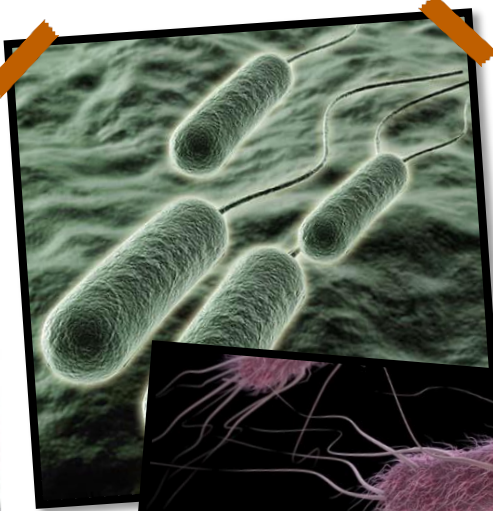


Engenharia Genética

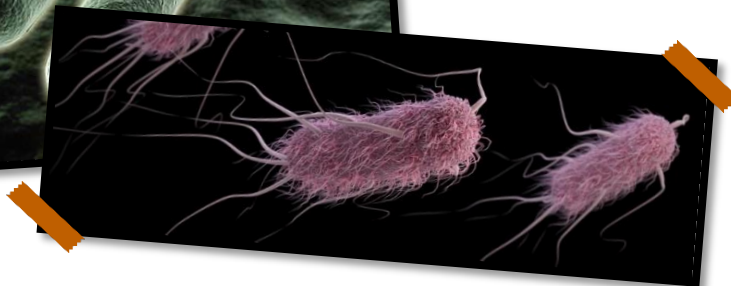
TP1 - Introdução de Plasmídeos em Bactérias por Conjugação Triparental e Eletrotransformação



Joana Pinto | 78358

Rafaela Saraiva | 79613

Luís Rita | 78680



Índice

Resumo.....	3
Resultados.....	6
Tratamento de Resultados.....	10
Discussão de Resultados	14
Bibliografia	17

Resumo

- *Sphingomonas elodea*;
- *Pseudomonas aeruginosa*.

De uma forma sucinta, o objetivo principal deste trabalho prático foi a introdução de plasmídeos nestas duas bactérias referidas inicialmente. Legitimamente, poder-se-á questionar a importância disto para a Engenharia Genética ou, de uma forma mais abrangente para o ser humano. A resposta é simples, este tipo de manipulações laboratoriais possibilitam: a clonagem de genes; a introdução de determinadas características na espécie alvo; a construção de bancos genómicos... Regressando uma vez mais ao tema do trabalho, foram utilizadas duas técnicas distintas para a introdução de diferentes vetores em *S. elodea* e *P. aeruginosa*. No primeiro caso, o objetivo foi reestabelecer à bactéria a capacidade de produção de gelano, através de uma técnica denominada Eletrotransformação - e de seguida, recorrendo a uma técnica um pouco mais elaborada (Conjugação Triparental), tentou-se devolver à *P. aeruginosa* a capacidade de produção de alginato.

O gelano e o alginato são dois polissacáridos com uma grande utilidade industrial, nomeadamente, na produção de compostos alimentares.

ELETROTRANSFORMAÇÃO

A Eletrotransformação é um método físico de introdução de DNA em células e requiere de uma fase de preparação das mesmas, a partir duma colónia da estirpe SpLM21-4 ($\Delta gelE$), cujas células estejam em fase de crescimento exponencial, que não foi efetuada na aula, sendo a cultura previamente preparada e conservada a -80°C foram, então, descongeladas lentamente, adicionando-se-lhes soluções dos plasmídeos pBBR1MCS (vetor controlo – não contém o gene de interesse) e pHA010-3 (vetor onde se encontra localizado o *gelE* de *S. elodea*). Colocou-se a *cuvette* na câmara de Eletrotransformação, submetendo-se a uma corrente elétrica com voltagem de 2,5kV e 400 Ω , com fim à criação de poros na membrana plasmática, pelos quais o DNA possa entrar (a *cuvette* deverá estar a uma temperatura a rondar os -20°C de forma a garantir que a alta tensão a que é submetida não a aqueça excessivamente e a danifique, bem como, as bactérias aí presentes); após submetida àquele pulso elétrico, a *cuvette* é retirada e adiciona-se-lhe, de imediato, 1mL de meio LB, promovendo a recuperação celular, e leva-se a incubar com agitação, a 30°C horas, período no qual há crescimento das células de uma geração. Este último passo é especialmente importante pois permitirá que as células expressem o gene e produzam as proteínas que conferirão a resistência ao antibiótico – Cloranfenicol. Após estes passos, fizeram-se sucessivas diluições em solução salina, para que não ocorresse lise celular e plaquearam-se 2+3 (duas em meio S com

