

OBJETIVO

Obter uma construção envolvendo parte do gene *oppA*, para posterior utilização desta como ferramenta para estudo da influencia do transporte de oligopeptídeos na fisiologia e resposta ao estresse em *A. hydrophila*.

MATERIAIS E MÉTODO

Bactérias e condição de crescimento

No presente trabalho foram utilizadas bactérias *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 e *Escherichia coli* DH5 α . Ambas as bactérias foram mantidas em meio LB sólido e repicadas a cada 20 dias.

Amplificação do fragmento do gene *OppA*

Para a amplificação do fragmento do gene *OppA*, *A. hydrophila* ATCC7966 foi crescida em meio LB a 37°C sob agitação por 24h. Posteriormente a amostra foi diluída em água milli-Q autoclavada na proporção 1:40 e 4 μ L desta suspensão foi utilizada para o PCR.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo: 12,5 μ L de água milli-Q autoclavada, 2,5 μ L de Buffer (Tris-HCl-pH8,3), 1 μ L de MgCl₂, 1 μ L de dNTPs, 1 μ L de cada primer, 0,15 μ L de enzima Taq DNA polimerase e 4 μ L de suspensão bacteriana.

As amplificações por PCR foram realizadas em um termociclador MJ Reserach modelo PTC100 programado para 10min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1min a 94° para a desnaturação das fitas do DNA, 1 min a temperatura de 56°C, para anelamento de cada um dos primers ao DNA, 2 min a 72°C para extensão das fitas de DNA. Ao final dos ciclos foi feita uma extensão suplementar por 10min a 72°C e 10min a 4°C.

Obtenção de células competentes

Para a obtenção de células competentes, *Escherichia coli* DH5 α foi crescida sob agitação em 50 mL de meio de cultura LB suplementado com 10mM-MgSO₄ 7H₂O e 0,2% de glicose, até atingirem uma densidade óptica (D.O 600nm) de 0,45-0,5. As células foram mantidas no gelo por 10min e então centrifugadas a 1500xg por 10min a 4°C. Após foram ressuspensas em 0,5mL do meio em que foram previamente crescidas, e 2,5mL de uma solução contendo 36% de glicerol, 12% de PEG. Por fim foram divididas em alíquotas de 0,1mL e estocadas a -80°C.

Clonagem e transformação bacteriana

Para a clonagem de parte do gene *OppA* de *A. hydrophila* o vetor pJET-PCR 1.2/blunt (Fermentas) foi empregado. Os procedimentos para a ligação do fragmento ao vetor seguiram as recomendações do fabricante.

Para o procedimento de transformação, 5 μ L do plasmídeo pJET-PCR-OppA foi incorporado a 100 μ L de *E. coli* DH5 α e esta foi mantida a 4°C por 20min. Em seguida as bactérias foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 60 segundos e mantidas no gelo por 2min. Após, as células foram 10X diluídas e incubadas em meio LB por 1h a 37°C. Por fim os transformantes foram selecionados empregando ampicilina como agente seletor. As bactérias selecionadas foram mantidas em meio LB acrescido de ampicilina e repicadas a cada 20 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação de parte do gene *OppA* em *A. hydrophila* ATCC7966 permitiu a obtenção de uma banda com peso molecular de 542pb (Figura 1a).

