

Transformação bacteriana

Mechanisms of Gene Exchange

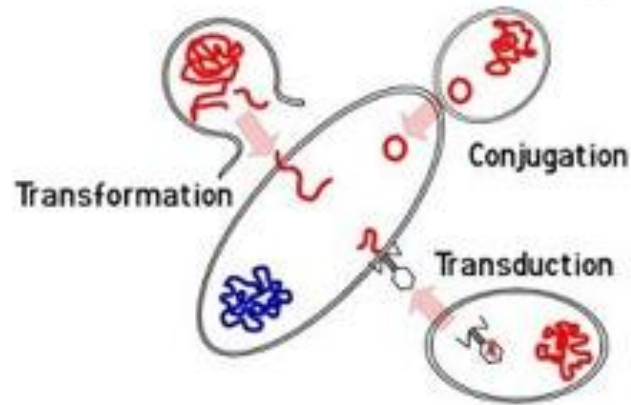
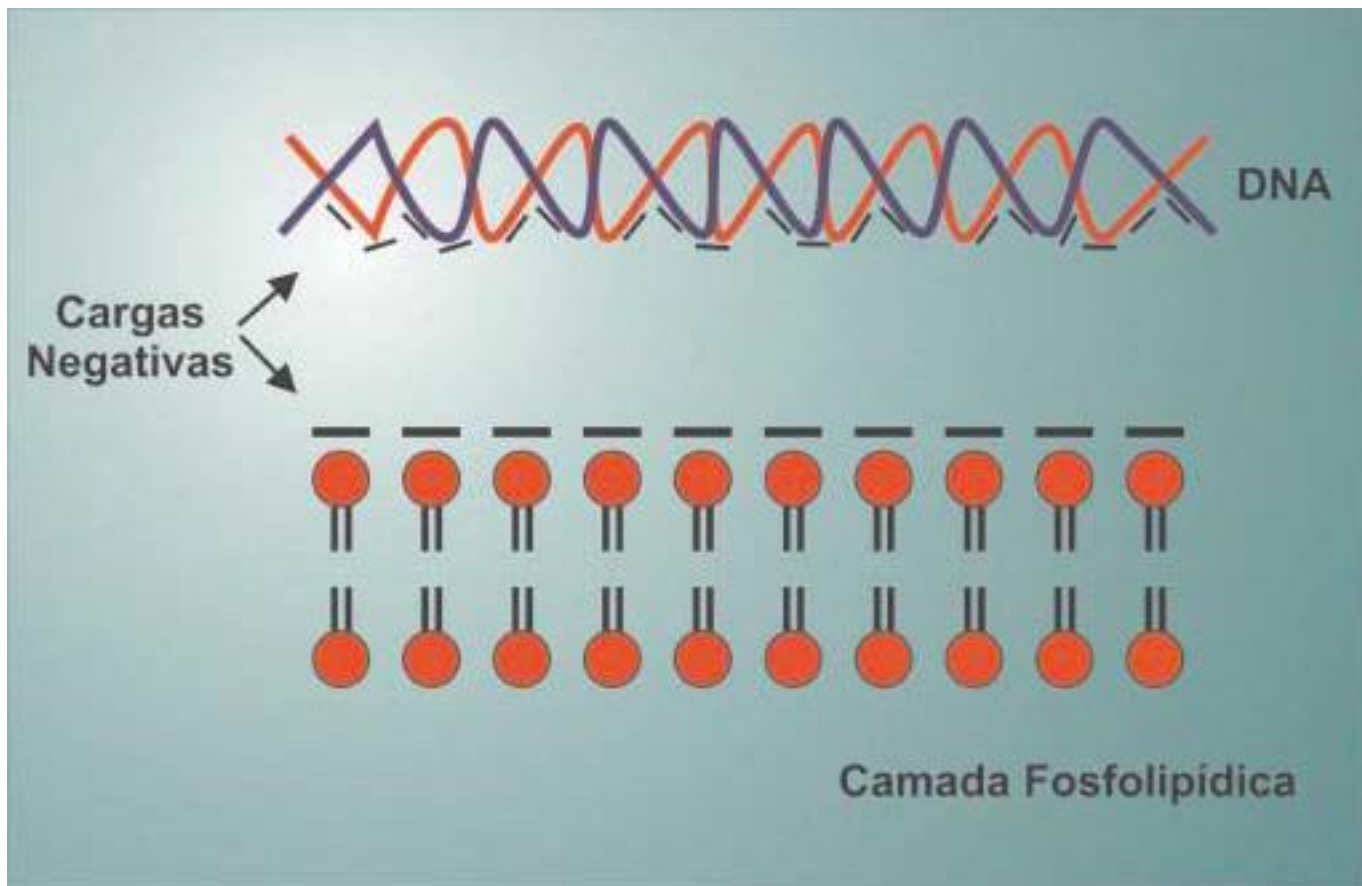
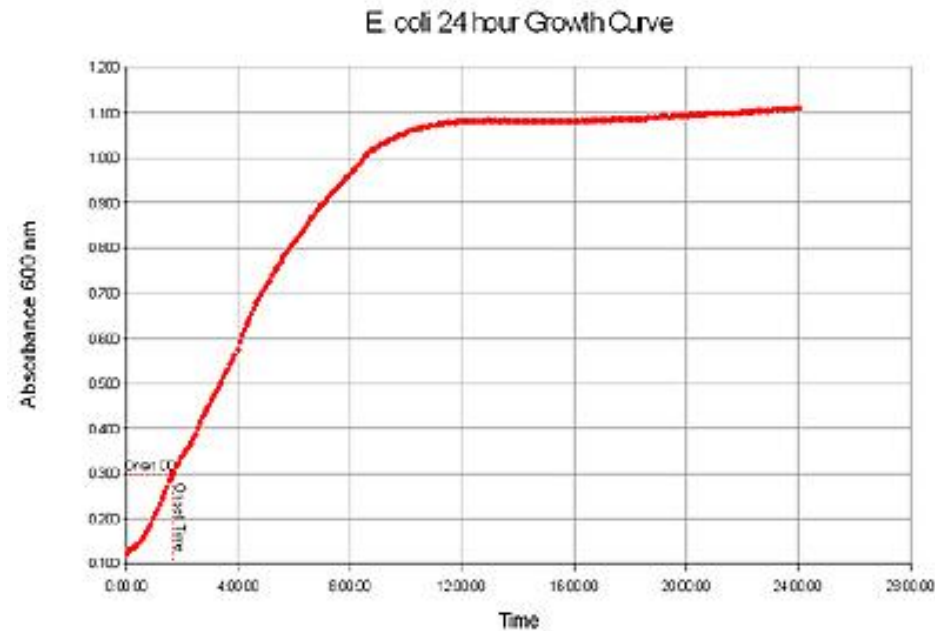
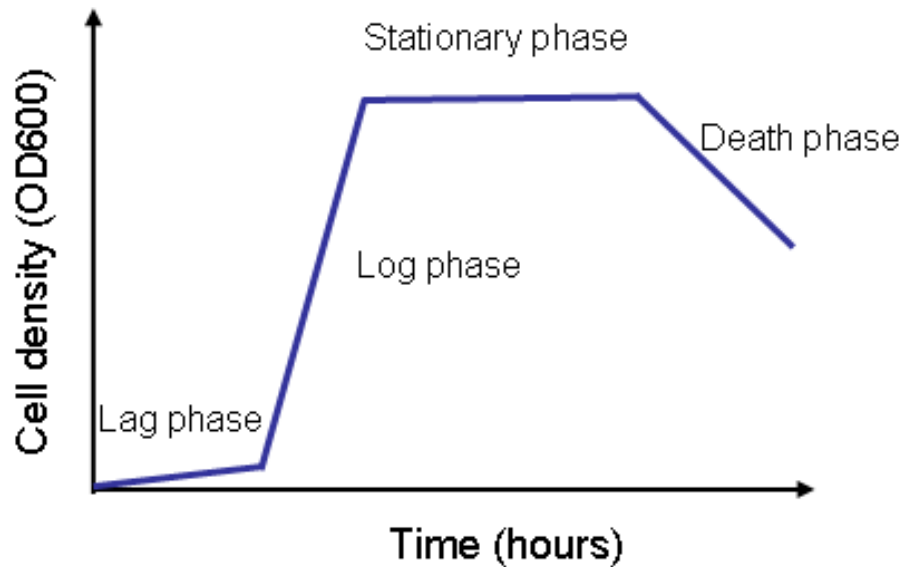


