



Laboratório de Engenharia Genética: estabelecimento de protocolos

Genetic Engineering Laboratory: protocol establishment

Luciane Xavier Ferreira*, Flavia Regina Oliveira de Barros†, Victor Gabriel de Faria Pastre‡,
Matheus de Almeida Loureiro§

RESUMO

A sociedade necessita de novos produtos e serviços que só são viáveis em larga escala através da tecnologia do DNA recombinante. Com isso, pesquisas de novas tecnologias e bioprodutos são tão importantes para a Universidade, pesquisadores, empresas e sociedade em si. Contudo, necessita-se de uma infraestrutura mínima e protocolos operacionais padrões já validados para permitir o desenvolvimento de tais pesquisa. Em vista disso, esse projeto desenvolveu e validou protocolos para o Laboratório de Biotecnologia Celular e Laboratório de Bioprocessos, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos. Foram estabelecidos os protocolos de criopreservação das cepas de *Escherichia coli* DH5 α , BL21 e DB3. Foram comparados protocolos utilizando glicerol, óleo mineral e ágar stab. Além disso, foi padronizado o protocolo de competência por indução química de solução MgCl₂ - CaCl₂ e CaCl₂ seguido de validação com a transformação das cepas por choque térmico utilizando vetores plasmidiais. Em conjunto, elaborou-se um banco de plasmídeos para uso em produção de DNA recombinante, desta forma oportunizando para a instituição estrutura útil no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM), por intermédio da tecnologia do DNA recombinante.

Palavras-chave: DNA recombinante, transformação, competência, engenharia genética.

ABSTRACT

Society needs new products and services that are only viable on a large scale through recombinant DNA technology. Thus, research on new technologies and bioproducts are so important for the University, scientists, industry and society itself. However, a minimum infrastructure and already validated standard operational protocols are needed to allow the development of such activities. In this manner, this project developed and validated protocols for the Cellular Biotechnology Laboratory and Bioprocess Laboratory, at the Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, Brazil. The cryopreservation protocol for *Escherichia coli* strains DH5 α , BL21 and DB3 was defined by comparing the use of glycerol, mineral oil and stab agar. Moreover, the cellular competency was achieved by chemical induction with MgCl₂ - CaCl₂ and CaCl₂ solutions, which was validated by the transformation of strains by heat shock. Finally, we developed a plasmid bank for use in the production of recombinant DNA providing the institution with a useful structure in the development of genetically modified organisms (GMOs), through recombinant DNA technology.

Keywords: recombinant DNA, transformation, competence, genetic engineering.

1 INTRODUÇÃO

A inserção de um gene exógeno em um vetor trouxe avanços imensuráveis para a sociedade. O primeiro produto derivado da tecnologia do DNA recombinante foi a insulina a partir de *Escherichia coli*, que precisava

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; lucianexferreira@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (Dois Vizinhos); flaviabarros@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; victorpastre@alunos.utfpr.edu.br

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; mloureiro@alunos.utfpr.edu.br



ser extraída e purificada de pâncreas animais. Contudo, trata-se de um processo de baixo rendimento e alto custo (BRISTOW, 1993). O DNA recombinante consiste na inserção de um DNA de interesse em um vetor, podendo ele ser plasmidial. Posteriormente, o DNA recombinante pode ser inserido em qualquer maquinário celular capaz de transcrever e traduzir a sequência, dependendo assim da complexidade da proteína que originará, sendo um dos critérios na escolha do organismo portador do DNA recombinante (BLUCHER, 2020). O organismo mais amigável para tal finalidade é a *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa em formato de bacilo flagelada, microrganismo importante para biotecnologia e engenharia genética. A *E. coli* tem um amplo repertório de literatura, desde cultivo até produção de organismos geneticamente modificados (OGM) (ROSANO; CECCARELLI, 2014; PONTRELLI et al., 2018; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019).

