

QBQ2457- Lab 4 - parte 1 – Transformação bacteriana com a construção plasmidial

Após a reação de PCR, digestão dos insertos e ligação do inserto ao vetor pET28a, o próximo passo consiste na introdução da construção plasmidial em células bacterianas, e sua manutenção como elemento autônomo auto-replicativo. Este procedimento é chamado transformação bacteriana.



O plasmídeo (vetor plasmidial) pode conferir à bactéria hospedeira propriedades vantajosas, como resistência a antibióticos, capacidade de utilizar fontes alternativas de nutrientes e/ou de causar doenças em outros organismos. Algumas bactérias, como *Helicobacter*, por exemplo, são naturalmente competentes e podem captar o DNA do meio extracelular. Entretanto, a bactéria mais usada em técnicas de Biologia Molecular é *Escherichia coli*, que não é naturalmente competente para transformação. Desse modo, ela deve ser tornada competente para poder receber um plasmídeo.

A escolha do procedimento para tornar a *E. coli* competente depende da técnica de transformação que será utilizada: Eletroporação ou Choque-térmico. De modo geral, estes tratamentos visam causar uma desestabilização da membrana plasmática bacteriana e criação temporária de poros, os quais permitem a passagem do DNA plasmidial. Nós utilizaremos o método do CaCl_2 para obter bactéria competentes para transformação. Neste método as bactérias são submetidas a um tratamento num meio hipotônico contendo cloreto de cálcio que interage com as cargas negativas do DNA plasmidial e da membrana, facilitando a entrada do DNA plasmidial, quando submetidas a um choque térmico.

Após a transformação, as bactérias são colocadas em meio de cultura apropriado (geralmente meio LB) e incubadas em temperatura ótima (geralmente 37°C por 1 hora) para se recuperarem dos estresses do processo de transformação e para a expressão do gene de resistência ao antibiótico.

Os vetores plasmidiais comumente usados para a clonagem de genes inteiros ou de fragmentos de genes, possuem, além da origem de replicação que permite sua propagação em *E. coli*, eles contêm um gene de resistência a antibiótico (ex: ampicilina (Amp^R)). Assim, a introdução do vetor plasmidial em *E. coli*, que é normalmente sensível à ampicilina, leva ao aparecimento de bactérias capazes de crescer em meio contendo este antibiótico.

Apenas uma pequena parcela das bactérias competentes receberá de fato o plasmídeo, portanto uma etapa de seleção é necessária para que apenas as que receberam o plasmídeo se multipliquem após a transformação. Isso é feito por meio do plaqueamento meio LB-agar contendo ampicilina (50 mg/mL). Como controle, uma amostra das células transformadas será também semeada em meio sem antibiótico para avaliar a viabilidade das células após o procedimento de transformação.

Protocolo: Transformação bacteriana

O ideal é que o procedimento seja realizado em ambiente asséptico (fluxo laminar, ou atrás de bico de Bunsen), para evitar contaminação por bactérias ou fungos do ambiente. Manipule convenientemente o material estéril fornecido, de acordo com as instruções das professoras e monitores.

NÃO ABRA AS PLACAS DE ÁGAR ATÉ O MOMENTO DE USO

As bactérias competentes para transformação foram preparadas a partir de uma cultura de *E. coli* (ex: DH5 α) em fase exponencial de crescimento e de sucessivas lavagens do precipitado de bactérias com uma solução de CaCl₂. As bactérias competentes assim preparadas podem ser armazenadas a -80°C, para uso posterior.

1. Inocular 5 ml de meio LB líquido com uma colônia de bactérias *E. coli* DH5 α e incubar à 37°C até o dia seguinte sob agitação forte (200-250 rpm). (etapa realizada pelas técnicas no dia anterior).
2. Diluir a pré-cultura 1/10 em 10 ml de meio LB, incubar à 37°C sob agitação até OD_{600nm}=0,6 (fase exponencial de crescimento). (etapa já iniciada uma hora antes do início da aula).
3. Transferir o erlenmeyer com a cultura para o gelo.
4. Transferir as bactérias para um tubo de centrifuga previamente resfriado.
5. Coletar as bactérias por centrifugação (4000 rpm, 5 min, 4°C). Descartar o sobrenadante cuidadosamente, invertendo o tubo de volta no erlenmeyer.
6. Ressuspender o sedimento de bactérias em 5 ml de tampão acetato de sódio (gelado) 20 mM pH 6,5 contendo CaCl₂ 0,1 M. Incubar no gelo por 20 minutos.
7. Coletar as bactérias (4000 rpm, 5 min a 4 °C) e ressuspender em 1 ml do mesmo tampão (gelado).
8. Após pelo menos 30 min no gelo estas BACTÉRIAS COMPETENTES já podem ser transformadas.

As bactérias quimiocompetentes estão com as membranas fragilizadas, portanto é muito importante que elas sejam mantidas sempre no gelo antes da transformação para manter sua viabilidade.

Procedimento anterior já foi realizado. Iniciar experimento no passo 9.

9. Para transformar, distribuir 0,1 ml (previamente gelado) da suspensão de bactérias competentes para cada um de 2 tubos. Adicionar:

Tubo 1. 10 μ L da reação de ligação feita na aula passada

Tubo 2. Nada (controle da transformação).

10. Incubar em gelo por 15 min.
11. Transferir os tubos do gelo para o banho a 42°C por exatamente 90 segundos e não voltar para o gelo.
12. Adicionar 0,9 ml/tubo de meio LB e incubar a 37°C sem agitação, em banho-maria, por uma hora.
13. Neste intervalo, marcar as placas de acordo com a tabela abaixo:

Placa	Nome	Plaqueamento	Volume
LB-Kan	Ligação	Tubo 1	200µL
LB-Kan	controle de contaminação	Tubo 2	50µL

14. Transferir 200 µl da transformação da ligação (tubo 1) para uma placa de LB-Kan (LB contendo canamicina). Espalhar as bactérias com o auxílio de uma alça de vidro, previamente flambada e em seguida resfriada na própria tampa da placa de Petri.
15. Transferir 200 µl da transformação controle (tubo 2) para uma placa de LB-Kan (LB contendo canamicina). Espalhar as bactérias com o auxílio de uma alça de vidro, previamente flambada e em seguida resfriada na própria tampa da placa de Petri.
16. Levar as placas para estufa a 37°C por um período de 12-16 horas para aguardar o crescimento das colônias.
17. No dia seguinte*, contar as colônias obtidas em cada placa. Calcular a eficiência da transformação.
18. Guardar a placa “ligação” para continuar na próxima aula prática.

* As placas serão recolhidas e guardadas na geladeira até a próxima aula.