Cloranfenicol e três, apenas em meio S) suspensões, para que se possa determinar, após 3 dias, o nº de células viáveis totais, o nº de transformantes e a existência, ou não, do fenótipo mucoso nas colónias obtidas. Neste último passo foi importante a utilização de meio S, uma vez que a *S. elodea* não consegue produzir gelano em meio LB.

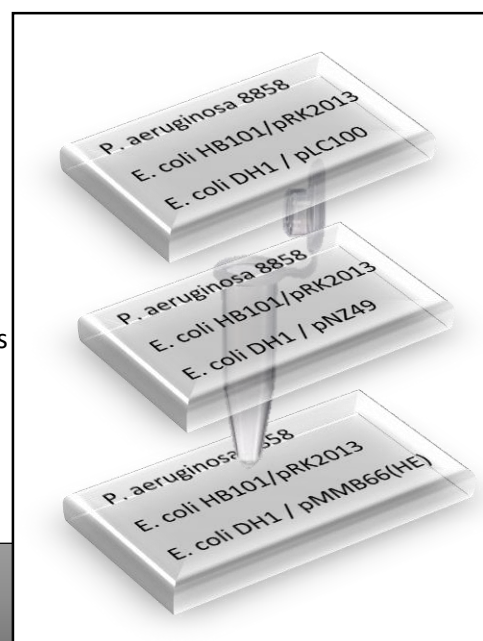
Assim sendo, obtiveram-se para as frequências de Eletrotransformação os valores: 6.512×10^{-5} , correspondente ao plasmídeo pBBR1MCS e 3.65×10^{-4} para o pHA010-3. Respetivamente, calculou-se a eficiência da técnica para os mesmos dois plasmídeos anteriores: 8474.8 UFC/ml/ μ g e 15847.7 UFC/ml/ μ g.

Conclui-se que apesar de uma fração muito baixa das células adquirir qualquer um dos plasmídeos anteriores, este é um método a considerar, sempre que possível, devido ao seu baixo custo e facilidade/rapidez de execução.

CONJUGAÇÃO TRIPARENTAL

Relativamente à técnica de transferência de DNA recombinado por Conjugação Triparental, requer-se o contacto físico entre células dadoras (*E. coli*) e recetoras (*P. aeruginosa*) e recorre-se a uma bactéria “ajudante” com o plasmídeo pRK2013 que, por ser conjugativo, vai mediar a transferência de plasmídeos mobilizáveis por conjugação, dado que os plasmídeos pMMB66(HE) (vetor), pLC100 (gene *pgmG*) e pNZ49 (gene *algC*) não são autotransmissíveis, não conseguindo formar o tubo de conjugação, pois não apresentam genes (*tra*). A vantagem da escolha do plasmídeo pRK2013, prende-se ao facto de ser de estrita gama de hospedeiros e consequentemente, diminuir o risco da transmissão desta característica (formação *pilus* de conjugação) para bactérias indesejadas. Assim, a *E. coli* HB101 será a terceira estípe do processo de acasalamento, colocada em conjunto com as células dadora e recetora, sobre um filtro que retém bactérias. Ao longo do procedimento experimental, e após uma noite de incubação em meio LB, a 37°C, com agitação e antibióticos aos quais cada uma das bactérias com os respetivos plasmídeos apresenta resistência, procedeu-se à formação de 3 culturas (Fig. 1) de modo a poder-se iniciar o processo de mobilização dos plasmídeos para dentro de células de *P. aeruginosa*. Como forma de eliminação de eventuais vestígios de antibióticos, recorreu-se a uma ressuspensão em solução salina. Por fim, também se procedeu a sucessivas diluições e a plaqueamento de 2+3 suspensões, em placas de Petri, contendo meio PIA, com

Fig. I – Introdução de 3 misturas em 3 *ependorfs* distintos.



Carbenicilina e sem o antibiótico, respetivamente (isto para se conseguir distinguir o nº de colónias de *P. aeruginosa* com e sem os plasmídeos referidos anteriormente). Dado que neste meio apenas a estirpe recetora (*P. aeruginosa*) sobrevive, incubando-se a 30°C, poder-se-á determinar, após 3 dias, o nº de células viáveis totais, a existência, ou não, do fenótipo mucoso nas colónias obtidas, e o nº de transconjugantes. Tornando possível o cálculo da frequência de conjugação.

