultado da transformação 1. Na direita, a placa resultante da semeadura do tubo 2.