

Crislaine Lambiase Calvete

Universidade de São Paulo - USP

Marcos Montani Caseiro

Professor Adjunto, Centro Universitário Lusiada, UNILUS.

Cleide Barbieri de Souza

Professora Universitária, Pesquisadora. Centro Universitário Lusiada, UNILUS.

BIOTECNOLOGIA: TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO

RESUMO

A Biotecnologia proporciona benefícios em diversas áreas, como na agricultura, propiciando a produção de alimentos transgênicos com maior qualidade nutricional/funcional e resistência à pragas e herbicidas. Na área ambiental serve como remediador das desordens causadas pelas atividades antropogênicas. A Biotecnologia utiliza técnicas onde genes específicos podem ser isolados, redesenhados e introduzidos às células, adicionando ao respectivo organismo uma nova característica. A inserção de genes no interior de uma célula hospedeira é um processo fundamental à transgenia. Desta forma, o presente trabalho descreve a importância das técnicas biotecnológicas moleculares destacando os processos de transformação genética bacteriana para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos, para tanto visa demonstrar em sua parte prática uma transformação genética bacteriana utilizando o método de choque térmico.

Palavras-Chave: Biotecnologia. Transformação Gênica. Recombinantes por choque térmico.

BIOTECHNOLOGY: BACTERIAL TRANSFORMATION METHOD FOR THERMAL SHOCK

ABSTRACT

Biotechnology provides benefits in several areas, including agriculture, enabling the production of genetically modified foods with higher nutritional / functional quality and resistance to pests and herbicides. In the environmental area serves as remediation of disorders caused by anthropogenic activities. Biotechnology techniques used where specific genes can be isolated redesigned and introduced to cells by adding to its body with a new feature. The insertion of genes into a host cell is a key to transgenesis process. Thus, this paper describes the importance of molecular biotechnology techniques highlighting the processes of bacterial genetic transformation for the development of biotechnology products and processes, both aimed to demonstrate in practice of a bacterial genetic transformation using heat shock method.

Keywords: Biotechnology. Gene transformation. Recombinant heat shock.

INTRODUÇÃO

A transformação genética fundamenta-se na introdução de um gene específico em uma célula receptora e a subsequente expressão gênica, adicionando à célula hospedeira uma nova característica. Esse desenvolvimento abre novas possibilidades ao melhoramento genético de diversas espécies de organismos existentes (KLUG et al, 2010)

Mesmo numa divergência entre os variados seres vivos existentes, todos possuem algumas características em comum, dentre estas, a composição de nucleotídeos em seu material genético, processos metabólicos como a replicação de DNA, transcrição de RNA, tradução proteica e síntese de energia química (ZAHA, 2001; BROOKS, 2012).

A era da engenharia genética começou com a primeira transformação gênica obtida com sucesso em 1973, conduzida por Herbert Boyer e Stanley Cohen na Califórnia. Eles construíram um gene com parte de DNA bacteriano e parte de DNA de Sapo (*Xenopus laevis*). Esta experiência abriu as portas para uma nova forma de se fazer o melhoramento genético. A partir daí foram desenvolvidos crescentes estudos e pesquisas baseadas na manipulação genética, nas quais impactaram diversas áreas da sociedade possibilitando o melhoramento dos produtos gerados, tais tecnologias foram designadas de biotecnologia (ZAHA et al, 2012).

A biotecnologia por ser uma ciência multidisciplinar compreendida como o ramo da tecnologia que se ocupa da aplicabilidade de dados da microbiologia, biologia molecular, engenharia, bioética, entre outras, aos problemas decorrentes do relacionamento do homem com a natureza que o cerca. Deste modo, o conceito de biotecnologia pode incluir qualquer técnica que utilize organismos vivos ou partes deles, visando, entre outros, a produção e/ou aprimoramento de produtos, aperfeiçoamento de plantas ou animais e descobertas de novos microrganismos para usos específicos (CASTRO, 2003).

A primeira aplicação comercial da biotecnologia ocorreu em 1982, pela empresa Genentech®, que produziu o primeiro produto biotecnológico, a insulina humana para o tratamento do Diabetes. Para gerar este produto biotecnológico o gene humano da insulina foi isolado e introduzido em bactérias *Escherichia coli*, na qual se multiplicaram em tanques e, por expressão gênica, produziram grandes quantidades da proteína para posterior etapa de purificação. Essa descoberta foi de essencial importância no tratamento de pessoas portadoras do Diabetes Mellitus (CÂMARA, 2013).

A biotecnologia atua expressivamente no setor da agricultura com o melhoramento genético das plantas propiciando resistência as pragas, aumento de produtividade, bem como alimentos com alto teor nutricional. São exemplos da aplicabilidade da biotecnologia no setor alimentício os alimentos como: iogurtes, queijos, vinhos, cervejas entre outros (GAZZONI, 2013).