Em suma, pretender-se-á verificar a existência de uma complementação homóloga (introdução do gene *gelE* na bactéria), bem como de uma heteróloga, onde é adicionado um gene diferente do presente na estirpe selvagem da bactéria (gene *pgmG*).

Obteve-se como frequência de conjugação os valores: 4.97×10^{-4} , correspondente ao plasmídeo pMMB66(HE), 9.09×10^{-5} para o pLC100 e, finalmente, 1.31×10^{-3} para o pNZ49. Apesar da baixa eficiência, comprova-se assim, a eficácia do método.

Pode-se também concluir, que a introdução de ambos os genes (*algC* e *pgmG*) por complementação homóloga e heteróloga, respetivamente, foi bem-sucedida.

Resultados

a) Eletrotransformação

Observação e Registo do Fenótipo Mucoso (ou não) das Colónias de Transformantes para cada um dos Plasmídeos

Nesta parte do trabalho laboratorial foi introduzido em células de *S. elodea* ΔgeE o vetor de clonagem pBBR1MCS e o plasmídeo recombinado pHA010-3. O primeiro, vetor vazio, foi introduzido nas bactérias como controlo e o gene *geE* foi inserido no plasmídeo pHA010-3. O principal objetivo nesta parte foi verificar se a produção de gelano está dependente da presença deste gene.

De seguida serão apresentados registos fotográficos dos resultados laboratoriais obtidos, para que se possam retirar algumas conclusões acerca do fenótipo apresentado (mucoso ou não mucoso).



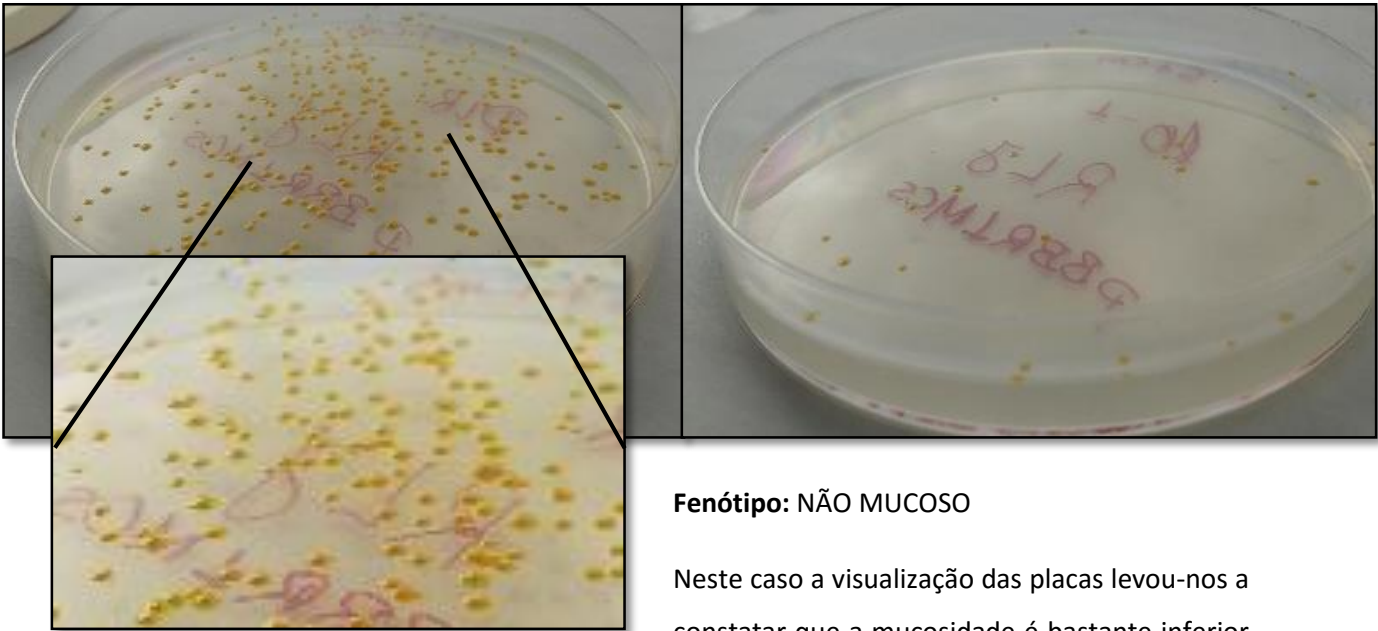
Figura 1- Colónias formadas após Eletrotransformação com o plasmídeo pHA010-3.

