

Indução de competência e transformação genética em bactérias

Competence induction and genetic transformation in bacteria

João Pedro Valczara Prestes¹, Barbara Selhorst Nabhan², Juliana Vitória Messias Bittencourt³

RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar a indução de competência bacteriana visando sua posterior transformação. A transformação bacteriana é um processo crucial na tecnologia do DNA recombinante. Na natureza, bactérias capturam o DNA livre no ambiente em circunstâncias extremamente específicas e de maneira transitória. Métodos *in vitro* para induzirem essa transferência, primeiramente precisam tornar as bactérias competentes para posteriormente realizarem a transformação. Assim, este trabalho testa protocolos *in vitro* para ambas as etapas. Todos os protocolos foram realizados nas dependências do laboratório de bioengenharia da UTFPR campus Ponta Grossa. A linhagem de *E. coli* DH5-alpha foi utilizada para a indução de competência e o plasmídeo pUC19 para a transformação. Os resultados obtidos demonstraram crescimento bem-sucedido de células transformadas, as quais puderam ser selecionadas em meio seletivo para a resistência ao antibiótico que o plasmídeo possuía. Essas técnicas têm implicações significativas na biologia molecular e engenharia genética, permitindo a manipulação controlada do material genético bacteriano para aplicações biotecnológicas diversas, como a produção de proteínas heterólogas, desempenhando assim papel fundamental na expansão do conhecimento genético e no desenvolvimento de novas biotecnologias

PALAVRAS-CHAVE: Biologia molecular; Biotecnologia; Transformação genética.

ABSTRACT

The aim of this work is to assess the induction of bacterial competence for subsequent transformation. Bacterial transformation is a crucial process in recombinant DNA technology. In nature, bacteria capture free DNA from the environment under highly specific and transient circumstances. *In vitro* methods to induce this transfer first need to make the bacteria competent for the subsequent transformation. Thus, this work tests *in vitro* protocols for both stages. All protocols were conducted within the facilities of the bioengineering laboratory at UTFPR, Ponta Grossa campus. The *E. coli* DH5-alpha strain was used for competence induction, and the pUC19 plasmid for transformation. The results obtained demonstrated successful growth of transformed cells, which could be selected in a selective medium for antibiotic resistance carried by the plasmid. These techniques have significant implications in molecular biology and genetic engineering, enabling controlled manipulation of bacterial genetic material for various biotechnological applications, such as the production of heterologous proteins, thereby playing a crucial role in expanding genetic knowledge and the development of new biotechnologies..

KEYWORDS: Molecular Biology; Biotechnology; Genetic Transformation.

INTRODUÇÃO

A transformação bacteriana é um processo que envolve a troca de material genético entre bactérias, desempenhando um papel fundamental na técnica de manipulação genética (CANDURI, 2022; MARQUES, 2012). Através desse processo, a transferência de DNA exógeno para as células bacterianas resulta na aquisição de novas características genéticas, promovendo avanços significativos na pesquisa biológica e na indústria (CANDURI, 2022; CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015).

¹ Bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: joaoprestes@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3848774238051112.

² Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: barbaranabhan@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes:0788703627972750.

³ Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: julianavitoria@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5844979052853050.

Entre os métodos já estabelecidos, a transformação induzida por íons de cálcio seguida por choque térmico e a eletroporação são amplamente utilizados para introduzir o DNA plasmidial nas células (POTTER; HELLER, 2018; MARQUES, 2012), entretanto, para que a incorporação ocorra, as bactérias precisam adquirir competência, tornando-as capazes de receber e integrar o material genético exógeno em seu próprio genoma (CHANG, 2017; PANJA et al., 2008).

Para este artigo destaca-se o método químico, o qual envolve o cultivo celular até a densidade óptica próxima de 0.4 a 0.6 em 600 nanômetros, etapa onde surgem naturalmente poros na membrana celular, e posterior tratamento das células bacterianas com uma solução contendo cloreto de cálcio (CaCl_2), responsável por permeabilizar temporariamente a membrana permitindo assim a entrada do plasmídeo recombinante (FRANCISCO, 2020; PANJA et al., 2008).

