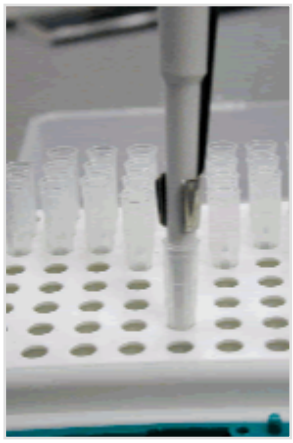
Manejo da micropipeta (http://www.fhcrc.org/education/hutchlab/lessons/use.htm)

1 – Seleccione a micropipeta correcta para o volume a pipetar

2 – Ajuste para o volume desejado

3 – Ajuste uma ponta à micropipeta sem tocar na ponta



4 – Pressione o êmbolo até ao primeiro STOP

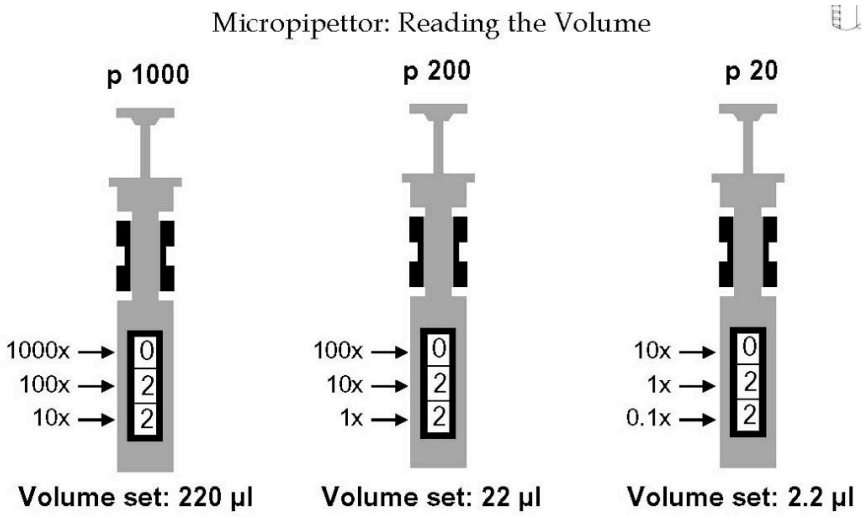
5 – Coloque a extremidade da ponta dentro do líquido

6 – Liberte o êmbolo lentamente

7 – Coloque a ponta próxima do fundo do novo tubo

8 – Pressione o êmbolo até ao segundo e último STOP

9 – Retire a ponta do tubo e **depois** liberte a pressão no êmbolo



BOX 1

AVOID DAMAGING MICROPIPETTORS

Never drop a micropipettor.

Never rotate the volume adjuster of an adjustable micropipettor beyond the upper or lower range of the instrument.

Never pass a micropipettor through a flame.

Never use a micropipettor without a tip thus allowing liquid to contaminate the shaft assembly.

Never lay a filled micropipettor on its side thus allowing liquid to contaminate the shaft assembly.

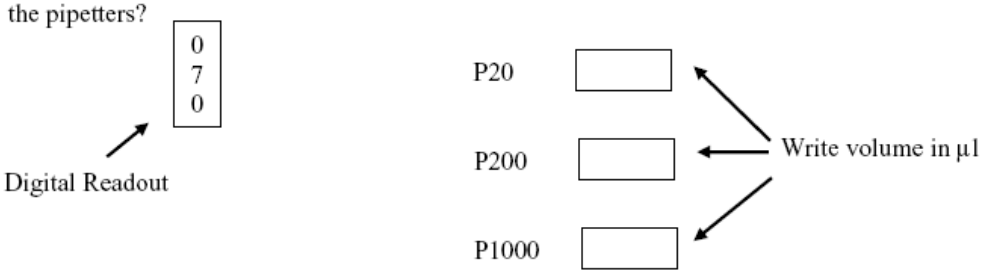
Never immerse the barrel of a micropipettor in liquid, only immerse the tip.

Never allow the plunger to snap up when liquid is being aspirated.

Store micropipettors set to their highest volume. This releases pressure on the spring inside the micropipettor.

Practice

In the boxes below, write how many µls the following digital readout correspond to in each of the pipetters?



Which micropipettor would be appropriate to measure 250µl? _____ Fill in the numbers that should appear in the digital display if that pipettor were to measure 250µl.