No setor do meio ambiente a biotecnologia contribui para a recuperação de águas contaminadas por compostos inorgânicos e orgânicos presentes em efluentes domésticos e industriais descartados aos corpos receptores de forma inadequada. Como ocorre com a Petrobrás que utiliza o processo da biorremediação, tratamento de áreas contaminadas com o uso de microrganismos, no contexto de contenção de vazamentos de petróleo no meio ambiente. Cientistas da Estação Experimental do Zaidín, em Granada/Espanha, identificaram bactérias marinhas que possuem a capacidade de biodegradar naftaleno, um composto derivado do refinamento do petróleo (DAVIS, 2013). No estudo de RUGH e colaboradores (1998) plantas de álamo amarelo (*Liriodendron tulipifera*) foram transformadas com o gene *merA*, responsável por produzir a enzima mercúrio-reductase. Dessa forma essas plantas foram capazes de minimizar o mercúrio de sua forma mais tóxica (Hg²⁺) para sua forma menos tóxica/volátil (Hg), já que Hg²⁺ devido a sua alta solubilidade em relação ao Hg⁰, pode facilmente ser depositado nas superfícies terrestres.

Mediante a todas estas importantes aplicabilidades da biotecnologia torna-se fundamental o processo da manipulação genética para gerar organismos com características específicas e/ou aprimoradas, o uso da tecnologia do DNA recombinante é um dos passos-chave para que todos esses processos de fato possam ocorrer.

TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

A tecnologia do DNA recombinante emprega técnicas desenvolvidas pelos geneticistas bacterianos para purificar, amplificar, modificar e expressar sequências gênicas específicas. O uso da engenharia genética e da clonagem revolucionou a biologia e a medicina (PENNA; CANOLA, 2009).

A Lei de Biossegurança Nacional define engenharia genética como sendo a "atividade de produção e manipulação de moléculas de DNA/RNA recombinantes". Esta técnica é um processo laboratorial de troca de informa-

ção hereditária entre dois organismos independentes, acarretando a produção de novas combinações de genes e facilitando o aparecimento de organismos variantes dentro de uma espécie (PENNA; CANOLA, 2009).

Graças à tecnologia do DNA recombinante, genes específicos podem agora ser isolados, redesenhados e devolvidos às células de seus respectivos organismos. Para tanto, estas manipulações exigem a necessidade de enzimas que possam cortar, ligar e replicar "in vitro" o DNA, bem como transcrever reversamente o RNA como é o caso da técnica RT – PCR (reação da transcriptase reversa) a qual se utiliza a enzima isolada de retrovírus, a transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) (LADEIRA et al., 2011).

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

EXTRAÇÃO DE DNA

A extração e a purificação de ácidos nucleicos a partir de amostras experimentais é uma etapa criteriosa para obter alta eficiência de amplificação nos protocolos da reação da PCR (KLUG et al., 2010).

Desde a extração do ácido nucleico até a reação de PCR, muitos processos devem ser seguidos cuidadosamente. Para evitar a degradação das amostras de DNA, a extração de DNA inclui procedimentos de lise celular simultaneamente com inativação das DNases, visando proteger o material genético, seguida da sua purificação. A partir do DNA purificado usado como molde é realizada a PCR, que possibilitará a amplificação de sequências nucleotídicas de interesse (OLIVEIRA et al., 2007).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica da PCR criada por Kary Mullis em 1983 foi utilizada pela primeira vez para a amplificação da beta-globulina humana. Essa reação permite que um determinado gene seja multiplicado em várias cópias a partir de uma única amostra, facilitando sua análise, permitindo alta sensibilidade e especificidade na geração de diagnósticos e prognósticos. Para realização da técnica são necessários diversos compostos que possuem funções específicas (LADEIRA et al., 2011).

A localização da sequência alvo é feita pelos iniciadores (primers), que são pequenas moléculas de fita simples de DNA (oligonucleotídeos), que delimitam e complementam a região alvo no material genético. Cada uma das novas fitas de DNA estendidas a partir dos iniciadores servirá como molde para a síntese de uma nova fita (ZAHA, 2001).

A enzima *Taq DNA polimerase*, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, é uma enzima termoestável que exibe alta atividade na temperatura de 72°C e é estável por longas incubações a elevadas temperaturas (95°C) necessárias à reação. Ela é a enzima responsável por introduzir nucleotídeo à nova fita de DNA que está sendo formada, tendo como base uma fita-molde (VIEIRA, 2013).