Fenótipo: MUCOSO

Através da visualização das placas anteriores verifica-se que a aparência das colónias obtidas é mucosa/brilhante, pelo que o seu

fenótipo é mucoso. Estes aglomerados de bactérias constituem todas as células que ao serem sujeitas a meio S com Cm (Cloranfenicol), após Eletrotransformação, sobreviveram.

Figura 2 - Colónias formadas após Eletrotransformação com o plasmídeo pBBR1MCS.



Fenótipo: NÃO MUCOSO

Neste caso a visualização das placas levou-nos a constatar que a mucosidade é bastante inferior

à que se observou no caso anterior, pelo que o fenótipo não é mucoso. Tal como seria de esperar, agora, as colónias são bem mais pequenas que as anteriores (vetor vazio não contém gene de resistência ao antibiótico presente no meio - Cm). De forma idêntica para o plasmídeo anterior, foi adicionado ao meio S, o antibiótico Cloranfenicol.

Observações: Apesar de através dos registos fotográficos a visualização da mucosidade dos eletrotransformantes não ser evidente, no laboratório foi fácil de constatar a diferença de mucosidade entre as colónias obtidas para os diferentes plasmídeos.

Contagem do nº de Colónias Formadas

Plasmídeo	Meio S + Cm		Meio S			Diluição
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
pBBR1MCS	283	31	316	45	6	←
pHA010-3	622	53	226	9	0	

Tabela 1 - Número de colónias obtidas em cada placa de *Petri*.

b) Conjugação Triparental

Observação e registo do fenótipo mucoso (ou não) das colónias de transconjugantes para cada um dos plasmídeos

Na conjugação triparental foi utilizada a estirpe *P. aeruginosa* 8859 (algC⁻) com o objetivo de se observar a complementação homóloga ou heteróloga da mutação que as células desta estirpe possuem no gene algC. Estas complementações (homóloga ou heteróloga) podem ser visualizadas com base na reposição do fenótipo mucoso.

Seguidamente, serão apresentadas fotografias correspondentes às 3 situações distintas. Em todas elas recorreu-se a meio PIA, com Carbenicilina para selecionar os transformantes e posteriormente, efetuar os cálculos da frequência de conjugação para cada plasmídeo.

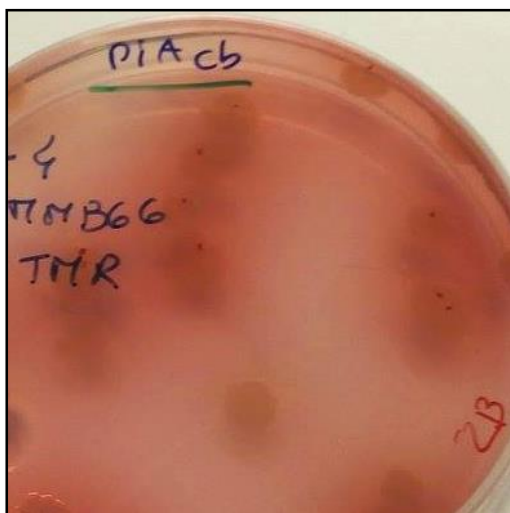


Figura 3 - Colónias formadas após manipulação com o vetor vazio pMMB66(HE).

Fenótipo: NÃO MUCOSO

Pela observação da figura contata-se que o fenótipo é não mucoso pois as colónias não apresentam brilho e aparentam ter menor espessura.

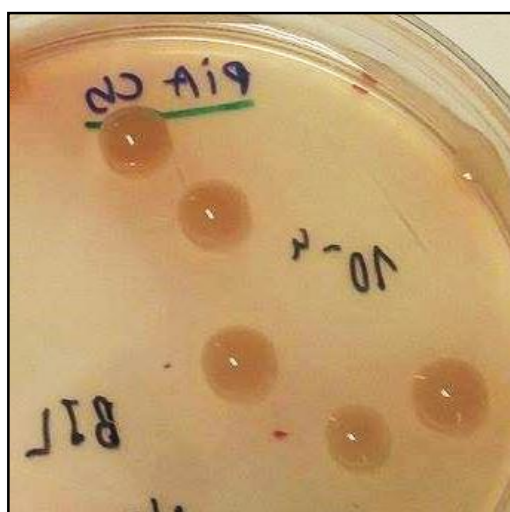


Figura 4 - Colónias formadas após manipulação com o vetor pNZ49. [Gene algC homólogo]

Fenótipo: MUCOSO

Neste caso observa-se que as colónias possuem bastante brilho e têm uma aparência mucosa.