Brometo de etídio

A utilização de **brometo de etídio** é um modo mais rápido e sensível para vizualizar o DNA. Contudo, é um **agente mutagénico e possivelmente carcinogénico**.
Normalmente faz-se uma solução "stock" de brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml em água destilada, que é guardada a 4°C ao abrigo da luz. O brometo de etídio pode ser adicionado à agarose liquefeita, após arrefecimento desta a cerca de 50°C, na concentração final no gel de 1µg/ml.

Devem ser sempre usadas luvas descartáveis ao manipular soluções contendo brometo de etídio.

Particularmente delicada é a preparação da solução "stock" a partir do pó pelo que deve ser usada máscara e luvas de nitrilo. Preferencialmente, esta solução pode ser adquirida, já na concentração desejada.

A **fluorescência** do complexo **brometo de etídio-DNA** é mais elevada com radiação **UV** de 254 nm e menor a 366 nm. A maioria da fontes comerciais de UV emite a 302 nm, o que apesar de produzir uma fluorescência menor, conduz a menores danos no DNA do que a radiação de menor comprimento de onda (254 nm).
Com fontes de ultravioleta eficientes e filme apropriado podem ser visualizadas bandas contendo **10ng** de DNA, com exposições de poucos segundos. Com fontes de UV mais fortes e longos tempos de exposição pode ser registada em filme a fluorescência emitida por 1 ng DNA.

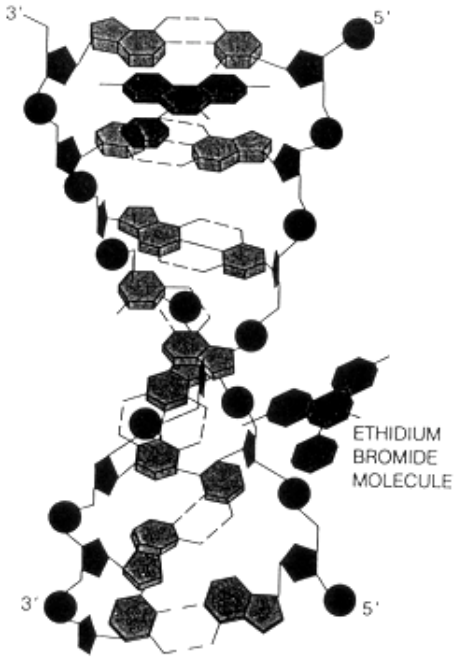
ATENÇÃO: A **radiação UV** é **perigosa**, sobretudo para os olhos. **Usar óculos ou máscara protectora.**

Descontaminação do gel e da solução com brometo de etídio: **i)** se necessário, adicionar água para reduzir a concentração de brometo de etídio; **ii)** adicionar 1 volume de 0,05 M $KMnO_4$ (irritante e explosivo) e misturar *cuidadosamente*; **iii)** adicionar 1 volume de 0,25 N HCl e misturar *cuidadosamente*; **iv)** deixar repousar à temperatura ambiente, durante várias horas; **v)** adicionar 1 volume de 0,25 N NaOH e misturar *cuidadosamente*; **vi)** O gel e as soluções podem ser deitados fora normalmente.

Manutenção do DNA

O DNA purificado é dissolvido em água estéril ou tampão TE[i] e geralmente guardado no frigorífico, a 4°C. O DNA pode ser mantido por longos períodos de tempo no congelador (-20°C), contudo, se está a ser utilizado com frequência, é preferível não o congelar, pois durante o processo de congelar/descongelar repetidas vezes, formam-se cristais de gelo que podem causar rupturas na molécula de DNA. Os danos causados pelo frio são críticos para o DNA plasmídico pois plasmídio com "nicks"ou linearizado apresenta uma eficiência de transformação mais baixa do que o plasmídio enrolado "supercoiled".

