

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

PROJETO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**CONSTRUÇÃO DE BACTÉRIAS VERDES
FLUORESCENTES
PARA USO DIDÁTICO**

Débora do Vale

Gabriela Modenesi

Gabriela Burle

Joana Santos

Silvana Safar

Introdução

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é provavelmente o organismo mais conhecido da microbiologia. É uma bactéria bacilar Gram-negativa e pertence à família das Enterobacteriaceae. São aérobias e anaeróbias facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula. A *E.coli* é um dos poucos seres vivos capaz de produzir todos os componentes de que é feita, a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. Ela é lactase positiva, uma enzima fermentadora de açúcares que é grandemente responsável pela flatulência de cada pessoa, especialmente após o consumo de leite e seus derivados.

Atualmente, muito se sabe sobre a bioquímica e a genética da *E. coli*, sendo ela uma ferramenta importante para a pesquisa biológica básica e considerada por muitos pesquisadores quase como um animal de laboratório (TORTORA, et al., 2003).

Os plasmídeos são ferramentas importantes nos laboratórios de genética e bioquímica, onde são usados rotineiramente para multiplicar ou expressar genes específicos. Inicialmente, o gene a ser replicado é inserido num plasmídeo. Os plasmídeos são então inseridos em bactérias por um processo chamado transformação

A transferência de DNA plasmidial para vetores como a bactéria *E. coli* é um dos fundamentos da biologia molecular moderna. Na transformação química (ou clássica) as células são tornadas competentes por incubação numa solução fria de cloreto de cálcio, a que se segue um choque térmico de curta duração. Há também a técnica de transformação por eletrochoque, envolvendo a aplicação de um campo elétrico transitório de alta voltagem em uma mistura de células de *E. coli* e DNA plasmidial e estas estão entre as mais eficientes.

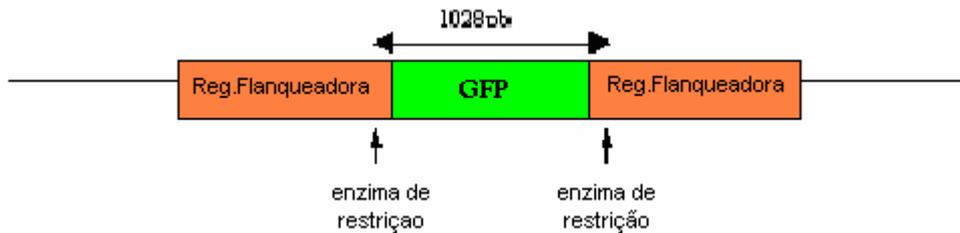
Objetivo

Este projeto tem como objetivo a construção de uma linhagem de *Escherichia coli* fluorescente para uso didático e demonstração do processo de transformação.

Materiais

- Insetos:

GFP (Gram Fluorescent Protein) em fase de leitura clivado com enzima de restrição:



- Microrganismos:

1. Linhagens de E. coli

MC1061

DH5 α

- Cultivo de microrganismos:

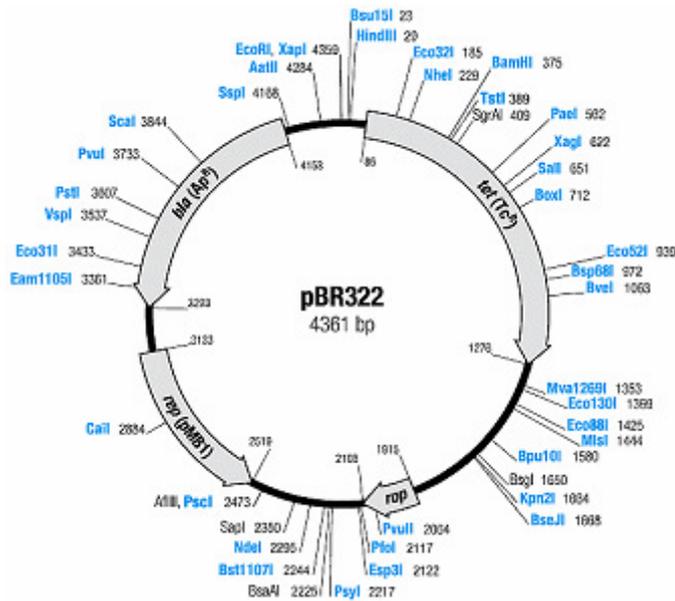
2. Meios de cultura bacteriana (Sambrook *et al.*, 1989)

LB: Triptona 1,0%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 1,0% ou 0,5%.

LB Ágar: Triptona 1,0%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 1,0%; Bacto Ágar 2,0%.

- Vetores:

Plasmídeo pBR322:



Métodos

- Os meios de cultura devem ser esterilizados em autoclave (120 gf / cm² – 15min) antes de serem utilizados. Para critérios de seleção serão usados os antibióticos Ampicilina (100 µg / mL) e tetraciclina (20 µg / mL). Também será acrescentado às placas contendo bactérias transformadas com os vetores e seus insertos, o indutor IPTG (0,4 M) e análogo de lactose X-Gal (50mg / mL).