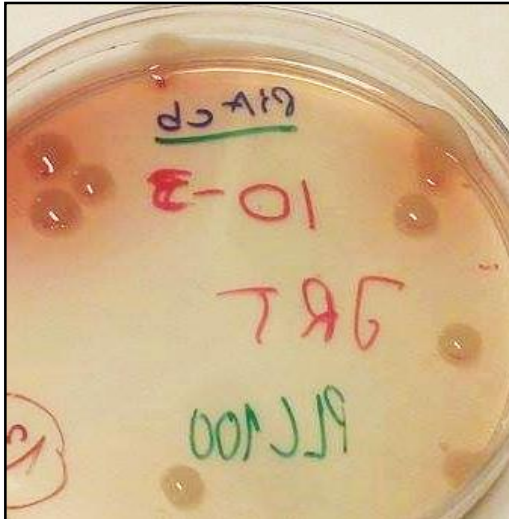


Figura 5 - Colónias formadas após manipulação com o vetor pLC100. [Gene pmgG]

Fenótipo: MUCOSO

Tal como na figura anterior, as colónias também têm o aspeto caraterístico do fenótipo mucoso.

Contagem do nº de Colónias Formadas

Plasmídeo	PIA + Carbenicilina		PIA			Diluição
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
pMMB66(HE)	22	4	302	134	21	←
pLC100	13	0	Nº Elevado	106	18	
pNZ49	81	9	Nº Elevado	81	5	

Tabela 2 - Número de colónias obtidas em cada placa de *Petri*.

Tratamento de Resultados

a) Eletrotransformação

Após ter sido efetuada a contagem das colónias e anotada na Tabela 1, resta calcular a eficiência e a frequência de Eletrotransformação para cada um dos plasmídeos que são dados, respetivamente, pelas fórmulas:

$$\text{Freq. Eletrotransformação} = \frac{\text{nº de transformantes}}{\text{nº de células viáveis após eletrotransformação}} \quad (1)$$

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{nº de transformantes}}{\mu\text{g de DNA}} \quad (2)$$

Assim sendo, para se poder efetuar o cálculo da frequência de Eletrotransformação terá que se conhecer não só o nº de transformantes, bem como o número de células viáveis, que são dados, respetivamente, pelo valor médio de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) em cultura no meio S + Cm (Cloranfenicol) e no meio S.

Plasmídeo pBBR1MCS

	Meio S + Cm		Meio S		
Diluição	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Nº Colónias	283	31	316	45	6
UFC/ml (Suspensão Diluída)	2830	310	3160	450	60
UFC/ml (Cultura)	2.83x10 ³	3.10x10 ³	3.16x10 ⁷	4.5x10 ⁷	6.0x10 ⁷
Valor Médio	2.965x10 ³		4.553x10 ⁷		

Tabela 3 – Nº de colónias e de UFC/ml na suspensão diluída e na cultura, com vista à obtenção dos valores médios para o plasmídeo pBBR1MCS.

Conhecidos os valores médios, prossegue-se para o cálculo da frequência de Eletrotransformação e da eficiência:

$$\text{Freq. Eletrotransformação} = \frac{2.965 \times 10^3}{4.553 \times 10^7} = 6.512 \times 10^{-5}$$

Para além do nº de transformantes = 2.965x10³, a eficiência também depende da massa de DNA (valor em µg). Este último dado pode ser obtido através da relação entre a concentração dos plasmídeos em solução e o volume extraído.

$$[\text{pBBR1MCS}] = 71.4 \text{ ng}/\mu\text{l} = 7.14 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Volume = 4.9 µl

$$\text{Eficiência} = \frac{2.965 \times 10^3}{4.9 \times 7.14 \times 10^{-2}} = \frac{2.965 \times 10^3 \text{ UFC/ml}}{0.34986 \mu\text{g}} = 8474.8 \text{ UFC/ml/} \mu\text{g}$$

Plasmídeo pHA010-3

	Meio S + Cm		Meio S		
Diluição	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Nº Colónias	622	53	226	9	0
UFC/ml (Suspensão Diluída)	6220	530	2260	90	--
UFC/ml (Cultura)	6.22x10 ³	5.30x10 ³	2.26x10 ⁷	9.0x10 ⁶	--
Valor Médio	5.76x10 ³		1.58x10 ⁷		

Tabela 4 – Nº de colónias e de UFC/ml na suspensão diluída e na cultura, com vista à obtenção dos valores médios para o plasmídeo pHA010-3.