Figure from: http://2012.igem.org/Team:Paris_Bettencourt/Human_Practice/HGT



Como aumentar a probabilidade do DNA entrar na célula?

- É preciso ter “competência”!!



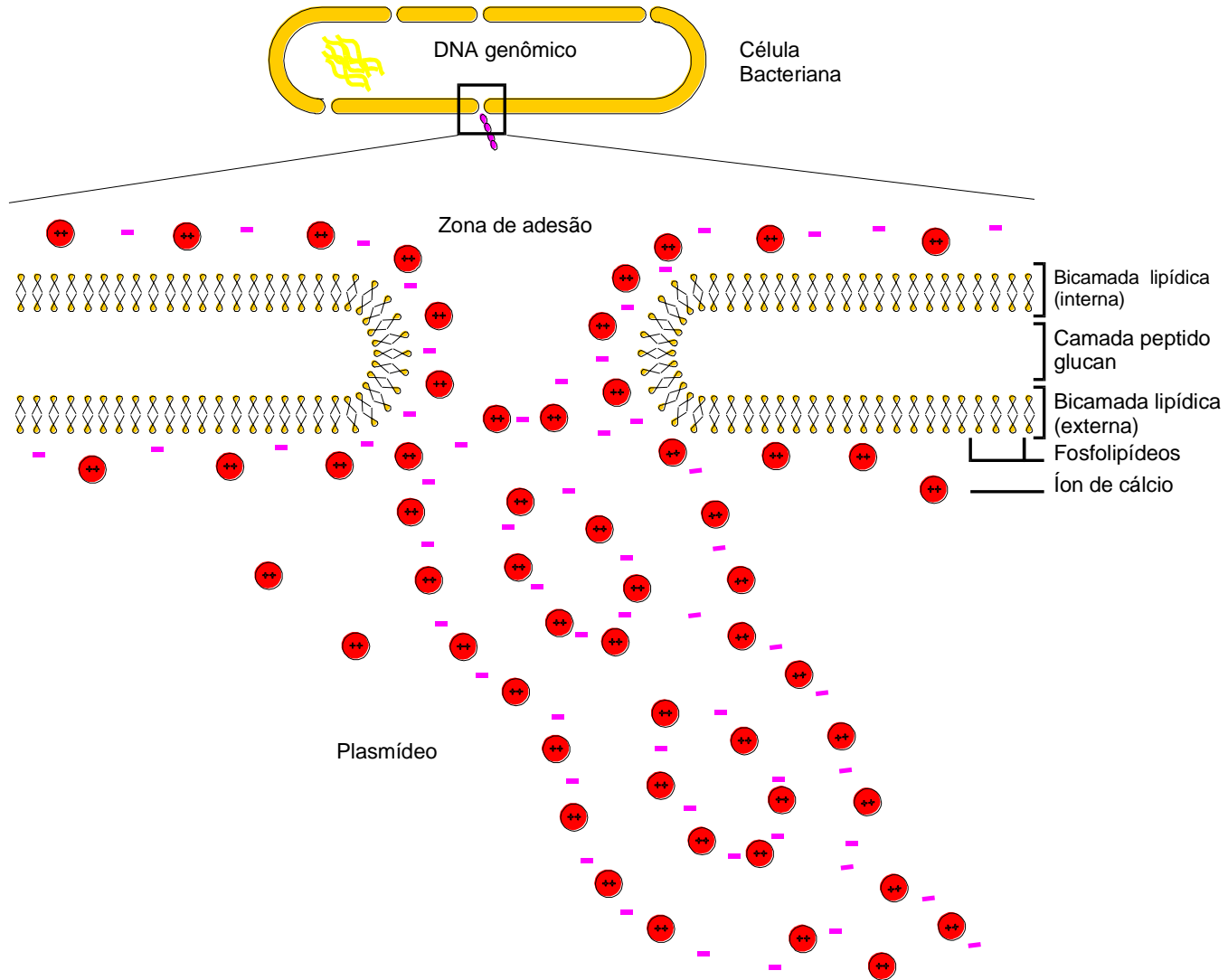
Preparação de células competentes



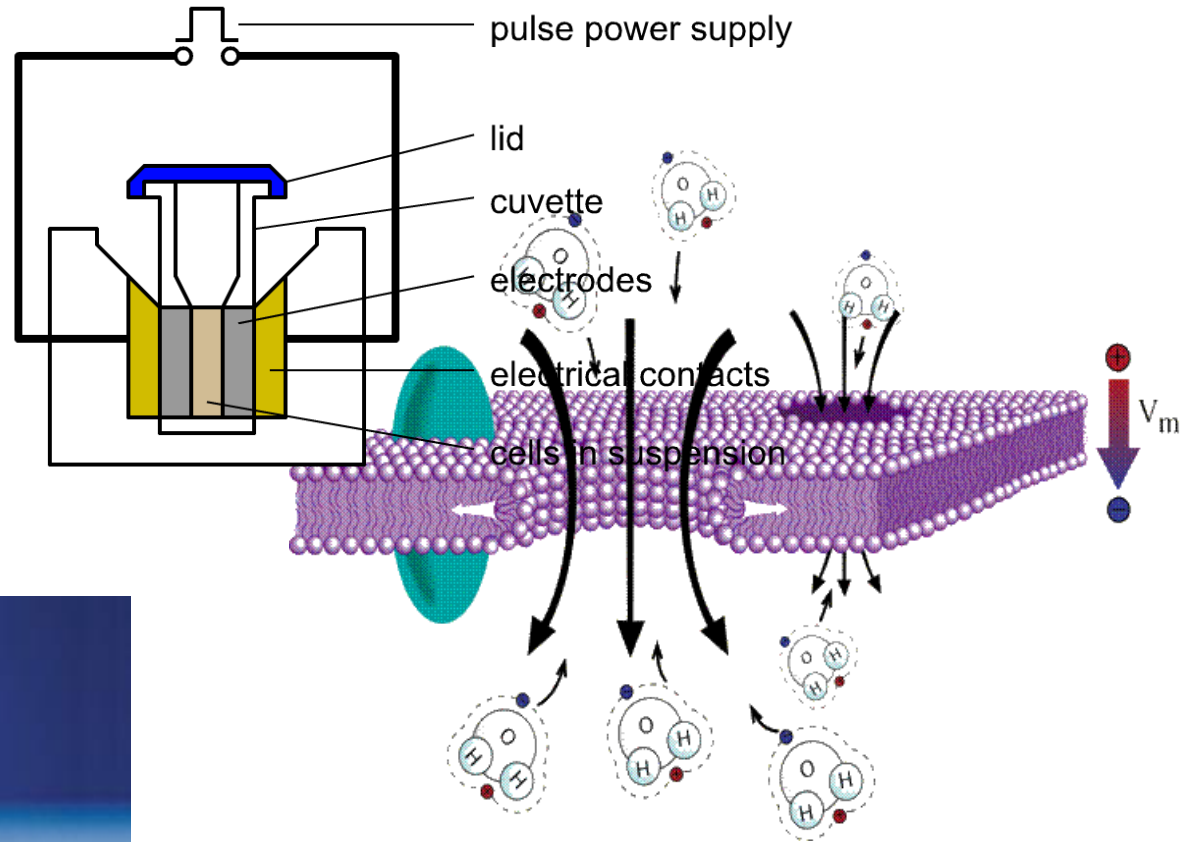
1. Incubação da cultura até Abs. $\sim 0,4$ em 600nm
2. Centrifugação a 4 °C
3. Ressuspensão das células em solução estéril:
60 mM CaCl_2 ; 15% (v/v) glicerina;
10mM Tris-HCl pH 7
4. Repetir 2 e 3 e congelar (N_2 líquido) em alíquotas



Transformação de células competentes por CaCl_2



Transformação de células por eletroporação



Como selecionar os transformantes?