Os desoxinucleotídeos servem de matéria-prima para a produção das novas fitas. São compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) que apresenta uma hidroxila na posição 3', a partir desta hidroxila que a fita nascente é estendida (VIEIRA, 2013).

Para que ocorra o anelamento de primers, ligação da enzima *Taq DNA polimerase* e extensão da nova fita de DNA são necessárias variações de temperatura. A utilização do aparelho Termociclador permite automaticamente o controle e alternância de temperaturas fielmente durante períodos programados de tempo em diferentes ciclos, onde cada ciclo de amplificação são constituídos por 3 fases designadas desnaturação, anelamento e extensão. A repetição dessas etapas permite a amplificação de um segmento de DNA onde a taxa de replicação é exponencial, gerando milhares de segmentos de DNA idênticos no final do processo (KLUG et al., 2010).

ELETROFORESE

Uma das formas mais tradicionalmente utilizada para análise de fragmentos de DNA é a técnica da eletroforese em gel, a qual permite a separação das moléculas de ácidos nucleicos (ALBERTS et al., 2010; BOLLELA et al., 1999).

A eletroforese é capaz de separar moléculas por carga e tamanho. A fonte elétrica é composta por um eletrodo negativo e outro positivo em diferentes polos, que produzem um campo elétrico no interior da cuba eletroforética (ALBERTS et al., 2010; BOLLELA et al., 1999).

As moléculas de DNA amplificadas são associadas a um agente intercalante, introduzidas para o interior de poços em uma matriz de agarose. Posteriormente são submetidas a um campo elétrico onde irão migrar para o polo que as atrai, ou seja, como o DNA é molécula negativa migrará para o polo positivo. Tamanho e forma da molécula são critérios que influenciam na sua velocidade de migração, pois quanto maior o tamanho e complexidade de forma, maior tempo será necessário para seu deslocamento no interior do gel (ALBERTS et al., 2010).

SEQUENCIAMENTO DE DNA

Em 1970 Frederick Sanger desenvolveu método para determinação da sequência de nucleotídeos de moléculas de DNA manualmente. Com o avanço tecnológico e interesse em pesquisas o sequenciamento de Sanger foi automatizado. Os sequenciadores automáticos utilizam nucleotídeos terminadores, os didesoxirribonucleosídeos trifosfatos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) marcados com fluoróforos sem 3' OH (pentose) resultando no término precoce da síntese. Através da fluorescência de cada ddNTPs, é possível a identificação das bases nucleotídica da sequência de DNA em análise (ZAHA, 2001). Esta técnica foi utilizada no trabalho de Bueno (2013), com objetivo de mapear genes humanos marcadores para diagnóstico de doenças genéticas, bem como na identificação de novos genes.

Na tecnologia do DNA recombinante esta técnica é utilizada para análise da sequência nucleotídica do DNA recombinante previamente a expressão proteica. No presente trabalho não foi necessária sua aplicabilidade já que o plasmídeo utilizado não foi manipulado geneticamente, ou seja, não foi inserido um fragmento de interesse no sítio múltiplo de clonagem deste vetor.

PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GÊNICA

Os métodos utilizados para a codificação e expressão do gene de interesse exigem que o material gênico seja manipulado fora da célula e depois introduzido em organismos vivos. Os vetores de clonagem exercem um papel fundamental na incorporação do gene ao interior das células vivas.

VETORES DE CLONAGEM

Os vetores de clonagem são elementos gênicos de replicação independentes e são utilizados para permitir a inserção (*in vitro*) de uma sequência de nucleotídeos de interesse (DNA exógeno) no interior de uma célula hospedeira. Com a utilização de enzimas de restrição e da DNA ligase, dentre outros componentes moleculares, é possível clivar o vetor de clonagem em sítios de restrição específicos e ligá-lo ao gene desejado, visando a aquisição de nova característica. Existe uma variedade de vetores de clonagem dentre eles os plasmídeos.

PLASMÍDEOS

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular encontradas em bactérias ou em células de leveduras, podendo ser considerados parasitas moleculares. Eles possuem entre 5.000 a 400.000 pares de bases (pb) e fazem uso dos recursos da célula para sua própria replicação e expressão gênica.

Eles são úteis em pesquisas moleculares que desejam modificar geneticamente um vetor por adição de novos fragmentos de DNA em sua sequência e são facilmente inseridos em bactérias pelo processo de transformação genética. Dessa forma são utilizados para o transporte de segmentos de DNA específicos para o interior de células alvo. Os fragmentos inseridos nos plasmídeos não podem exceder 10 Kb (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; VOET; VOET, 2007).