[i] Tampão Tris/EDTA (TE): 10mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA



Intercalation of Ethidium Bromide into DNA Helix

CAUTION

Handling and Decontamination of Ethidium Bromide

1. Always wear disposable gloves when working with ethidium bromide solutions or stained gels.
2. Limit the use of ethidium bromide to a restricted sink area.
3. Following gel staining, use a funnel to decant as much as possible of the ethidium bromide solution into a storage container for reuse or decontamination and disposal.
4. Disable stained gels and used staining solution, according to accepted laboratory procedure. The method given below is adapted from Quillardet and Hofnung (1988).
   a. If necessary, add water to reduce the concentration of ethidium bromide to less than 0.5 mg/ml.
   b. Add 1 volume of 0.05 M $KMnO_4$, and *mix carefully*.
   c. Add 1 volume of 0.25 N HCl, and *mix carefully*.
   d Let the solution stand at room temperature for several hours.
   e. Add 1 volume of 0.25 N NaOH, and *mix carefully*.
   f. Discard the disabled solution down a sink drain. Drain disabled gels, and discard them in the regular trash.

   Caution: $KMnO_4$ is an irritant, and it is explosive. Solutions containing $KMnO_4$ should be handled in a chemical hood.
5. *One previous method of treating ethidium bromide with bleach solution was deemed inadequate and has been abandoned.*

Bibliografia: DNA Restriction Analysis Kit - Instructor´s Manual (1990). Carolina Biological Supply Company, USA.

ANÁLISE DE DNA CORTADO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Usar sempre material e soluções esterilizadas

Neste trabalho, o DNA de bacteriófago Lambda (48502 pares de bases - **bp = 48,5 kb**) e o DNA de uma cianobactéria (*Nostoc* sp. PCC 7120 – **7,2 Mb**) serão cortados com enzimas de restrição e os fragmentos resultantes separados por electroforese em gel de agarose. Duas amostras de DNA são incubadas a 37ºC, cada uma delas com uma das seguintes endonucleases de restrição: *Eco*RI ou *Hin*dIII. Uma terceira amostra, que constitui o controlo negativo, é incubada sem endonuclease.
As amostras de DNA são carregadas em poços de um gel de agarose e submetidas a electroforese. Um campo eléctrico é aplicado através do gel conduzindo a uma migração dos diferentes fragmentos do DNA da amostra em direcção ao polo positivo (a pH alcalino). As moléculas de DNA mais pequenas migram mais rapidamente do que as de maiores dimensões, e assim os fragmentos de diferentes tamanhos ficam separados em bandas diferentes durante a electroforese. Para um determinado DNA, o número e o padrão das bandas produzidas por cada enzima de restrição são característicos e constituem um "DNA fingerprint". Os padrões de restrição tornam-se visíveis por coloração com um composto que se liga à molécula de DNA.

A. Reacções de restrição

Notas: *As DNases são abundantes, nomeadamente nas mãos. Usar só material esterelizado e não tocar com as mãos nas pontas das pipetas e nas tampas e interior dos tubos "Eppendorf".*

Ao pipetar olhar sempre para a ponta da pipeta para verificar se entrou líquido. Pegar no tubo "Eppendorf" com a mão e colocar o líquido no fundo.

É necessário ter o máximo de cuidado com as enzimas de restrição para não desnaturarem: devem ser retiradas do frigorífico para um recipiente com gelo ***só*** *no momemto da utilização.*

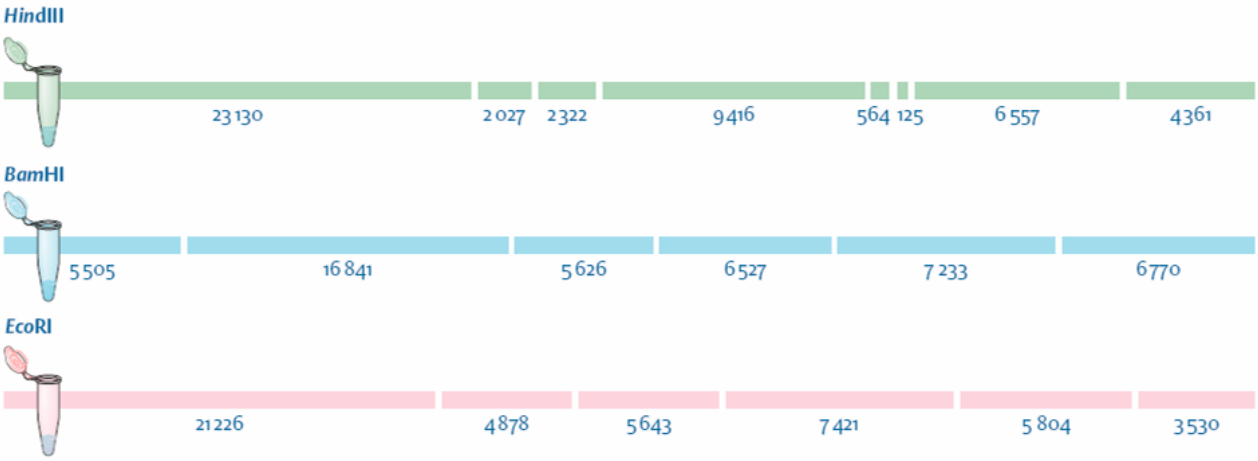
1- Preparar seis tubos "Eppendorf" (1,5 mL) de acordo com a seguinte tabela:

Tubo	**DNA***	**Tampão** 10x	***Hin*dIII**	***Eco*RI**	**H_2O**
lambdaH	2 µL	1 µL	1 µL	---	6 µL
lambdaE	2 µL	1 µL	---	1 µL	6 µL
Controlo lambda	2 µL	1 µL	---	---	7 µL

* 1 µg

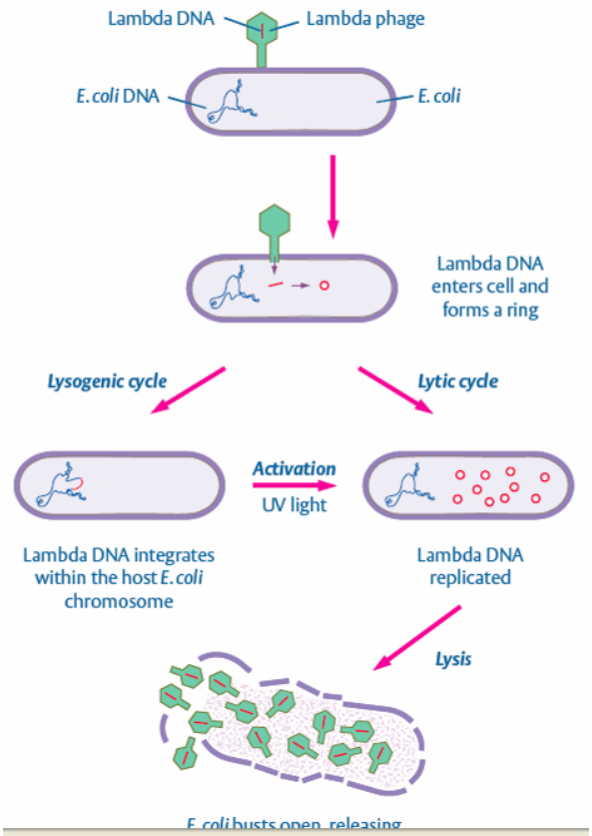
2- Misturar os reagentes batendo suavemente na extremidade do tubo. Se necessário, centrifugar para evitar que fique líquido nas paredes.

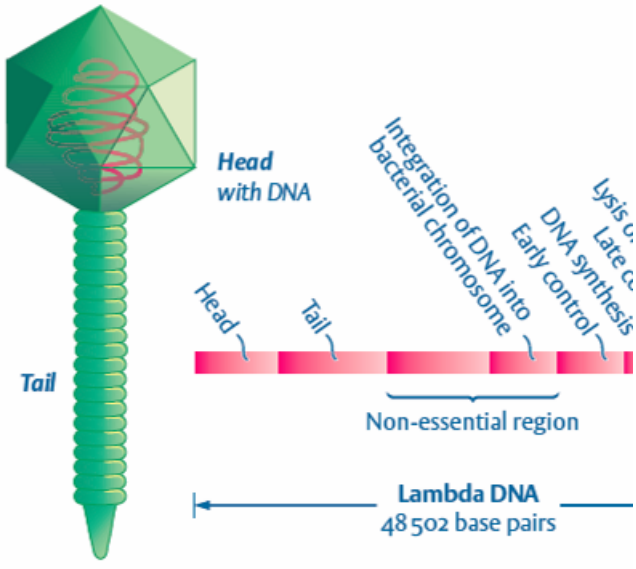
3- Incubar todos os tubos de reacção por um período mínimo de 1h a 37ºC.



These restriction maps show where EcoRI, BamHI and HindIII cut lambda DNA. The numbers are the sizes of the fragments, in base pairs (bp). The dried enzymes in the kit are in colour-coded tubes.