Somente após o estabelecimento da competência celular é que as bactérias estão aptas a serem submetidas ao processo de transformação, etapa em que o subsequente choque térmico possibilita a entrada eficiente do DNA nas células, que então se tornam células transformadas (CHANG, 2017; PANJA et al., 2008). Segundo os mesmos autores, em *Escherichia coli*, a transformação mediada por CaCl_2 e choque térmico envolve adsorção de DNA à superfície celular, formando complexos com cálcio e membrana, e posterior penetração do DNA no citosol.

Embora os mecanismos precisos de incorporação ainda não sejam completamente compreendidos, estudos sugerem que o DNA se liga a moléculas receptoras de lipopolissacarídeo na superfície da célula, e o pulso de calor despolariza a membrana celular, permitindo a passagem do DNA plasmidial (CANDURI, 2022; PANJA et al., 2008). Embora haja avanços recentes, lacunas persistem no entendimento completo do mecanismo de incorporação de DNA, requerendo mais pesquisas para elucidar os eventos bioquímicos envolvidos (CANDURI, 2022; PANJA et al., 2008).

Este trabalho tem como objetivo a aplicação das etapas inerentes a realização das técnicas de indução de competência e transformação via choque térmico no laboratório de Bioengenharia da UTFPR campus Ponta Grossa. O plasmídeo utilizado foi o pUC19, havendo êxito na execução dos experimentos este será responsável por conferir à bactéria resistência ao antibiótico ampicilina e permitir seu crescimento em meio seletivo.

METODOLOGIA

PREPARO DAS CÉLULAS COMPETENTES

O processo de indução de quimiocompetência foi adaptado com base no protocolo disponibilizado por Chang (2017), incluíram-se etapas prévias para reativação de células em estoque descritas nos primeiros dois dias de execução devido à metodologia de armazenamento em freezer aplicada nas culturas. Todas as etapas envolvendo a manipulação direta dos microrganismos e do meio de cultura foram realizadas em fluxo laminar visando um processo livre de contaminações.

No primeiro dia, inoculou-se 10 uL do estoque de *Escherichia coli* linhagem DH5-Alpha em meio sólido LB. A cultura foi mantida na estufa em uma temperatura de 37°C por aproximadamente 12 horas.

Após, no segundo dia, uma única colônia crescida na placa foi selecionada e inoculada em um microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de meio líquido LB, o qual foi incubado no thermomixer a 37°C e 200 rpm durante a noite, aproximadamente 12 horas.

Por fim, no terceiro dia, adicionou-se 1 mL da cultura de *E. coli* crescida no passo anterior a 99 mL de meio líquido LB. Os 100 mL resultantes foram mantidos em shaker a 37°C e 200 rpm por um período de 2 a 4 horas. Durante esse período, a densidade óptica (OD) da cultura foi monitorada a cada hora.

Após atingir a OD600 desejada, transferiu-se todo o volume para microtubos previamente resfriados em gelo, cada um contendo 1,5 mL da cultura. Estes foram incubados no gelo por 20 minutos. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, resultando na separação dos microrganismos e do meio de crescimento, o qual foi cuidadosamente descartado, evitando-se perturbar o pellet de células formado.

Os pellets foram ressuspensos em 400 uL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M gelada e incubados novamente por 30 minutos no gelo. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados novamente a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente.

Por fim, os pellets de microrganismos já quimicamente tratados foram ressuspensos em 100 uL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M contendo 15% de glicerol, o qual ajuda a proteger as células durante o armazenamento em baixas temperaturas. Os microtubos foram então transferidos para um freezer adequado e armazenados a -20°C para uso posterior.

TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

As células competentes foram descongeladas previamente em geladeira por 15 a 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 25 uL das células competentes e 1 uL de DNA plasmidial a um tubo eppendorf esterilizado, homogeneizando a mistura com uma pipeta.

Após essa etapa, a mistura de células competentes e DNA plasmidial foi incubada na cuba de gelo por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi transferido para um banho-maria pré-aquecido a 42°C, onde a incubação ocorreu por 1 minuto.