Os plasmídeos devem possuir algumas características importantes: devem ser pequenos, de fácil manipulação e replicação, possuir genes que conferem resistência a um ou mais antibióticos para seleção das células transformadas, além de conter sítios de restrição localizados estrategicamente para a inserção do DNA de interesse. Neste trabalho foi utilizado o plasmídeo de clonagem de *Escherichia coli* denominado pUC19 (pUC - Plasmídeo Universal de

Clonagem). Porter e colaboradores (1998) utilizou o pUC19 em seu trabalho que envolve a eficácia de uma vacina de DNA contra dengue em ratos e o efeito imuno-estimulatório da CpG em respostas aos anticorpos (PORTER, 1998).

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas de restrição são encontradas em vários organismos procarióticos como forma de proteção e sua principal função é de clivar moléculas de DNA invasor (ZAHA et al., 2012)

Na biotecnologia as enzimas fazem o reconhecimento de sequência nucleotídica específica no duplex de DNA alvo cortando ambas as fitas em locais determinados. A maioria delas reconhecem sequências entre quatro a oito pares de bases e hidrolisam uma ligação fosfodiéster, realizando um corte palindrômico, já que os sítios de restrição possuem dupla simetria rotacional (ZAHA et al., 2012).

Mais de 3.500 enzimas de restrição já foram identificadas e cerca de 150 delas são utilizadas. A aplicabilidade das enzimas de restrição é essencial para técnicas de recombinação gênica, devido ao corte produzido em sítios específicos tanto no fragmento de DNA de interesse quanto em plasmídeos. A ação da enzima DNA ligase permite que ambas moléculas se hibridizem nas regiões complementares geradas pelo processamento das enzimas de restrição (ALBERTS et al., 2010).

DNA LIGASE

A DNA ligase catalisa a ligação entre duas fitas de DNA complementares pela formação de uma ligação fosfodiéster. É necessário um grupamento hidroxílico livre na extremidade 3' e um grupamento fosfato na extremidade 5', além de diversas reações subsequentes para que ocorram as ligações entre o gene de interesse e o plasmídeo (ALBERTS et al., 2010).

TRANSFORMAÇÃO GÊNICA

Na natureza, os plasmídeos são transferidos naturalmente pelo contato direto entre duas bactérias pelo processo de conjugação. Na engenharia genética foram criados métodos similares *in vitro* que auxiliam na transformação genética de bactérias e outros microrganismos (DIONÍSIO, et al., 2005)

Dentre os métodos físicos mais comumente utilizados na técnica de DNA recombinante destacam-se a eletroporação, biobalística e o choque térmico. No método químico utiliza-se cloreto de cálcio paralelamente a técnica de choque térmico (CASE; FUNKE; TORTORA, 2012).

A eletroporação utiliza a ação da corrente elétrica de alta voltagem, sobre os componentes da membrana citoplasmática, polarizando a célula e gerando uma diferença de potencial. Quando este potencial ultrapassa um limiar de voltagem, ocorre micro rupturas (abertura dos poros) provisórias na membrana celular, promovendo um fluxo de íons e moléculas através das membranas, como exemplo, a entrada intracelular de um plasmídeo. A remoção do campo elétrico resulta no fechamento espontâneo dos poros bacterianos (FURLANETO, 2006).

A biobalística, outro método de inserção de DNA exógeno por bombardeamento de partículas (Ex: tungstênio ou ouro) cobertas com o material genético de interesse e disparadas em direção às células-alvo. Essa técnica é mais comumente utilizada em células vegetais e necessita de um equipamento chamado "Canhão Gênico". Como o microprojétil ultrapassa a membrana citoplasmática e nuclear, este método dispensa a utilização de corrente elétrica. O projétil atinge diretamente o núcleo, não estando sujeito à ação de nucleases citoplasmáticas. Segundo Pôssa et al. (2010) na pesquisa realizada com milho transgênico produzido por biobalística, a técnica apontou baixo número de cópias do DNA alvo (PÔSSA et al., 2010).

A técnica mais econômica (por não necessitar de equipamentos onerosos) dentre as citadas anteriormente é a técnica do choque térmico. Existem duas formas desta técnica ser empregada: Choque térmico e Choque térmico com cloreto de cálcio. A técnica de choque térmico é o aumento repentino de temperatura criando diferença de pressão entre o exterior e o interior da célula induzindo a formação de poros na membrana plasmática da bactéria e permitindo que o plasmídeo entre intracelularmente na célula hospedeira e/ou bacteriana. Quando a técnica utiliza cloreto de cálcio, as bactérias receptoras do vetor são tratadas previamente com essa solução para neutralizar a repulsão eletrostática.

ca entre o DNA plasmidial e a membrana celular bacteriana, antes de iniciar o choque de temperatura (BROOKS et al., 2012).