Células não transformadas

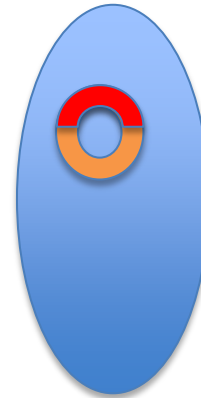


Sem
Plasmídeo

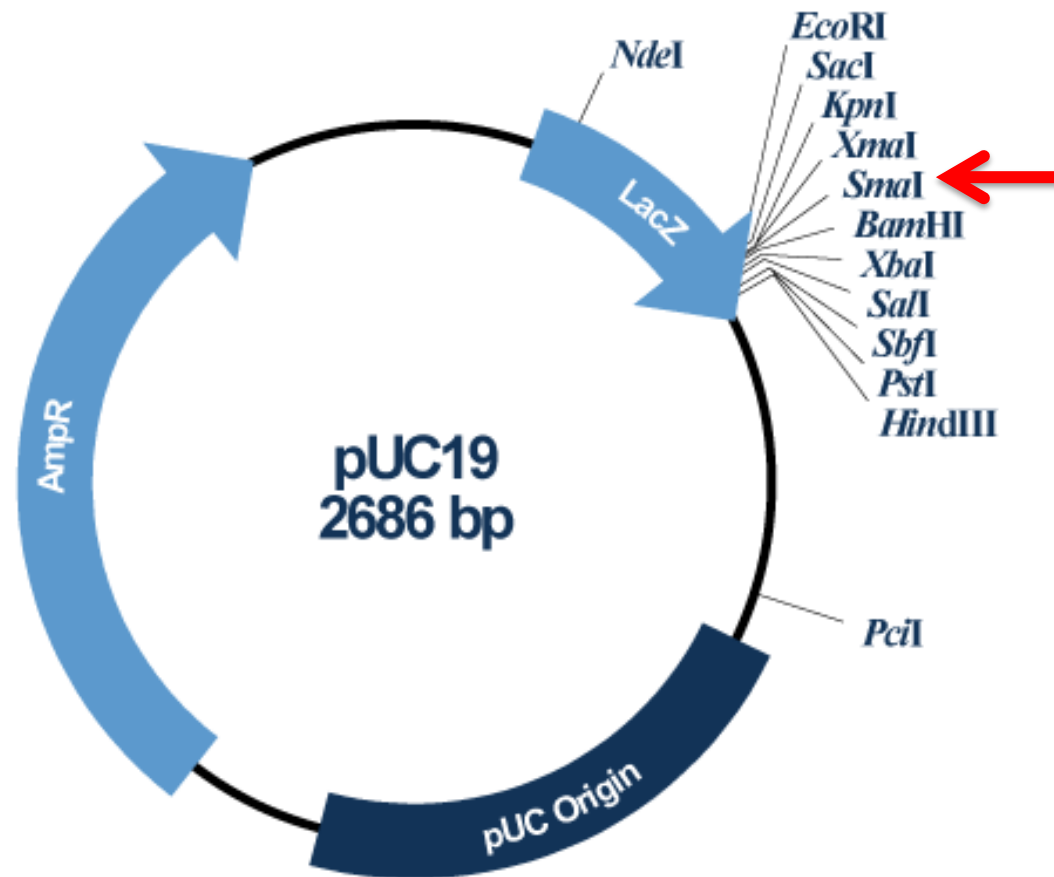
Células transformadas



Plasmídeo
sem inserto



Plasmídeo
com inserto

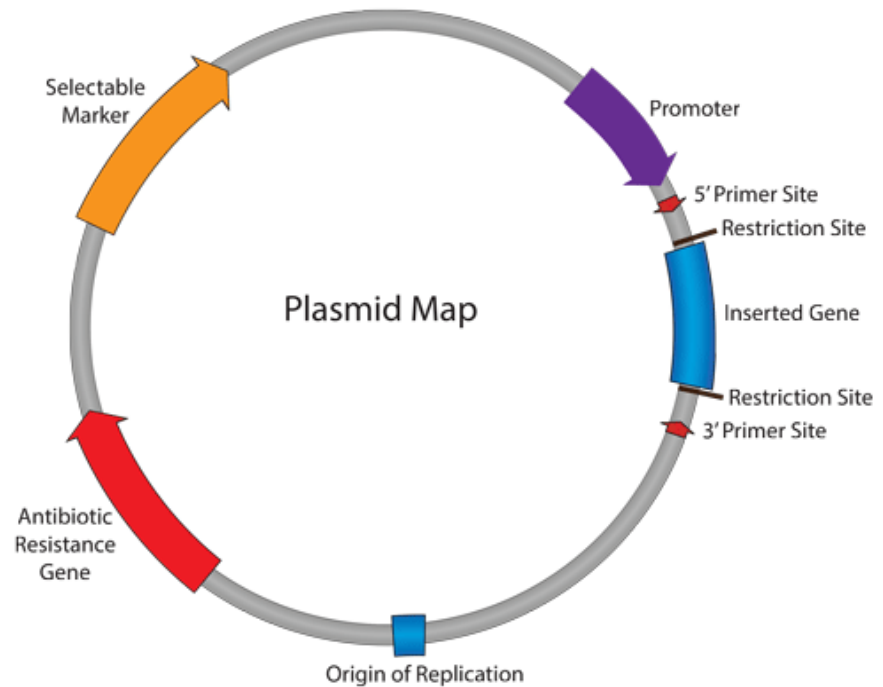
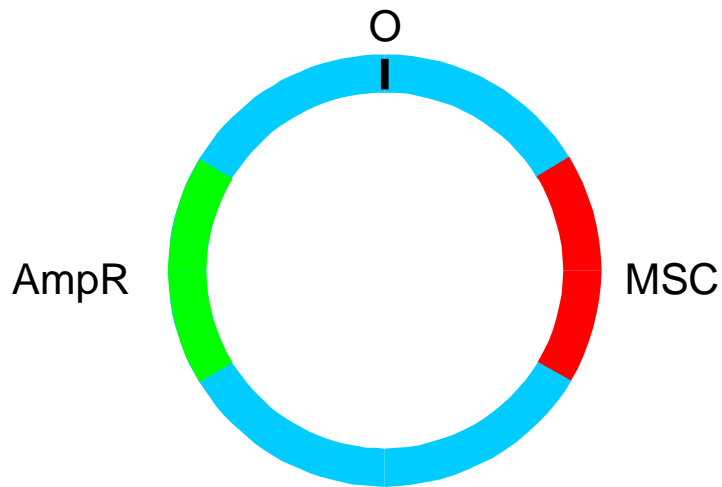


<u>EcoRI</u>	<u>SacI</u>	<u>SmaI</u> <u>XmaI</u>			<u>AccI</u> <u>HincII</u> <u>SalI</u>	<u>SphI</u>	<u>HindIII</u>	
GAATTCGAGC	TCGGTACCCG	GGGATC			GATCCTCT	AGAGTCGACC	TGCAGGCATG	CAAGCTTGG
CTTAAGCTCG	AGCCATGGGC	CCCTAG			CTAGGAGA	TCTCAGCTGG	ACGTC CGTAC	GTTCGAACC
		<u>Partial BamHI Site</u>			<u>Partial BamHI Site</u>			

In-Fusion Cloning Site



Plasmídeos



Características importantes:

O = origem de replicação

AmpR= marca de resistência

MSC= sítio múltiplo de clonagem