O tubo foi então retornado à cuba de gelo, sendo mantido por mais 2 minutos. Após, adicionou-se 500 uL de meio de cultivo, sem antibiótico, à solução presente nos tubos eppendorf, realizando uma suave homogeneização.

Os tubos foram incubados no thermomixer a 37°C por 1 hora, sob agitação de 250 rpm. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 16.000 G por 1 minuto. Cuidadosamente, removeu-se 300 uL do sobrenadante, e realizou-se a ressuspensão do pellet. Em seguida, pipetou-se de 50 a 100 uL do conteúdo dos tubos em placas de petri contendo LB + ágar + antibiótico ampicilina.

As placas foram incubadas na estufa a 37°C durante a noite, aproximadamente 12 horas, permitindo o crescimento das células transformadas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os experimentos foram conduzidos conforme os protocolos descritos, com pequenos ajustes realizados de acordo com as condições e protocolos de

armazenamento estabelecidos no laboratório de coleções microbiológicas da UTFPR Ponta Grossa.

A competência é geralmente expressa apenas em uma pequena subpopulação de células, mesmo sob condições aparentemente ideais, destacando a complexidade desse processo (CANDURI, 2022; MARQUES, 2012). A obtenção das células competentes só pode ser comprovada após os eventos de transformação, uma vez que esta etapa envolve o crescimento celular em meio seletivo com antibióticos, e a resistência a este é o resultado da inserção bem-sucedida do plasmídeo. Assim, ao seguir estritamente a metodologia apresentada neste trabalho, verificou-se que a densidade óptica necessária para a obtenção de células competentes varia entre 3 e 4 horas como exposto na tabela 1.

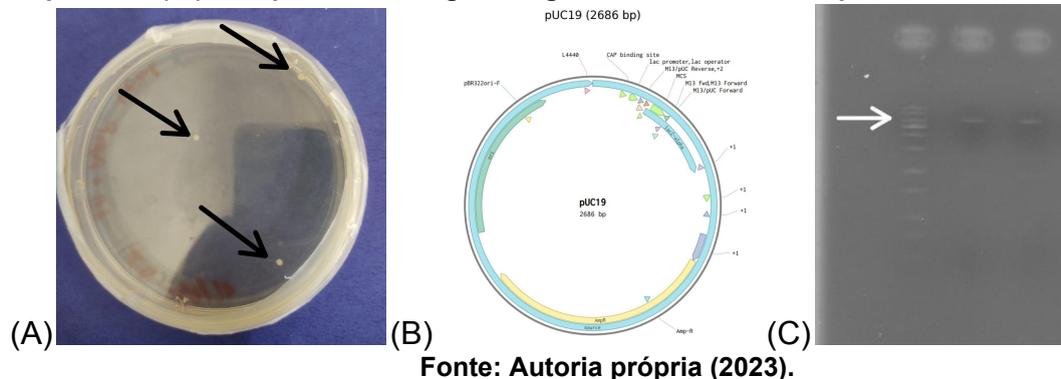
Tabela 1: Leitura de densidades ópticas para obtenção de células competentes utilizando o espectrofotômetro vis 325 - 1000 nm weblaborsp WV-M5

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Leitura em Hora 0	0	0	0
Leitura em Hora 1	0.093	0.075	0.067
Leitura em Hora 2	0.156	0.132	0.135
Leitura em Hora 3	0.398	0.316	0.309
Leitura em Hora 4	0.644	0.605	0.593

Fonte: Autoria própria (2023)

Como resultado da transformação das células competentes, observou-se o sucesso com o crescimento de colônias em meio seletivo para o plasmídeo pUC19. Essa evidência está representada na Imagem 1 (A), onde apenas os transformantes positivos demonstram resistência ao antibiótico ampicilina, resultado da incorporação do plasmídeo, confirmando o desenvolvimento de competência nas células de *E. coli* DH5-alpha e o êxito na etapa de transformação nas condições do laboratório de Bioengenharia da UTFPR Campus PG. Caso a indução de competência ou o processo de transformação não ocorresse de maneira ideal, o plasmídeo não seria incorporado e como consequência não iria conferir resistência ao antibiótico, resultando em uma placa sem crescimento bacteriano.