Desde a produção de fármacos, biocombustíveis e biologia sintética, a *E. coli* fez-se presente (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; CORRÊA et al., 2019). Através da tecnologia do DNA recombinante, ferramentas de engenharia genética e técnicas de biotecnologia são produzidos medicamentos, reagentes, testes diagnósticos, fibras, polímeros, fermentados, entre outros (BLUCHER, 2020). Desta forma, a *E. coli* pode ser considerada essencial para o abastecimento do mercado de produtos oriundos da tecnologia do DNA recombinante por conta da sua alta demanda. Em vista disso, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas na produção de OGM, conseqüentemente em DNA recombinante.

Na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, tem-se consolidado grupos de pesquisa em biotecnologia, por conta do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pós-graduação em Biotecnologia e especialização em Biologia Molecular, em conjunto com as equipes do Laboratório de Biotecnologia Celular (LACEL) e Laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol). Assim, percebeu-se a necessidade do estabelecimento de protocolos eficientes e simples para o desenvolvimento destas tecnologias.

Todavia, para se produzir um bioproduto a partir do DNA recombinante precisa-se primeiro um estudo de bioinformática para se dirigir um ensaio *in silico*. Em escala *in vitro*, necessita-se ter em laboratório cepas criopreservadas e protocolos eficientes de crescimento para iniciar os estudos. Ademais, para que se tenha um OGM precisa ter uma transformação ou transfecção na célula hospedeira, sendo transformação para procariotos e transfecção para eucariotos (RESENDE, 2015). Considerando *E. coli*, para dispor de uma transformação a cepa em uso tem que estar em estado de competência, uma condição em que a parede celular das bactérias se torna mais suscetível a permitir a entrada de sequências de DNA (CALVETE, 2015; CORRÊA et al., 2019).

A fim de produzir um DNA recombinante é obrigatório a escolha de um vetor, e dependendo do tamanho do gene de interesse e qual organismo será modificado o vetor poderá mudar. Dentro os principais vetores moleculares podemos citar o plasmídeo, sequências de bacteriófagos, cosmídeo, *bacterial artificial chromossome* (BAC) e *yeast artificial chromossome* (YAC). O vetor plasmidial é o mais utilizado por conta da sua versatilidade de uso e potencial de modificações, podendo ser elaborada uma rede de genes e interações moleculares, baseando-se em uma engenharia de vetor. Entretanto, com limitação ao tamanho do gene a ser inserido (NORA et al., 2019). Destarte, a implementação de um banco de plasmídeos em um laboratório que produz DNA recombinante é fundamental para maximizar a geração de tecnologias e produtos.

Contendo cepas competentes e um DNA recombinante, este pode-se ser transformado, ou transfectado a célula, originando assim o OGM. Para transformação em bactérias *E. coli* o método mais utilizado é o por choque térmico, um método físico, mas em outras células podem ser usados outros métodos físicos, como eletroporação ou microinjeção, e químicos com lipossomos (OBATA et al., 2009; RESENDE, 2015). Subseqüentemente, precisam ser isoladas as células contendo o DNA exógeno das que não conseguiram, para isso pode ser usados métodos químicos e/ou colorimétricos. Para bactérias o mais utilizado é a seleção com



antibióticos, pois geralmente os vetores já contêm em sua sequência genes de resistência a antibiótico (RESENDE, 2015). Todavia, precisa se atentar se o microrganismo já apresenta resistência a algum antibiótico.

Desde a definição do que será pesquisado até a obtenção de um OGM é necessário passar pelos passos descritos. Em vista disso, o presente projeto propôs o estabelecimento de procedimentos operacionais padrão (POP) para produção de OGM, bem como a estruturação de um banco de cepas de *E. coli* competentes e plasmídeos de interesse do laboratório para as atividades de engenharia genética.

