

Curso de Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular

Atividade Aula 03/10/2024

Proteína Recombinante I: Indução

Crescimento bacteriano e indução para expressão de proteína recombinante

Procedimento:

1. Com a alça bacteriológica coletar uma colônia da placa de LB-agar/ampicilina
2. Transferir a colônia de bactéria a tubo contendo meio de cultura LB-caldo, contendo o antibiótico de seleção.
3. Incubar 37°C/18 h/150 rpm.
4. Fazer inóculo com 1 ml da cultura, adicionado a 50 ml de meio de cultura fresco, contendo o antibiótico de seleção. Incubar 37°C/150 rpm.
5. Acompanhar a densidade óptica (DO) 600 nm até 0,4-0,6.
6. Remover uma parte da cultura para novo frasco e identificar como NÃO INDUZIDO (NIndz) e determinar a DO₆₀₀ (tempo zero) ao restante da cultura adicionar indutor IPTG a uma concentração final de 0,5 mM, identificar como INDUZIDO (Indz).
7. Incubar os 2 frascos 37°C/150 rpm.
8. Fazer leitura da DO₆₀₀ nm às 2, 4, 6 e 8 h após indução, de cada frasco, para tanto recuperar 1 ml de cultura em condição estéril, e seguir o procedimento:
 - Transferir 100 ul da cultura a tubo limpo contendo 900 ul de água destilada, misturar, transferir a cubeta, realizar a leitura DO₆₀₀ nm e anotar na tabela.
 - Centrifugar 4 tubos com 50 ul de cultura, 5 min/10000 rpm, descartar sobrenadante e reservar a massa celular para eletroforeses SDS-PAGE (02 tubos) e para análise de atividade enzimática (02 tubos), congelar a massa celular, devidamente identificada
 - O restante da cultura (700 ul), centrifugar 5 min/10000 rpm, descartar o sobrenadante e congelar a massa celular, devidamente identificada, reservar para análise SDS-PAGE.
9. Congelar a massa celular, devidamente identificada, coletada em cada ponto (4h, 6h e 8h, como NIndz e Indz).
10. Construir o gráfico de crescimento celular para cada cultura e condição (induzido/não induzido)



Tabela. Crescimento bacteriano DO₆₀₀ nm

Cultura/DO ₆₀₀	Cultura (0 h – 10 h)	Indução (2h – 12h)		Indução 4 h (14 h)		Indução 6 h (16 h)		Indução 8 h (18h)	
		NIndz*	Indz**	NIndz	Indz	NIndz	Indz	NIndz	Indz
TfAEST									
BAP									

* Cultura bacteriana não induzida com IPTG

** Cultura bacteriana induzida com IPTG 0,5 mM