

Informação complementar

Transformação bacteriana com o plasmídeo pGLO

Introdução

As bactérias, além de possuírem um cromossoma circular, grande, que contém toda a informação necessária à sua vida, contêm naturalmente uma ou mais pequenas moléculas circulares de DNA em cadeia dupla, com capacidade de auto-replicação e que se designam por plasmídeos. Os plasmídeos contêm genes que em algumas situações melhoram a sobrevivência da bactéria, proporcionando, por exemplo, resistência aos antibióticos. Na Natureza, as bactérias podem transferir plasmídeos entre si, o que permite a adaptação a novas condições ambientais.

Os plasmídeos são fáceis de extrair e manipular em laboratório, podendo introduzir-se em plasmídeos, fragmentos de DNA de outros organismos, desde que sejam cortados com a mesma enzima de restrição. O plasmídeo recombinante é designado por vector e pode replicar-se se for introduzido em bactérias. Estas irão expressar a informação contida no novo gene.

Desenvolvimento

O trabalho que lhe propomos é a transformação da bactéria *Escherichia coli*, utilizando um plasmídeo chamado pGLO. Este plasmídeo permitirá às bactérias sobreviverem num meio de cultura com o antibiótico ampicilina e a possibilidade de produzir uma proteína fluorescente, a proteína GFP (uma proteína verde fluorescente — proveniente da medusa *Aequorea victoria*). O gene GFP produz uma proteína fluorescente, visível à luz ultravioleta. As bactérias que irão ser utilizadas nesta transformação não são resistentes ao antibiótico ampicilina, mas o plasmídeo contém o gene de resistência à ampicilina, permitindo às bactérias transformadas a sua sobrevivência em meios com este antibiótico. O plasmídeo possui ainda um sistema de regulação que permite controlar a expressão do gene GFP nas células transformadas. Este gene só é expresso (transcrito e traduzido) quando é adicionada arabinose ao meio.

A arabinose é um glicídeo que pode ser usado pela bactéria como fonte de energia e de carbono. A regulação da expressão génica, que permite a utilização da arabinose pela célula bacteriana, é feita por um operão onde se encontram o gene promotor, o operador e três genes estruturais. Na presença de arabinose, as bactérias produzem as três enzimas que participam na degradação do glicídeo. Na ausência de arabinose, os genes estruturais não são transcritos. O DNA do plasmídeo pGLO foi modificado geneticamente para incorporar o gene promotor e operador do operão da arabinose, tendo os genes estruturais sido substituídos pelo gene GFP. A consequência desta alteração é a expressão do gene GFP na presença da arabinose.

A transcrição dos genes estruturais depende da ligação da RNA polimerase ao promotor e da acção de uma proteína alostérica de ligação designada araC. Na ausência de arabinose no meio de cultura bacteriano, a proteína araC liga-se ao operador e impede a ligação da RNA polimerase ao promotor; consequentemente não ocorre a transcrição dos genes estruturais. Contudo, se no meio de cultura existir arabinose, esta interage com a proteína araC, originando uma alteração na forma desta proteína alostérica. Como consequência, a proteína araC não se liga ao operador, sendo assim possível a ligação da RNA polimerase ao promotor, resultando na transcrição dos genes estruturais (Fig. 2).

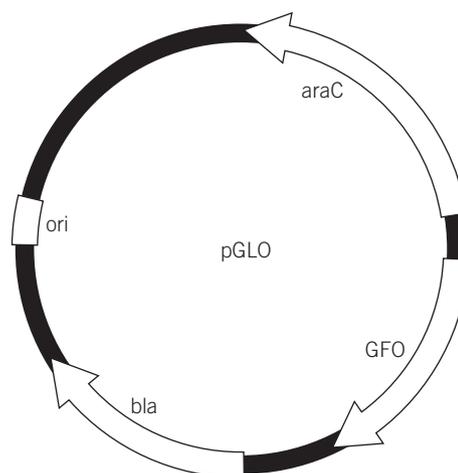


Fig. 1 pGLO, plasmídeo recombinante.