2 MÉTODOS

Entre as cepas de *Escherichia coli* de frequente uso e relato na literatura foram definidas três. A DH5 α , BL21(DE3) e DB3.1. O meio de crescimento utilizado é o Luria Bertani (LB), composto por 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de cloreto de sódio para 1 litro de água. Para obter o meio LB sólido foram adicionados 20 g de ágar. As condições de cultivo foram de 37°C e 130 rpm, em *Shaker*, no caso de meio líquido. A fim de criopreservar as cepas foram testados os seguintes métodos: glicerol (10, 20 e 30%; v/v em meio LB), óleo mineral e ágar stab. Na criopreservação em glicerol foi utilizada uma cultura líquida das cepas que cresceram *overnight* e adicionado o glicerol nas proporções de 10, 20 e 30%, totalizando 1 mL em um criotubo. O método de óleo mineral foi aplicado em um microtubo contendo meio LB sólido com cultura e adicionado uma camada de óleo mineral estéril até cobrir toda a cultura, podendo permanecer a temperatura ambiente. Por último, o ágar stab consistiu em um microtubo com meio LB sólido onde foi inserida a cultura por meio alça de platina até a metade do tubo, para a cultura permanecer no interior do meio de cultivo e mantido a 4°C. Após 15 dias da criopreservação as culturas foram retiradas do meio crioprotetor e colocadas para crescer em meio LB líquido a 37°C e 130 rpm. A fim de avaliar a melhor taxa de crescimento foi utilizado um espectrofotômetro no comprimento de 660 nm e analisada a absorbância, usando como branco o meio LB sem cultura. Os dados obtidos de absorbância foram analisados por regressão linear para comparação da inclinação das curvas de crescimento (GraphPad Prism). Para comparação entre os grupos e verificação do efeito de protocolo, tempo e interação, foi utilizada ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey com 5% de nível de significância.

Uma vez estabelecido o protocolo para criopreservação das cepas, foi estabelecido um protocolo de indução de competência para *Escherichia coli*, de acordo com a infraestrutura disposta. Das culturas criopreservadas foram utilizadas em torno de 1 μ L para crescer em 5 mL de meio LB, *overnight* a 37°C e 130 rpm. No mesmo tubo, foram adicionados 500 μ L de meio LB e que foram incubados por 3 horas nas mesmas condições, para o crescimento atingir sua fase exponencial. A cultura final foi colocada em gelo e incubada por 10 minutos, e posteriormente transferida para um tubo Falcon de 15 mL já gelado. O tubo foi centrifugado a 2700 x g por 10 minutos em uma centrífuga de tubo Falcon. Com a formação do *pellet* descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado com 1,6 mL da solução de MgCl₂ (170 mM) - CaCl₂ (27 mM), previamente gelada. Após nova incubação por 30 minutos no gelo, o tubo foi centrifugado a 2700 x g por 10 minutos. Removendo o sobrenadante novamente, o *pellet* foi ressuscitado em 1,6 mL de CaCl₂ (100mM) gelado e incubado no gelo por 20 minutos. Por fim, adicionou-se 0,5 mL de glicerol (80%) e foram preparadas alíquotas de bactérias competentes de 100 μ L em criotubos que foram armazenados em -20°C.

Para avaliar o protocolo de competência, estabeleceu-se o protocolo de transformação. Para isso utilizou-se o plasmídeo pX330 que contém o gene *Amp*, de resistência a ampicilina. Para tal, a alíquota de bactérias competentes foi colocada no gelo para descongelar à qual foram adicionados 2 μ L do plasmídeo, sendo incubados por 30 minutos no gelo. Em seguida, o choque térmico foi realizado por 60 segundos em um banho-maria a 42°C. As células foram novamente incubadas no gelo por 5 minutos. Foram adicionados 900 μ L de



meio LB líquido e as células incubadas em *Shaker*, por 2 horas a 37°C e 130 rpm. Com finalidade de selecionar as bactérias transformadas, 200 µL da cultura foram colocadas em placas de Petri com meio LB com e sem ampicilina (200µg/L), sendo incubadas a 37°C em estufa *overnight*.