Imagem 1 - (A) Foto a direita com as colônias de Clones transformados (B) Mapa plasmidial pUC19 e (C) Comprovação em gel de agarose do tamanho do plasmado inserido



Fonte: Autoria própria (2023).

Na Imagem 1 (B) é apresentado o mapa do plasmídeo pUC19, onde verifica-se que este possui um tamanho de 2686 pares de bases. De maneira complementar, a Imagem 1 (C) resulta de uma corrida de gel de agarose realizada com os plasmídeos presentes nas colônias transformadas da imagem 1 (A), esta análise aponta bandas próximas a 3000 pares de bases. A resistência à ampicilina aliada a detecção de um plasmídeo com aproximadamente 3000 pares de bases permite afirmar que o plasmídeo nas colônias transformadas é, de fato, o pUC19, confirmando o sucesso das técnicas empregadas.

Visando pesquisas futuras, foi estabelecido um estoque de células competentes com a capacidade de clonar o plasmídeo pUC19, juntamente com as células portadoras deste plasmídeo. A clonagem e a amplificação dos plasmídeos representam um marco fundamental para a pesquisa em Engenharia Biológica, proporcionando uma base independente e essencial. A construção plasmidial serve como o ponto de partida primordial para a manipulação genética, permitindo a inserção de genes específicos em organismos hospedeiros, como bactérias. Essa capacidade é fundamental para a produção de proteínas recombinantes, a criação de organismos geneticamente modificados e muito mais.

Os avanços alcançados na compreensão da transformação bacteriana e suas técnicas associadas têm desempenhado um papel de destaque na pesquisa biotecnológica e na engenharia genética, abrindo novas perspectivas para a modificação controlada do material genético bacteriano e a aplicação de genes exógenos em diversas áreas. Além disso, a habilidade de clonar plasmídeos como o pUC19 desempenha um papel fundamental na produção de bibliotecas genômicas e na análise funcional de genes, impulsionando ainda mais a compreensão da biologia molecular e as suas aplicações práticas.

CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados demonstram claramente o sucesso da indução de competência e transformação, culminando no crescimento das colônias transformadas em meio com ampicilina devido a aquisição de resistência conferida pelo plasmídeo pUC19. Este estudo contribuiu de forma substancial para o estabelecimento das técnicas e protocolos a serem utilizados no laboratório de Bioengenharia da UTFPR Campus Ponta Grossa, permitindo a aplicação real da tecnologia do DNA recombinante e consequentemente o futuro desenvolvimento de inovações no âmbito da engenharia genética.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica, à Professora Doutora Juliana Vitória M. Bittencourt pela orientação e aos colegas do laboratório pelo apoio constante. Suas contribuições foram essenciais para este trabalho científico.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. DE. BIOTECNOLOGIA: TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO. UNILUS Ensino e Pesquisa, v. 12, n. 26, p. 41–53, 1 abr. 2015.

CANDURI, Fernanda. A transferência de genes entre as bactérias [Boxe Temático]. **O solo: estrutura e composição**, 2022.

CHANG, Angela Y. et al. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **JEMI methods**, v. 1, n. 22-25, 2017.

FRANCISCO, Inaiá Palmiro Bento; DE JESUS, Letícia Firmiano; BORGES, Diones Antônio. Métodos da técnica do DNA recombinante feitos na *Escherichia coli*/Recombinant DNA technique methods made in the *Escherichia coli*. **ID on line. Revista de psicologia**, v. 14, n. 51, p. 467-474, 2020.

MARQUES, Marilis do Valle. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 p.

PANJA, S. et al. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? **Molecular Membrane Biology**, v. 25, n. 5, p. 411–422, ago. 2008.

POTTER, H.; HELLER, R. Transfection by Electroporation. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 121, n. 1, jan. 2018.