A técnica por choque térmico é considerada acessível por mostrar-se teoricamente uma metodologia simples e de baixo custo, na parte prática deste trabalho testaremos sua eficiência.

Para salientar a importância do assunto retratado neste trabalho, foi desenvolvido uma pesquisa pela pesquisadora Cruz (2013) tendo por objetivo comparar as técnicas de transformação por choque térmico, eletroporação e produção de protoplastos em *E.coli* para produção de penicilina G acilase (PGA) recombinante, mas até o presente momento, o projeto não obteve sucesso nas tentativas de eletroporação do microrganismo com os protocolos utilizados.

MARCADORES DE SELEÇÃO

Marcadores de seleção é uma estratégia para selecionar apenas os organismos transformados geneticamente contendo o DNA alvo exógeno. Neste trabalho a seleção será realizada pelo uso de antibiótico ampicilina, assim, somente conseguirão crescer no meio de cultura contendo ampicilina as bactérias que, de fato, receberam o DNA exógeno, que neste caso é um plasmídeo que possui o gene de resistência a ampicilina (VOET; VOET, 2007).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar em sua parte prática uma clonagem bacteriana, pelo processo de transformação genética utilizando o método de choque térmico, demonstrando sua eficiência além de ser um método fundamental para gerar processos e produtos biotecnológicos com baixo custo.

METODOLOGIA

É necessária a realização de todos os passos metodológicos com as células DH5 α competentes sem adição do DNA exógeno (pUC19), crescidas em placa de petri com meio de cultivo (Lúria-Bertani [LB]) suplementado com o antibiótico Ampicilina, estas foram denominadas placas controle negativo; e a mesma linhagem semeada em placa contendo meio LB sem adição do antibiótico, visando analisar a viabilidade celular da cepa bacteriana, foi denominada controle positivo.

MEIO DE CULTIVO LURIA BERTANI

O Luria Bertani (LB) é um meio utilizado para o cultivo e manutenção de cepas recombinantes tanto para a recuperação das células de *E. coli* (na forma líquida) após o processo de choque térmico quanto para a semeadura dos possíveis clones (na forma sólida).

Para o preparo de 300mL de meio de cultivo LB, em um erlemeyer, foi adicionado 100mL de água destilada, seguido da diluição dos seguintes componentes: 1% de triptona; 1% de NaCl; 0,5% de extrato de levedura e 2% de ágar e ajustando o volume final para autoclavação por 15 minutos a 121°C objetivando sua completa esterilização. Para produção do meio de cultura LB sólido foi acrescido 2% de ágar.

Deixou-se o meio atingir aproximadamente 60°C e adicionou-se 100 μ L do antibiótico Ampicilina na concentração final de 100 μ g/mL, homogeneizando posteriormente. Aproximadamente 25mL do meio de cultura, previamente preparado, foi utilizado para o preparo das placas de petri.

TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Para analisar a eficiência da técnica de choque térmico foi obtido um kit de clonagem contendo bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α competentes, e o plasmídeo pUC19 que possui dentre várias características o gene de resistência à ampicilina (Ampr).

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

O tubo de células de *E. coli* competentes da linhagem DH5 α (Invitrogen®) é descongelado em gelo molhado. Também colocar um tubo estéril de microcentrifuga de tamanho 1,5mL em gelo molhado. Homogeneizar delicadamente as células DH5 α com a ponta da pipeta e para cada transformação aliquotar 50 μ L de células no tubo de microcentrifuga de 1,5ml previamente gelado.

As células DH5 α não utilizadas no procedimento foram novamente congeladas, primeiramente, em gelo seco com etanol por 5 minutos e posterior retorno ao freezer com temperatura de - 80°C.

Adicionar 2,5 μ l do DNA pUC19 (250pg) aos 50 μ l de células DH5 α previamente descongeladas e homogeneizando suavemente como mostrado na figura 1.

Figura 1 – Adição de 50 μ L de células competentes DH5 α em tubo plástico de microcentrifuga de 1,5mL.



O tubo contendo 50 μ l de células DH5 α com 2,5 μ l do DNA pUC19 devem ser incubados em gelo durante 30 minutos, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Incubação em gelo.



Neste passo, o tubo contendo 50µl de células DH5α com 2,5µl do DNA pUC19 previamente incubadas no gelo devem ser colocadas por 20 segundos em um banho maria a 42°C para a realização de um choque térmico nas células, visando desestabilizar as membranas de parede celular (figura 3).

Figura 3 – Choque térmico em banho-maria a 42°C.



Os tubos foram recolocados em gelo molhado por 2 minutos. Adicionar 950µL de meio de cultura LB (Luria Bertani) líquido pré-aquecido em cada tubo, visando a recuperação das células.