Enzyme name Source microorganism STRAIN	DNA base pair 'recognition' site (5'→3')
BamHI *Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC
EcoRI *Escherichia coli* RY13	G↓AATTC
HindIII *Haemophilus influenzae* Rd	A↓AGCTT





Bacteriophage lambda and some of the main groups of the genes in its genome. The DNA can be linear or it can form

B. Montagem do gel

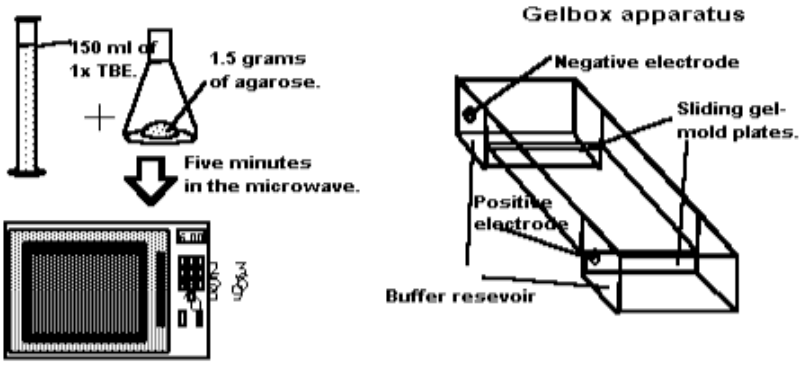
1- Fechar as extremidades do suporte do gel e inserir o pente para definir os poços.

2- Preparar 50 mL agarose 1,0 % (p/v) em tampão TAE (40 mM TRIS-Acetato, 2 mM EDTA, pH=8,3) num matraz de 200 mL; dissolver a agarose em forno micro-ondas ou em banho de água a ferver; depois de arrefecer para cerca de 50ºC, adicionar 3 µL de uma solução de brometo de etídio 10 mg/mL em água . Atenção: o *brometo de etídio é mutagénico, usar luvas*.

3- Verter a agarose no suporte do gel e deixar solidificar. Cuidado, *a agarose muito quente deforma o suporte do gel.*

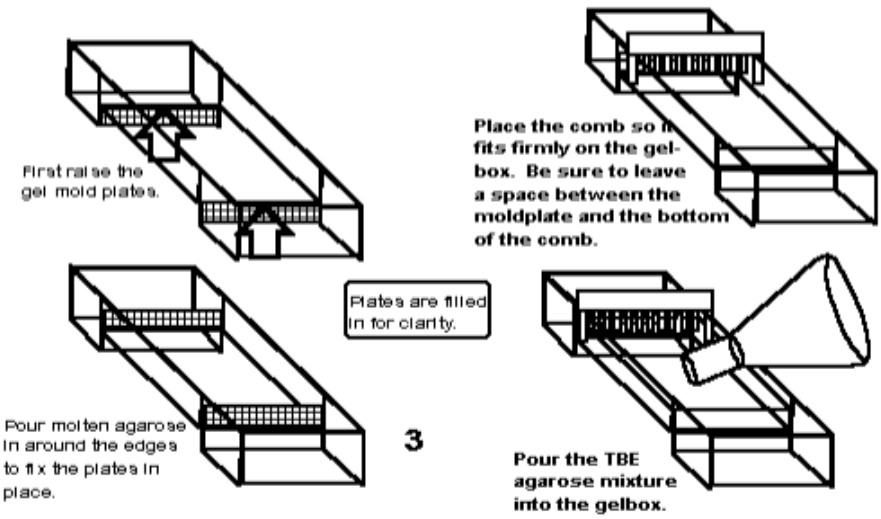
4- Abrir as extremidades do suporte do gel, retirar o pente. Atenção: *poços do lado do cátodo.*

5- Encher a tina com tampão TAE até cobrir a superfície do gel. Verificar se os poços estão preenchidos com tampão.