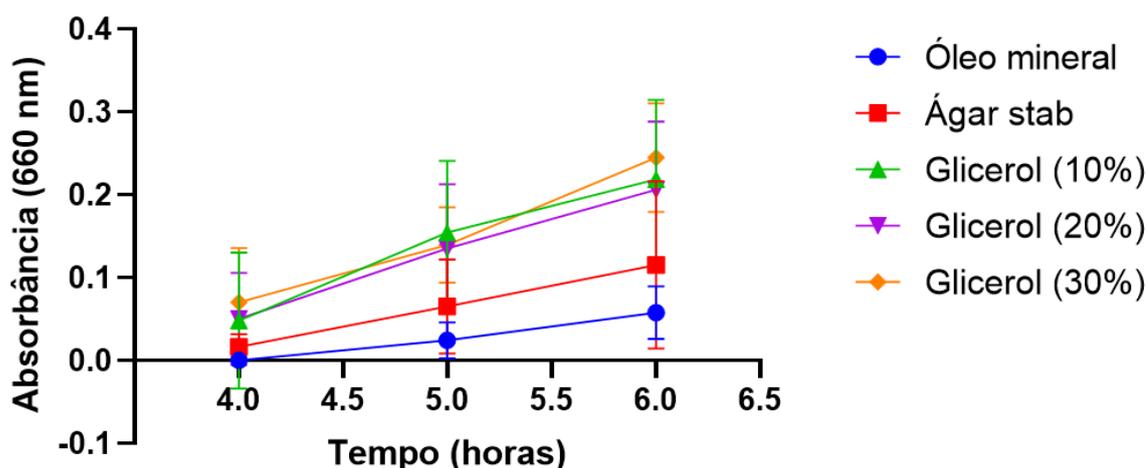
Obtendo-se colônias transformadas, que cresceram no meio com ampicilina, executou-se o mesmo protocolo de transformação com a cepas DH5α para os plasmídeos: pUC19, pGL3-*Basic*, pCS2+ e pBT. Assim, montando um banco de plasmídeos em DH5α podendo ser purificados por kits de purificação de plasmídeos, como o *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega, EUA).

Os procedimentos aqui mencionados foram executados no Laboratório de Biotecnologia Celular e Laboratório de Bioprocessos, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de regressão linear demonstrou diferença significativa na inclinação das curvas de crescimento bacteriano após descongelamento de amostras criopreservadas ($p=0,0096$; Figura 1). Foi observado efeito de protocolo de criopreservação ($p=0,0011$) e efeito de tempo de crescimento ($p<0,0001$), mas não de interação entre as variáveis independentes ($p=0,8464$). No pós-teste de Tukey observou-se que, o glicerol, em todas as concentrações utilizadas, teve diferença significativa comparado ao óleo mineral ($p < 0,05$), como também o glicerol de 10 e 30% com o ágar stab ($p=0,0425$ e $p=0,0129$, respectivamente). Ademais, plotou-se o Gráfico 1, com os desvios-padrões de cada método, e visualmente constou-se o que foi demonstrado pelo pós-teste Tukey. Portanto, o uso do glicerol ofereceu os melhores resultados, sendo assim, utilizado para criopreservar as cepas DH5α, BL21(DE3) e DB3.1. Tal evidência se dá pelo fato do glicerol ser um excelente inibidor de formação de cristais de gelo no interior das células, uma vez que reduz sua concentração, assim, não rompendo a parede celular da bactéria com a redução da temperatura (DALCIN, L; LUCCI, 2010).

Gráfico 1 – Turbidez da cultura de *E. coli* versus os tipos de criopreservação.



Fonte: autoria própria (2021).

O protocolo de competência foi eficiente, mesmo sofrendo adaptações com a literatura, pois o laboratório em uso não tinha centrifuga de tubo Falcon refrigerada. Mesmo assim, foram obtidas cepas transformadas pelos métodos aqui listados. Na figura 2 observamos uma placa de Petri com ampicilina onde



pode se observar uma alta quantidade de colônias de DH5 α que se transformaram e expressaram o plasmídeo pX330, consequentemente apresentando resistência à ampicilina.