Em seguida, os tubos devem ser incubados em estufa microbiológica à 37°C por um período de 1 hora, em agitação. Após a incubação em estufa, as células transformadas devem ser semeadas, em duplicata, em placas de petri contendo meio sólido LB suplementado com antibiótico Ampicilina (100µg/ml), com alça de Drigalski visando uma distribuição celular homogênea (figura 4). Os volumes semeados em cada placa foram: 50µl, 100µl e 200µl.

Figura 4 – Semeadura das células.



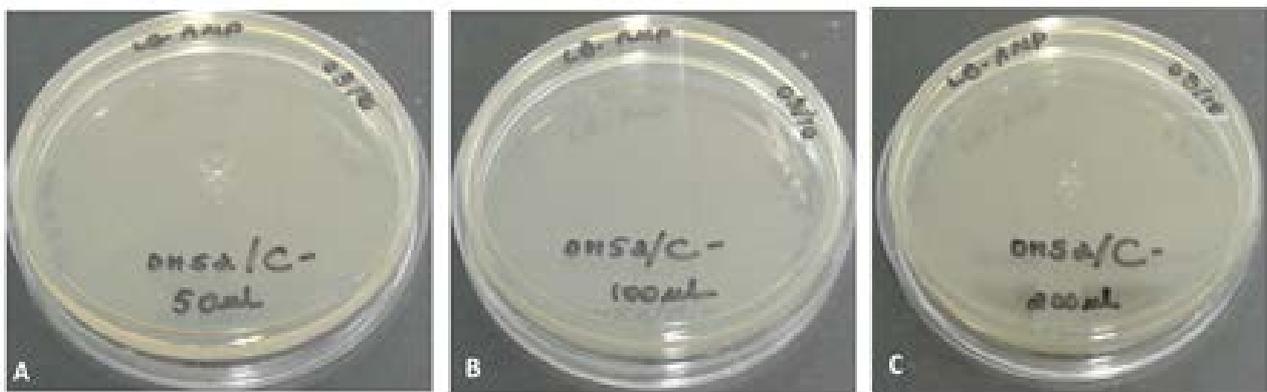
Após semeadura das células transformadas, dentro do fluxo laminar, é importante aguardar a secagem da cultura. No passo final, as placas semeadas e secas foram incubadas por um período de 16 horas em estufa microbiológicas à 37°C.

RESULTADOS

PLACAS CONTROLE NEGATIVO

A ausência do crescimento nas placas controle negativo confirma a funcionabilidade do meio de cultura contendo ampicilina, impedindo o crescimento das células da bactéria *E. coli* competente que não possuem o DNA exógeno (pUC19) o qual apresenta o gene responsável pela resistência ao antibiótico ampicilina (Ampr), conforme ilustrado na figura 5.

Figura 5 – Ausência de crescimento em placa contendo: A) 50µl de células; B) 100µl de células; e, C) 200µl de células.



CONTROLE POSITIVO

O crescimento das células na placa controle positivo garante a viabilidade das células em se desenvolver em meio de cultura que não possuem ampicilina no meio. Este é um procedimento usual e importante para análise da qualidade e perfil das cepas bacterianas utilizadas no procedimento (Figura 6).

Figura 6 – Crescimento celular em placa (seta) com meio de cultura LB sem ampicilina.



PLACAS TESTE

A presença de crescimento de colônias nas placas testes confirma a funcionalidade do processo de clonagem realizado. As colônias de bactérias *E. coli* presentes na placa de Petri (contendo meio de cultivo LB e ampicilina) mostram que estas bactérias receberam, de fato, o plasmídeo (pUC19 - DNA exógeno), pela técnica de transformação genética por choque térmico. O DNA exógeno (contendo gene *Ampr*) que foi inserido na célula bacteriana conferiu resistência ao antibiótico ampicilina presente na placa. De forma geral, cada célula transformada exibiu o fenótipo de resistência ao antibiótico, conferido pelo gene presente no plasmídeo, crescendo colônia bacteriana no meio de cultura.

Os resultados dos testes apontaram crescimento de 08 colônias isoladas (figura 7) e uma placa com crescimento bacteriano em toda extensão da placa, ou seja obtivemos uma única placa forrada (figura 8).

Figura 7 – Crescimento de *E.coli* transformada em meio LB com antibiótico ampicilina. A) Crescimento de 2 colônias na concentração de 50 μ l de cultura com células transformadas; B) Crescimento de 3 colônias na concentração de 100 μ l de cultura com células transformadas; C) Crescimento de 3 colônias na concentração de 200 μ l de cultura com células transformadas.



Figura 8 – Placa contendo meio de cultivo LB com ampicilina. Crescimento em toda extensão da placa, na concentração de 100 μ l de cultura com células transformadas.