- Amplificação do inserto por PCR

Serão utilizados iniciadores (primers) que amplificam as regiões flangeadoras do gene Gfp. Será feita padronização do PCR em diferentes condições, como distintas temperaturas, concentração de MgCl₂, iniciadores, diluição do molde e concentração da Taq polimerase para a amplificação dos fragmento. Para a reação, a mistura deverá conter: tampão 4E, dNTPs, MgCl₂, iniciadores, Taq polimerase e água. Após a adição dos fragmentos genômicos, as reações serão levadas ao termociclador e programadas para os ciclos. Uma alíquota deverá ser reservada de cada reação após amplificação para análise em gel de agarose 0,8%.

- Preparação das bactérias quimiocompetentes (Sambrook *et al.*,1989)

Será feito um inóculo em 100 mL de LB que ficará incubado aproximadamente 3 horas a 37°C sob agitação (300 ciclos / minuto). A cultura será transferida para tubos estéreis previamente gelados, estocando-os em gelo por 10 minutos. As culturas serão centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes serão descartados e os pellets ressuspensos, no gelo, em 10 mL de CaCl₂ 0,1M gelado (preparado e filtrado no mesmo dia da preparação). Segue-se nova etapa de centrifugação e este procedimento de lavagem com CaCl₂ será repetido por 3 vezes. Após estas lavagens, cada pellet será ressuspensionado em 2 mL de CaCl₂ para cada 50 mL de cultura original. Alíquotas de 100 µL de células serão congeladas (gelo seco) e armazenadas no freezer a -70°C.

- Preparação dos vetores

Os vetores serão clivados com a mesma enzima de restrição utilizada na clivagem do inserto, em solução contendo água miliQ, tampão, e enzima que posteriormente deve ser centrifugada em spin rápido, deixada em banho Maria a 37°C por 2 horas, e aquecida posteriormente à temperatura de desnaturação da enzima.

- Desfosforilação dos vetores

Para cada 100 µg de DNA será utilizado 1 µL da enzima CIP (defosforilado – 10U/ µL) e 10% do tampão de fosfatase, completando o volume final com água miliQ. A amostra deverá ser incubada a 37°C por 1 hora e 30 min, sendo aquecida posteriormente a 67°C para inibir a atividade enzimática. Após isso, será adicionado acetato de potássio (5M) para precipitação do DNA juntamente com etanol absoluto, congelando a amostra a -20°C por 16 horas. No dia seguinte, a amostra será centrifugada a 13500 rpm por 10 minutos (4°C), ressuspensionando em 20 µL de água.

- Ligação do inserto ao vetor ((Sambrook *et al.*,1989)

A reação de ligação será feita com a adição de 100ng do vetor digerido com acrescido da mesma proporção molar dos insertos amplificados e digeridos. A esta solução serão adicionados 1µL de tampão de ligação (10X), 1µL de ligase e água miliQ para um volume final de 10 µL. A reação será incubada a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas e utilizada para a transformação das bactérias competentes.

- Transformação de bactérias

Serão transferidos 2µL de cada ligação para tubos contendo bactérias quimiocompetentes previamente descongeladas. Em seguida estas serão submetidas a choque térmico para a absorção do plasmídeo (20 min no gelo-50 seg a 42°C-2min no gelo). Serão então adicionados 100 µL de LB e as amostras serão incubadas por 1hr e 30 min a 37°C sob agitação (150 rpm). As células posteriormente serão plaqueadas em meios seletivos específicos.

Cronograma

01/03 a 15/03	Preparação dos meios, e matérias. Preparação dos microorganismos competentes.
16/03 a 31/03	Amplificação do inserto GFP e clivagem. Clivagem do vetor e desfosforilação.
01/04 a 07/04	Ligação do inserto ao vetor. Análise comparativa em gel de agarose do vetor clivado e sem o inserto, e do vetor com o inserto ligado digerido para comprovação da ligação.
08/04 a 15/04	Transformação Química
16/04 a 20/04	Replicação dos exemplares obtidos.
20/04 a 20/06	Apresentação da proposta e das bactérias fluorescentes às escolas e universidades.

Orçamento

- TAQ DNA POLIMERASE- 5 UNIDADES POR MICROLITRO-100 UNIDADES-62,00USD
- PRIMERS FOR PCR AMPLIFICATION- 2 MICROGRAMAS-205,00USD
- 10 MICROMOLAR DE DNTPS MIX-100 MICROLITROS-67,00USD
- PLASMID PBR322-25MICROGRAMAS-146,00USD
- CÉLULAS DH5 ALFA-1 MILILITRO-165,00USD

Justificativa

A produção de bactérias fluorescentes pode ser de grande importância e utilidade, uma vez que viabilizaria a observação de processos biológicos da bactéria, como conjugação, transformação, transdução, transferência vertical de material genético, entre outros.

As bactérias verdes poderiam ser usadas para fins didáticos em escolas para ensinar os processos reprodutivos das bactérias de uma maneira interativa, além de tornar a espécie bacteriana mais conhecida utilizada mais interessante para os alunos.

Referências Bibliográficas

ALBERTS B., Biologia Molecular da Célula. Ed. Artmed 4ªed. 3ª reimpressão, 2006

ANTHONY J. F. GRIFFITHS WILLI., Genética Moderna. Ed. Artmed.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., Microbiologia. Ed. Artmed. 6ª ed. 2ª reimpressão, 2003

GLONE, D.M., HOMES, B.D., DNA Cloning 1: A Practical approach: Core Techniques. The Practical Approach Series. 2a ed. 2002

www.invitrogen.com.br