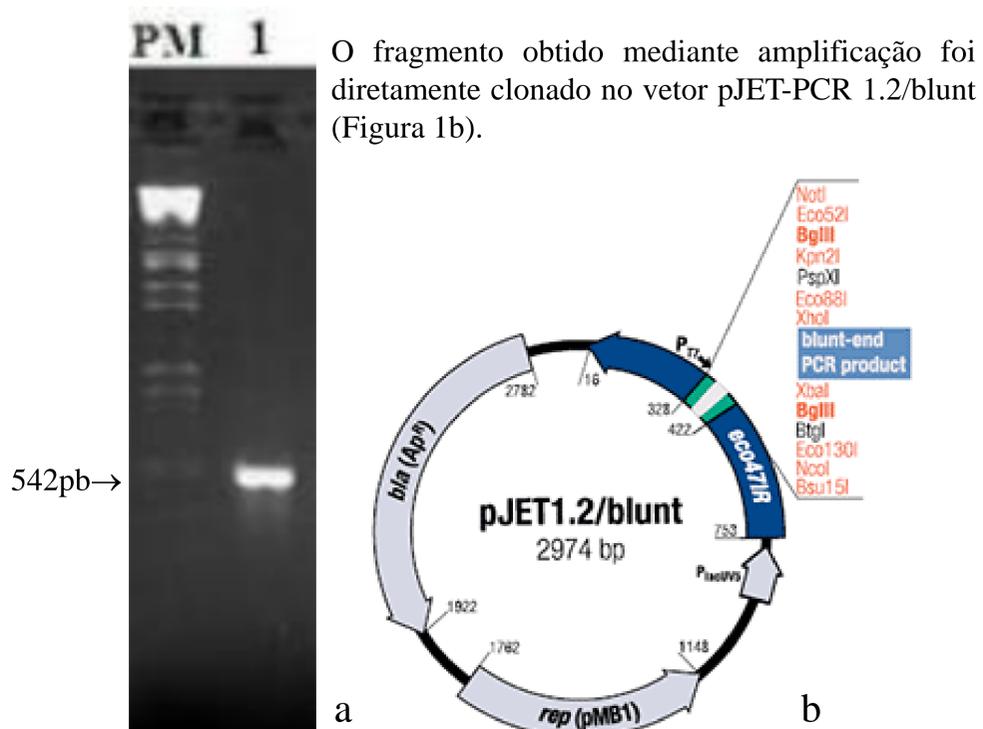


Figura 1. PM- Padrão de peso molecular; 1- Fragmento amplificado do gene *OppA*.(a). Mapa representativo do vetor pJET-PCR 1.2/blunt (b).

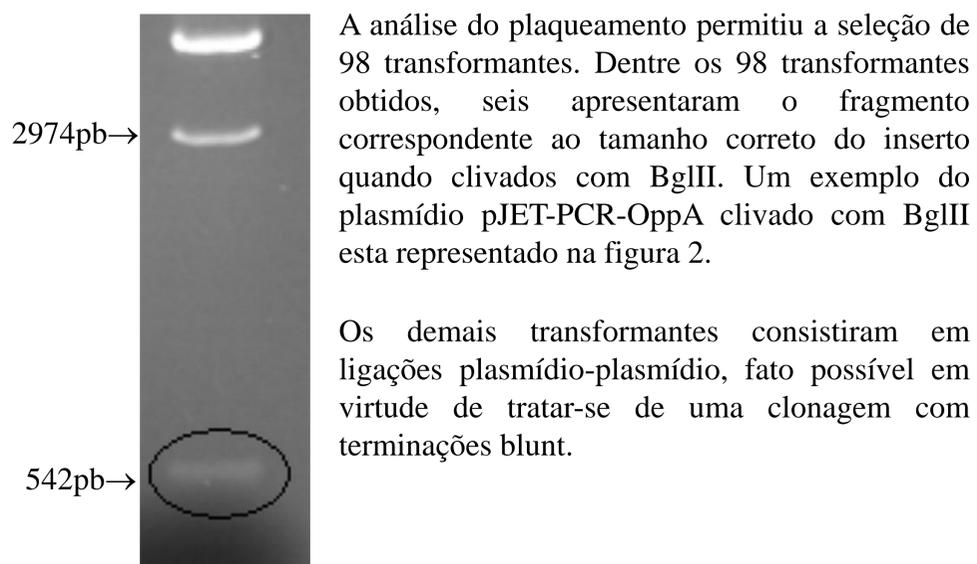


Figura 3. Clivagem do vetor pJET-PCR-OppA, empregando BglII.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nestes resultados, conclui-se que foi possível obter uma correta construção contendo parte do gene *OppA*. Esta construção apresenta uma grande relevância pois poderá ser empregada como uma ferramenta útil de sub clonagem deste fragmento empregando uma grande variedade de enzimas de restrição presentes no sítio de multiclonagem do vetor pJET-PCR 1.2/blunt. Sendo assim, a incorporação deste fragmento em outros vetores possibilita o estudo da influência do sistema de transporte de oligopeptídeos na fisiologia e resposta ao estresse em *A. hydrophila*.