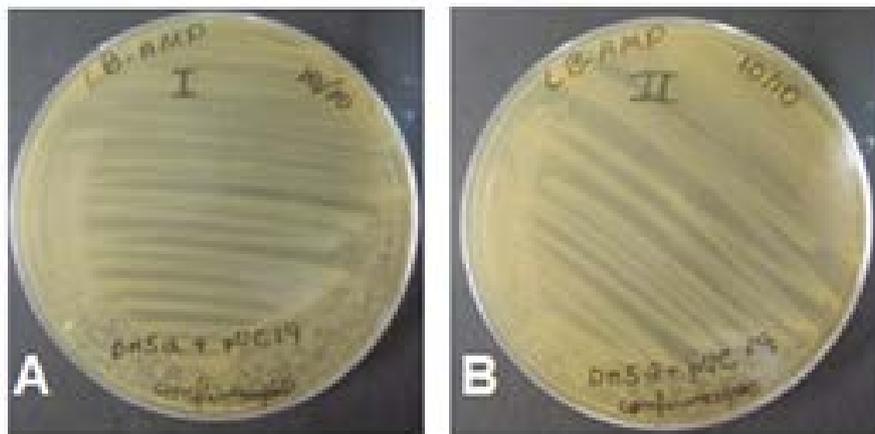
Todas as colônias isoladas (8 clones isolados – figuras 7 e 8) crescidas nas placas de origem foram ressemeadas em uma nova placa de petri contendo o mesmo meio LB suplementado com ampicilina visando confirmar, preservar e proteger os clones de contaminações por colônias satélites (figura 9).

Figura 9 – Placa Gríde das 8 colônias em nova placa contendo LB com ampicilina, com intuito de confirmação, preservação e proteção de invasores.



A figura 10 representa o mesmo procedimento com a placa forrada em duplicata. Concluindo que todos os clones ressemeados eram de fato constituídos de bactérias recombinantes e que o nosso objetivo foi atingido com sucesso.

Figura 10 – Placa contendo meio de cultivo LB com ampicilina. Placas A e B: duplicata confirmatória (resultado dos dois riscos na cultura crescida da placa forrada).



CÁLCULO DA VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO

É necessário contar o número de colônias transformantes e estimar a eficiência de transformação (número de colônias por micrograma de DNA utilizado na transformação). O teste mostra-se eficiente em resultados de UFC superiores a 1×10^6 .

Número de colônias = 8 colônias isoladas + 5000 colônias (placa forrada)

[] Plasmídeo = 250 pg equivale à 0,00025 μg

<p>Unidade Formadora de Colônia (UFC) = número de colônias / [] plasmídeo (μg)</p>

UFC = 5.008 colônias/0,00025 μg

UFC = 2×10^7 transformantes/ μg plasmídeo

DISCUSSÃO

É possível observar a viabilidade das células competentes através dos resultados obtidos nos controles positivos e negativos incubados em meio LB com e sem antibiótico.

O crescimento do controle positivo em meio LB sem ampicilina garante que as células comerciais estão em perfeito estado garantindo a integridade do teste, assim como a ausência de crescimento em meio LB com antibiótico garante que as células não possuem a capacidade de degradar ampicilina sem a aquisição do plasmídeo. Portanto, os resultados são confiáveis, as células crescidas no meio de cultura com o antibiótico representam as células que adquiriram o plasmídeo pela técnica de transformação, garantindo a eficiência da técnica.

A importância da técnica de choque térmico está diretamente ligada a diversas áreas da biotecnologia. Testar a funcionalidade da técnica mostra-se fundamental no desenvolvimento de alguns projetos específicos, como demonstrou Cruz (2013) da Faculdade Federal de São Carlos (UFSCAR) onde o objetivo foi a comparação das técnicas de transformação genética por choque térmico, eletroporação e produção de protoplastos em *E.coli* para produção de penicilina G acilase (PGA) recombinante (CRUZ, 2013).

Alguns estudos em sistemas procariotos, quando comparados a eucariotos, apresentam suas vantagens de serem simples, rápidos, de baixo custo e eficientes, auxiliando e orientando estudos e pesquisas (BHOPALE; NANDA, 2005; CARUSO, 2007).

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a real possibilidade, já bem estabelecida na literatura, de que o processo de transformação genética bacteriana é umas das bases de qualquer trabalho biotecnológico (CREMONEZI, 2009; FERRO, 2010).