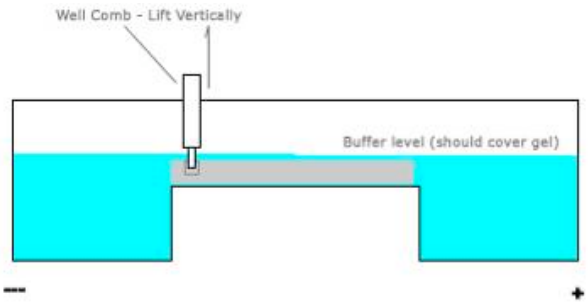


1

2



4



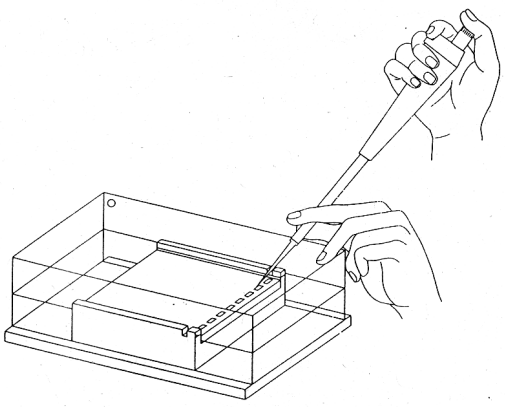
remover cuidadosamente o pente, puxando-o na vertical

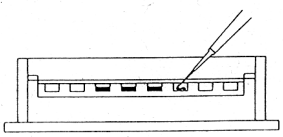
C. Carregar o gel

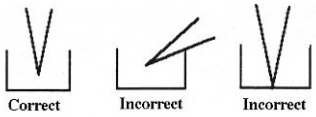
1- Adicionar 1 µL do tampão da amostra (50% glicerol, 0,1% de azul de bromofenol, EDTA 100 mM) a cada tubo. Preparar um tubo com 1-2 µL de DNA extraído de folhas, água até 10 µL e 1 µL do tampão da amostra. Deixar ficar as pontas usadas nos tubos.

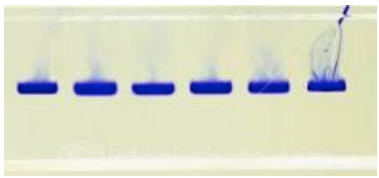
2- Pipetar o conteúdo total de cada tubo de reacção para um poço do gel, usando a mesma ponta.
- estabilizar a pipeta sobre o poço com ambas as mãos
- expelir o ar da ponta antes de carregar o gel
- orientar verticalmente a ponta com a amostra com o centro do poço e submergi-la ligeiramente no tampão
- mergulhar a ponta da pipeta um pouco abaixo da superfície do líquido (não é necessário introduzir a ponta dentro do poço), posicioná-la na direcção do poço e expelir a amostra muito lentamente, que cairá directamente no poço devido à maior densidade do tampão de amostra

Cuidado para não furar o gel com a ponta da pipeta.









D. Electroforese

1- Fechar a câmara de electroforese e ligar os cabos eléctricos a uma fonte de alimentação eléctrica de modo a que o cátodo da câmara fique ligado ao cátodo da fonte (preto – preto), assim como o ânodo (vermelho – vermelho). Verificar se os poços com DNA estão do lado do cátodo (polo negativo).

2- Ligar a fonte de alimentação e regular a voltagem para 70 V. Verificar a formação de pequenas bolhas gasosas nos eléctrodos da câmara. Passados alguns instantes de corrida, deve ver-se o corante azul deslocar-se no gel em direcção ao polo positivo. O azul de bromofenol desloca-se à mesma velocidade de um fragmento de DNA de aproximadamente 300 bp.

3- Deixar de correr a electroforese até o azul de bromofenol se encontrar a meio do gel.

4- Desligar a fonte de alimentação, desligar os cabos de ligação e remover a tampa da câmara de electroforese.

5- Cuidadosamente, e usando luvas, retirar o gel com o respectivo suporte da câmara de electroforese.

6- Examinar o gel com iluminação UV e registar o padrão de bandas em fotografia ou desenhando numa folha de acetato sobreposta ao gel. Neste caso, não esquecer de marcar a posição dos poços. Atenção: *proteger os olhos da radiação UV por meio de óculos adequados.*

E. Resultados e Discussão

1- Os fragmentos lineares de DNA migram a velocidades inversamente proporcionais ao $\log_{10}$ das suas massas moleculares. Para simplificar, substitui-se a massa molecular dos fragmentos pelo seu tamanho em pares de bases(bp).