Efetuando os cálculos como anteriormente:

$$\text{Freq. Eletrotransformação} = \frac{5.76 \times 10^3}{1.58 \times 10^7} = 3.65 \times 10^{-4}$$

$$[\text{pHA010-3}] = 106.9 \text{ ng/} \mu\text{l} = 0.1069 \mu\text{g/} \mu\text{l}$$

Volume = 3.4 µl

$$\text{Eficiência} = \frac{5.76 \times 10^3}{3.4 \times 0.1069} = \frac{5.76 \times 10^3 \text{ UFC/ml}}{0.36346 \mu\text{g}} = 15847.7 \text{ UFC/ml/} \mu\text{g}$$

b) Conjugação Triparental

Na tabela 2 estão presentes o número de colónias obtidas e pretende-se calcular a frequência de conjugação que é dada pela fórmula (3).

$$\text{Freq. Conjugação} = \frac{\text{nº de transconjugantes}}{\text{nº de células viáveis após conjugação}} \quad (3)$$

O número de transconjugantes é dado pelo valor médio das UFC's por ml na cultura no meio Pia + Carbenicilina e o número de células viáveis dado pelo valor médio das UFC's por ml na cultura do meio PIA.

Nas tabelas seguintes encontram-se expostas essas mesmas informações para cada um dos plasmídeos.

Plasmídeo pMMB66(HE)

Diluição	Meio PIA + Carbenicilina		Meio PIA		
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Nº Colónias	22	4	302	134	21
UFC/ml (Suspensão Diluída)	220	40	3020	1340	210
UFC/ml (Cultura)	2.20x10 ⁵	4.0x10 ⁵	3.02x10 ⁸	1.34x10 ⁹	2.10x10 ⁹
Valor Médio	6.20x10 ⁵		1.247x10 ⁹		

Tabela 5 - Valores de colónias e de UFC/ml na suspensão diluída e na cultura, com vista à obtenção dos valores médios para o plasmídeo pMMB66(HE).

$$\text{Freq. Conjugação} = \frac{\text{nº de transconjugantes}}{\text{nº de células viáveis após conjugação}} = \frac{6.20 \times 10^5}{1.247 \times 10^9} = 4.97 \times 10^{-4}$$

Plasmídeo pLC100

	Meio PIA + Carbenicilina		Meio PIA		
Diluição	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Nº Colónias	13	0	Nº Elevado	106	18
UFC/ml (Suspensão Diluída)	130	--	--	1060	180
UFC/ml (Cultura)	1.30x10 ⁵	--	--	1.06x10 ⁹	1.80x10 ⁹
Valor Médio	1.30x10 ⁵		1.43x10 ⁹		

Tabela 6 – Nº de colónias e de UFC/ml na suspensão diluída e na cultura, com vista à obtenção dos valores médios para o plasmídeo pLC100.

$$\text{Freq. Conjugação} = \frac{\text{nº de transconjugantes}}{\text{nº de células viáveis após conjugação}} = \frac{1.30 \times 10^5}{1.43 \times 10^9} = 9.09 \times 10^{-5}$$

Plasmídeo pNZ49

	Meio PIA + Carbenicilina		Meio PIA		
Diluição	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Nº Colónias	81	9	Nº Elevado	81	5
UFC/ml (Suspensão Diluída)	810	90	--	810	50
UFC/ml (Cultura)	8.10x10 ⁵	9.0x10 ⁵	--	8.10x10 ⁸	5.0x10 ⁸
Valor Médio	8.55x10 ⁵		6.55x10 ⁸		

Tabela 7 – Nº de colónias e de UFC/ml na suspensão diluída e na cultura, com vista à obtenção dos valores médios para o plasmídeo pNZ49.

$$\text{Freq. Conjugação} = \frac{\text{nº de transconjugantes}}{\text{nº de células viáveis após conjugação}} = \frac{8.55 \times 10^5}{6.55 \times 10^8} = 1.31 \times 10^{-3}$$

Discussão de Resultados

a) Eletrotransformação

De acordo com o número de colónias obtido em cada placa de *Petri*, nos meios S + Cm e S, verifica-se a coerência dos valores contabilizados - existe uma taxa de crescimento e replicação das bactérias esperada, à exceção do meio S para o plasmídeo recombinante pHA010-3. De facto, generalizando, para diluições sucessivamente mais elevadas (10x) resultam 10x menos colónias obtidas.