Dessa forma este trabalho corroborou com as pesquisas que demonstram as vantagens da técnica de transformação genética bacteriana por choque térmico é uma técnica simples, baixo investimento financeiro, ótimo retorno nos resultados e a contribuição com futuros estudos que utilizem a técnica do DNA recombinante para a geração de produtos e processos biotecnológicos

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao laboratório de microbiologia do Centro Universitário Lusíada (UNILUS) pelo auxílio com as placas e meio de cultivos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- BOLLELA, Valdes; SATO, Daisy; FONSECA, Benedito. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo/SP, n. , p.281-286, 01 jun. 1999.
- BROOKS, Geo. et al. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 25. ed. São Paulo: Artmed, 2012.
- BUENO, Maria Rita Passos. (2013) O projeto genoma humano. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=328109&indexSearch=ID>>. Acesso em: 13 out. 2013
- CÂMARA, Bruno. Avanços obtidos com a biotecnologia na saúde humana. *Biomédico*. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadrao.com/2011/05/avancos-obtidos-com-biotecnologia-na.html>>. Acesso em: 16 maio 2013.
- CASE, Christine; FUNKE, Berdell; TORTORA, Gerard. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre/rs: Artmed, 2012.
- CASTRO, Vera Lúcia. *Microrganismo geneticamente modificados e algumas implicações para a saúde ambiental*. Jaguariúna: Embrapa, 2003. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Castro_microorganismosID-J7AfUPQyRT.pdf>. Acesso em: 25 maio 2013.
- COX, Michael; DOUDNA, Jennifer; O'DONNELL, Michael. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Porto Alegre/rs: Artmed, 2012. 944 p.

CRUZ, Rosineide Gomes da Silva. Estudo comparativo de técnicas de transformação de diferentes hospedeiros para produção de penicilina G acilase recombinante. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/29768/estudo-comparativo-de-tecnicas-de-transformacao-de-diferentes-hospedeiros-para-producao-de-penicilin/>>. Acesso em: 01 maio 2013.

DAVIS, Rachel Ann Hauser. Pesquisadores estão usando bactérias para conter estragos do petróleo ao meio ambiente. Bióloga, Doutora em Química Analítica pela PUC-Rio, professora visitante da UNIRIO e pesquisadora da PUC, UERJ e UNIRIO. Disponível em: <<http://ambipetro.com.br/biotecnologia-na-recuperacao-de-danos-causados-por-vazamento-de-petroleo/>>. Acesso em: 03 jun. 2013.

Dionisio F, Conceição I., Marques AC., Fernandes L, Gordo I. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biology Letters*. 2005;1(2):250-252. doi:10.1098/rsbl.2004.0275.

FURLANETO, Luciana. (2006) Transformação genética de *Trypanosoma cruzi* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Tese de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular. Faculdade Federal do Paraná. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/7050/tese%20Luciana.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

GAZZONI, Décio. (2013) Transgênicos na mesa. Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Soja e Conselheiro do CIB. Disponível em: <<http://cib.org.br/em-dia-com-a-ciencia/transgenicos-na-mesa/>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R.; SPENCER, C.A.; PALLADINO, M.A. (2010) Conceitos de genética. 9ª edição. Artmed, Porto Alegre, RS. 323-346.

LADEIRA, Pedro Ribeiro Soares de; ISAAC, Cesar; FERREIRA, Marcus Castro. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. *Revista de Medicina, Brasil*, v. 90, n. 1, p. 47-51, mar. 2011. ISSN 1679-9836. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/58883>>. Acesso em: 09 Mar. 2015. doi:<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v90i1p47-51>.

OLIVEIRA, Márcia Cristina de Sena et al. Fundamentos teórico - práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Disponível em: <<http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/e-book/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2013. São Carlos. 2007

PENNA, João Bosco; CANOLA, Bruno César. A evolução da biotecnologia e da engenharia genética frente as implicações ambientais, ao biodireito e aos direitos ambientais. *Revista do Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia*, São Paulo, n. , p.74-88, 01 jun. 2009. Semestral.

PORTER, K. R., KOCHER, T. J. S., WU, J., RAVIPRAKASH, K., PHILLIPS, I., HAYES C. G. (1998) *Archives of Virology*: Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. Vol. 143, Number 5, Page 997

POSSA, Katia Ferreira. Avaliação de eventos de milho transgênico produzidos por biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. Anais de Congresso. Goiânia: Cnpms, 2010. p. 10 - 18. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25054/1/0096.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

RUGH, C.L., SENECOFF, J.F., MEAGHER, R.B. & MERKLE, S.A. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation *Nat. Biotechnol.* V.16, 925-928 (1998).

VIEIRA, Daniel Perez. (2013) Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Disponível em: <http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2013.

VOET, Donald; VOET, Judith. *Bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ZAHA, Arnaldo. *Biologia molecular básica*. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P.. *Biologia molecular básica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.