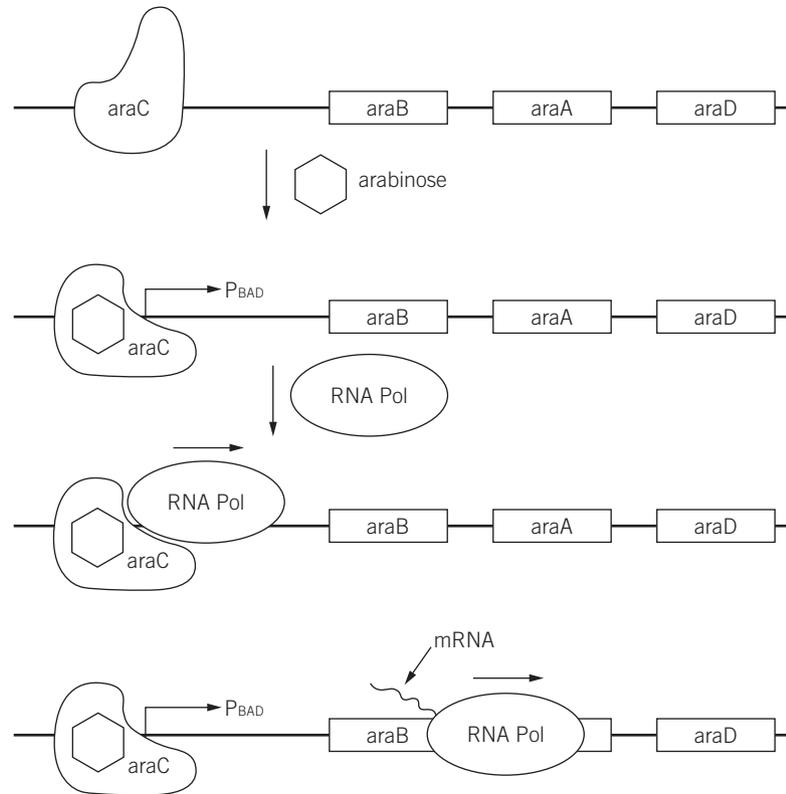


Fig. 2 Operação da arabinose.

Quando os genes estruturais são substituídos pelo gene GFP, o sistema funciona da mesma forma mas com a expressão do gene GFP, permitindo, na presença de arabinose, o fabrico da proteína verde fluorescente, o que tem como consequência o facto de as bactérias emitirem fluorescência na presença de luz ultravioleta.

Na ausência de arabinose, a proteína araC liga-se ao operador e impede a ligação da RNA polimerase ao promotor, pelo que o gene para a proteína GFP não é transcrito. Nesta última situação, as bactérias têm um aspecto esbranquiçado e não emitem fluorescência.

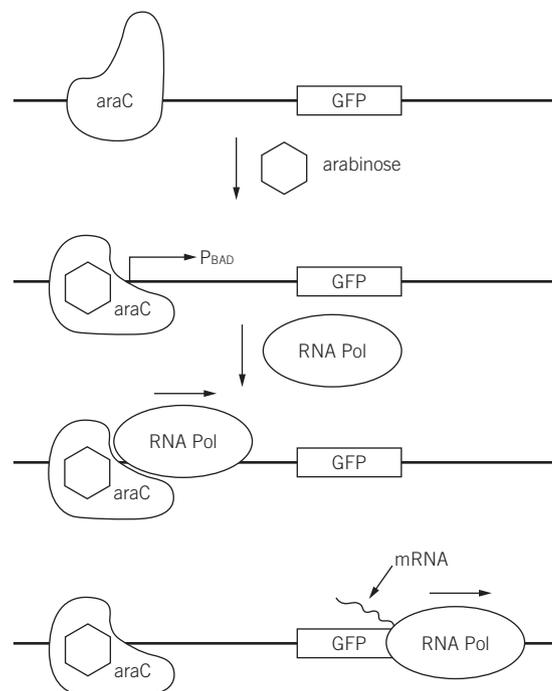


Fig. 3 Expressão do gene GFP.