Verifica-se a existência de fenótipo mucoso nas colónias de transformantes onde foi inserido o plasmídeo recombinante **pHA010-3**, que contém o gene *gelE*, pelo que se conclui que existe gelano. Relativamente às colónias onde foi inserido o plasmídeo **pBBR1MCS**, não se observa esse fenótipo, o que significa que não há produção de gelano, vindo confirmar o que era esperado, pois o vetor vazio foi introduzido na bactéria como controlo e expectava-se, precisamente, que os eletrotransformantes não apresentassem mucosidade. Estes factos levam a que se possa inferir que a presença do gene *gelE* é essencial para a produção de gelano na *Sphingomonas elodea*. Em particular, o gene *gelE* codifica uma enzima essencial que regula a atividade proteica (uma tirosina cinase, importante na extensão final do gelano e no seu transporte para fora da célula).

O vetor vazio foi introduzido na bactéria como controlo pelo que se esperava que os eletrotransformantes não apresentassem fenótipo mucoso, o que de facto se verificou.

Comparando os valores da frequência de Eletrotransformação em ambos os plasmídeos, observa-se uma semelhança nos mesmos, 6.512×10^{-5} (pBBR1MCS) e 3.65×10^{-4} (pHA010-3), sendo que, contudo, se observa que o valor da frequência é cerca de 5.6x maior no plasmídeo pHA010-3.

Devido à dependência de certos fatores físicos, este método pode ser concluído com maior ou menor sucesso, sendo que todos os parâmetros de interesse devem ser ajustados ao organismo em particular no qual o mesmo se aplica (por exemplo, a tensão elétrica a aplicar). É de salientar a importância da topologia do DNA, sendo favorável que os fragmentos a inserir sejam o mais pequenos e enrolados possível, dado que conseguem mais facilmente trespassar os poros da membrana - no entanto, verifica-se, através da determinação indireta da eficiência, na secção de Tratamento de Resultados, que o processo de eletrotransformação foi mais

eficiente no plasmídeo **pHA010-3** (15847.7 UFC/ml/ μg) do que no plasmídeo **pBBR1MCS** (8474.8 UFC/ml/ μg), ao invés do que seria expectável, uma vez que o valor da eficiência deveria variar inversamente com o tamanho do fragmento de DNA a inserir: o tamanho do plasmídeo pBBR1MCS é de 4.7kb⁽¹⁾ e o do pHA010-3 é de 5.4kb⁽¹⁾, pelo que a eficiência deveria ser maior no plasmídeo pBBR1MCS. O mesmo aconteceu com a frequência de Eletrotransformação, que se apresentou mais baixa para as células com o plasmídeo pBBR1MCS. Estes resultados podem explicar-se através da diferença de concentrações de células de *S. elodea* na *cuvette* aquando da Eletrotransformação para cada um dos plasmídeos.

Um outro fator de interesse que poderá ter contribuído para este conjunto de resultados inesperado foram os parâmetros elétricos (tensão e resistência), em particular, a duração do pulso durante a Eletrotransformação, que se encontrou no conjunto de valores de 5.6ms e 5.7ms. A duração do pulso relaciona-se com a resistência das células em sofrer o choque elétrico e, dado que esses valores são superiores àquele para o qual o processo está otimizado, 5ms, prevê-se que exista um choque mais elevado nas células, propiciando a morte de um maior número.

b) Conjugação Triparental

Procedeu-se à conjugação triparental utilizando a estirpe *P. aeruginosa* 8859 (*algC*) e três plasmídeos recombinantes, **pMMB66EM** (vetor de clonagem vazio, com marca de seleção Amp^R), **pLC100** (vetor de clonagem derivado do PMMB66EM que contém o gene *pgmG* clonado) e **pNZ49** (vetor de clonagem derivado do PMMB66EM que contém o gene *algC* clonado).