2- Na tabela seguinte estão os tamanhos de fragmentos de DNA de Lambda originados por digestão com *Hin*dIII:

***Hin*dIII**		***Eco*RI**		
Distância (mm)	**bp real**	Distância (mm)	bp calculado	**bp real**
	23130			
	9416			
	6682			
	4361			
	2322			
	2027			
	*564			
	*125			

*** estas bandas podem não ser visíveis**

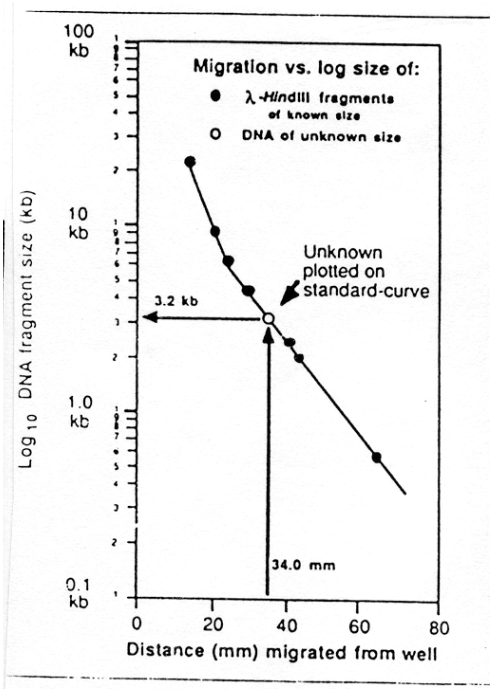
3- Medir a distância, em mm, desde o bordo do poço a cada uma das bandas e registar na tabela.

4- Fazer corresponder a distância a cada banda ao tamanho do respectivo fragmento.

5- Usando papel semi-logarítmico, marcar a distância migrada no eixo dos *xx* e o logarítmo de kb no eixo dos *yy*, para cada fragmento de *Hin*dIII. Unir os pontos.

6- Usar a curva obtida para determinar o tamanho, em kb dos fragmentos obtidos com a *Eco*RI, a partir das distâncias migradas.

7- Registar o valor obtido na tabela, na coluna correspondente a "bp calculado". Comparar com os valores reais.



ıre 6.4. Plot of log10 DNA fragment size (kb) listance migrated during agarose gel electrophor- (data from figure 6.3). Shown is a standard curve -HindIII fragments and the determination of the of an unknown fragment.