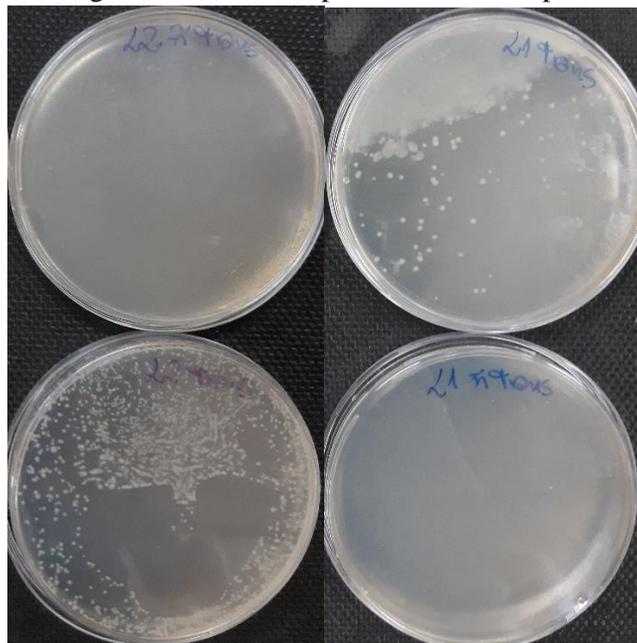
Figura 1 – DH5 α resistente a ampicilina.



Fonte: autoria própria (2021).

Ademais, foi avaliado também se as cepas em estudo já não continham resistência a ampicilina, assim as bactérias competentes foram repicadas em placas de Petri com ampicilina sem passar pelo processo de transformação. Como evidenciado na figura 3, a cepa DH5 α indicada como L2 (esquerda) e a cepa BL21(DE3) como L1 (direita) cresceram na placa com ampicilina apenas as transformadas, indicado com “trans”, e as que não são transformadas estão indicadas por “ñ trans”.

Figura 2 – *E. coli* em placa contendo ampicilina.



Fonte: autoria própria (2021).



Baseado nisso, o laboratório já conta com cepas competentes e um banco de plasmídeos listados, estando em desenvolvimento a manipulação dos mais seguintes plasmídeos: pDonor, PB-CAG cddb, PB-Rfa, pGL3-Control, PB-RN (PB-rtTA-*neomycin*).

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizado o estabelecimento de protocolos indispensáveis para clonagem molecular, oportunizando para o grupo de pesquisa o desenvolvimento de novas tecnologias que faz uso de DNA recombinante, assim sendo, uma base laboratorial consolidada e validada para aqueles que querer explorar ao máximo esta tecnologia com protocolos simples.

AGRADECIMENTOS

A Gene de Yebá, uma startup de biotecnologia, que atua na produção de proteínas recombinantes. A Incubadora de Inovações da UTFPR, campus Dois Vizinhos, que é incubadora da Gene de Yebá. A Fundação Araucária que subsidiou o trabalho através da Chamada Pública 14/2019 cedido a empresa Gene de Yebá.

REFERÊNCIAS

- BLUCHER. **Biotecnologia industrial, v. 1 : fundamentos**. Disponível em: Minha Biblioteca da UTFPR.
- BRISTOW, A. F. Recombinant-DNA-derived insulin analogues as potentially useful therapeutic agents. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 7, p. 301–305, 1993.
- CALVETE, C. L. BIOTECNOLOGIA: TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODO DE CHOQUE TÉRMICO. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, 2015.
- CORRÊA, J. A. F. et al. Estabelecimento de sistema bacteriano de expressão de peptídeos derivados da enzima vegetal RuBisCO. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–11, 2019.
- DALCIN, L; LUCCI, C. Criopreservação de embriões de animais de produção : princípios criobiológicos e estado atual. **Rev. bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 149–159, 2010. Disponível em: <<http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/406.pdf>>.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>>.
- NORA, L. C. et al. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 125–147, 2019.
- OBATA, Y. et al. Plasmid DNA-encapsulating liposomes: Effect of a spacer between the cationic head group and hydrophobic moieties of the lipids on gene expression efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 5, p. 1148–1158, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.02.014>>.
- PONTRELLI, S. et al. Escherichia coli as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 50, n. April, p. 16–46, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>>.
- RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. [s.l.: s.n.]
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, 2019.