Houve uma certa irregularidade quanto à taxa de crescimento e replicação das bactérias, verificando-se que não está presente uma relação constante entre a diluição e o número de colónias obtidas, tanto no meio PIA, quanto no meio PIA + Carbenicilina. É de registar que em duas placas de *Petri*, no meio PIA, para uma diluição de 10^{-5} , foi obtido um valor incontável de colónias. Pelo que, optou-se por não realizar uma estimativa, para não comprometer o valor da média do número de UFC/ml da cultura.

Analisando a presença ou não do fenótipo de mucosidade das colónias, verificou-se que as placas com meio PIA não detêm essa característica, ao passo que as placas de meio PIA + Carbenicilina apresentam o fenótipo mucoso. Estas características derivam do facto de tanto o gene *pgmG* como o gene *algC* codificarem uma enzima com atividade de PGM (fosfoglicomutase), que catalisa a reação de conversão de glucose-6-fosfato em glucose-1-fosfato, que é uma etapa crucial na produção do alginato e de outros exopolissacáridos - assim,

os genes *pgmG* e *algC* classificam-se como homólogos funcionais entre si, com a diferença de que o gene *pgmG* provém, originalmente, de uma estirpe de *Sphingomonas elodea* e o gene *algC* de uma estirpe de *P. aeruginosa*.

Posto isto, a observação do fenótipo mucoso confirma que há produção de alginato nas células mutantes de *P. aeruginosa*, quer pela recetora do gene *algC* homólogo, transportado no plasmídeo pNZ49 que é resultado da complementação homóloga, quer na recetora do gene *pgmG* transferido pelo plasmídeo pLC100, produto da complementação heteróloga.

Além disto, e vindo também em concordância com as conclusões anteriormente retiradas, nas colónias cujo vetor de clonagem introduzido foi o vazio, pMMB66(HE), observou-se um fenótipo não mucoso, o que vem reforçar a importância da enzima codificada pelos genes *pgmG* e *algC*, na produção do exopolissacárido alginato.

Uma vez que se pretendia eliminar as estirpes de *E. coli* no final do procedimento, responsáveis pela conjugação triparental (estirpe dadora e ajudante, sendo que esta última possui o plasmídeo conjugativo pRK2013), recorreu-se a meio PIA. Além disto, tendo em conta que apenas as células da estirpe *P. aeruginosa* com qualquer um dos 3 plasmídeos (pLC100, pNZ49 e pMMB66(HE)) no seu interior, é resistente à Carbenicilina, utilizou-se o gene de resistência a esse antibiótico como marca de seleção (uma vez que a *P. aeruginosa* é naturalmente resistente à Ampicilina, não foi possível proceder à seleção dos transconjugantes recorrendo a este antibiótico). Procedeu-se, então, à seleção, nas placas de *Petri*, em meio PIA + Carbenicilina. Deste modo, tornar-se-ia expectável que a *E. coli* não sobrevivesse e a *P. aeruginosa* sobrevivesse, resultando num número de colónias muito superior nas placas de meio PIA do que nas placas do meio PIA com aquele antibiótico (Carbenicilina) - com efeito, foi este o panorama observado: enquanto que em meio PIA houve diversas contagens de número bastante elevado e, ainda, algumas placas com número incontável de colónias, os valores contabilizados nas placas com o antibiótico como marca de seleção foram muito menores, atestando a função pela qual foi utilizado.

De acordo com a determinação da frequência de conjugação, realizada na secção de Resultados, as frequências obtidas foram 9.09×10^{-5} (pLC100), 4.97×10^{-4} (pMMB66(HE)) e 1.31×10^{-3} (pNZ49). No entanto, o expectável seria que frequência mantivesse uma relação de proporcionalidade inversa com o tamanho do plasmídeo, pelo que, tendo em conta as dimensões dos mesmos - pNZ49 (11.6 kb)⁽¹⁾, pLC100 (10.3 kb)⁽¹⁾ e pMMB66(HE) (8.9 kb)⁽¹⁾, - as frequências obtidas deveriam estar desta forma ordenadas (frequência crescente), e não de acordo com os resultados que obtivemos.

Bibliografia

(1) Guia de trabalhos laboratoriais de Engenharia Genética, Mestrado em Engenharia Biológica, Mestrado em Engenharia Biomédica, TP1- *Introdução de plasmídeos em bactérias por conjugação triparental e electrotransformação*, Moreira, L. M., Viegas, C. A., Fialho, A., Leitão, J. H., Sá-Correia, I. , Área de Ciências Biológicas, IST, 2015/2016

(2) Powerpoints das aulas teóricas de Engenharia Genética, Prof.Leonilde Moreira, 2015/2016