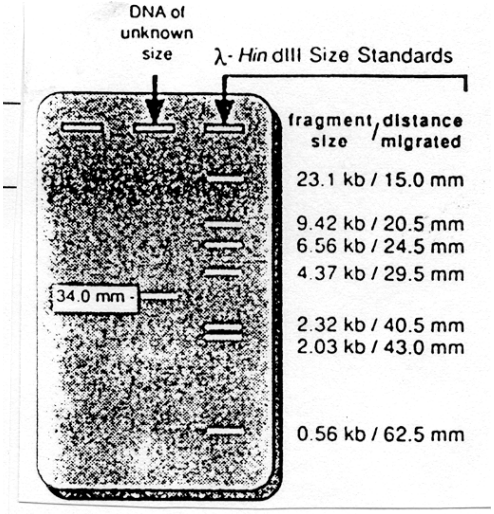
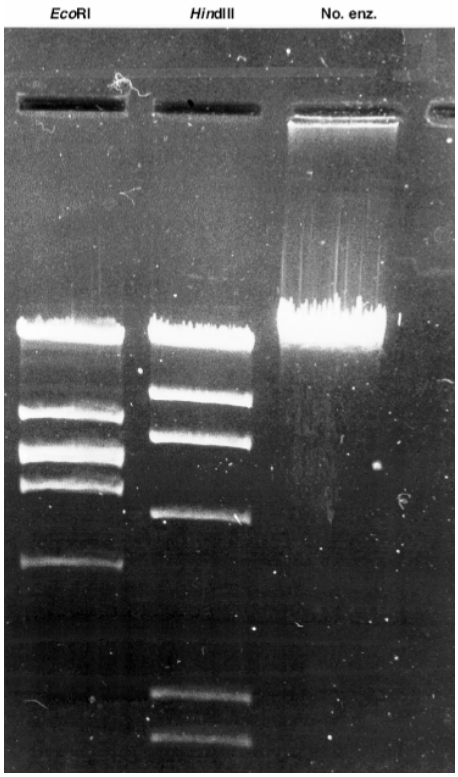
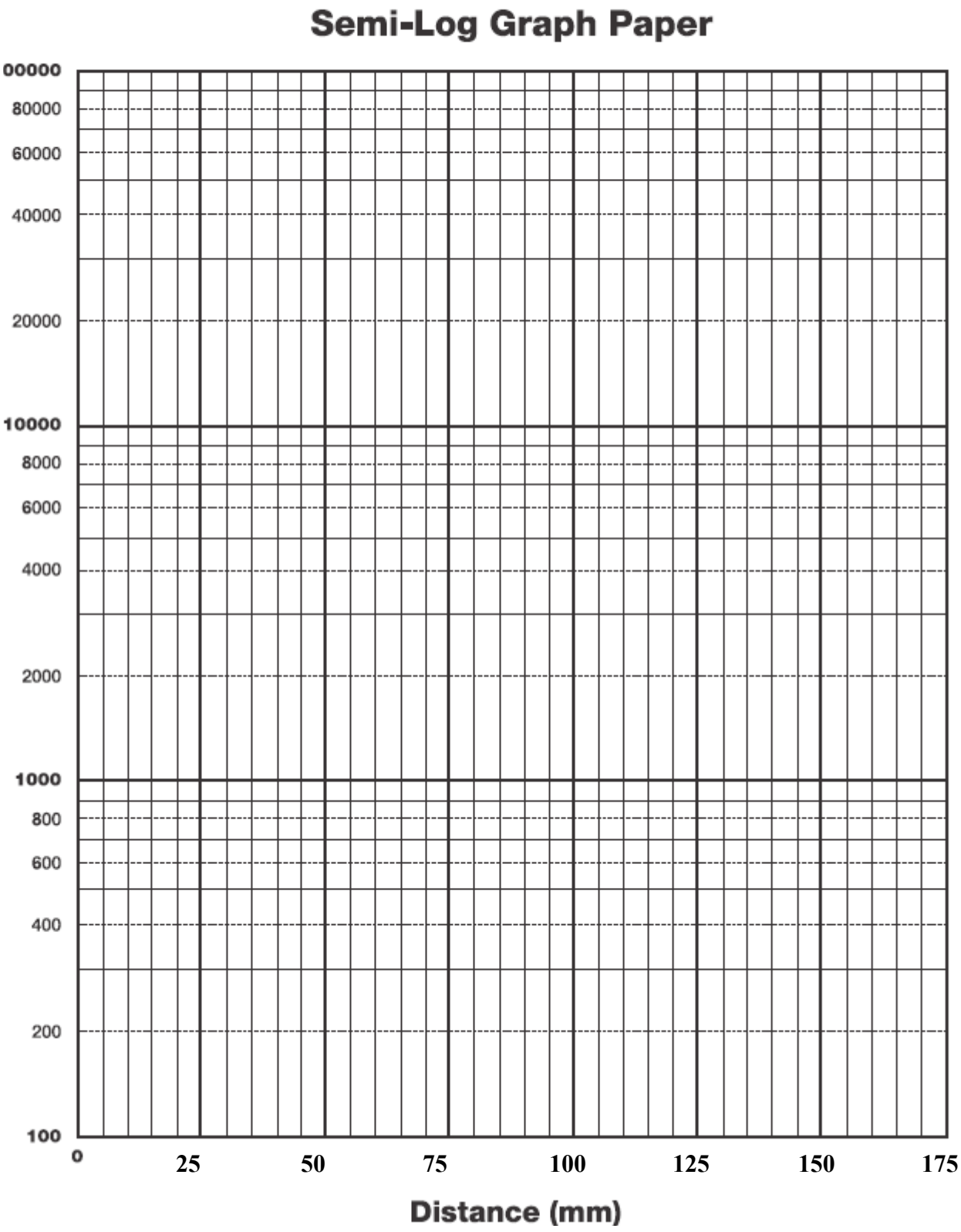


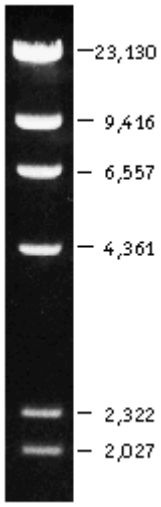
Imagem do gel obtido após electroforese de produtos de restrição do DNA de fago Lambda cortado com *Eco*RI, *Hin*d III e do DNA não cortado

Compare o número de bandas visíveis no gel com o número de bandas esperadas a partir do mapa de restrição da pág. 7.

Justifique as diferenças




Semi-Log Graph Paper
00000
80000
60000
40000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
1000
800
600
400
200
100
0
25
50
75
100
125
150
175
Distance (mm)



Estimating concentrations of DNA templates using Lambda DNA *Hin*dIII digest solution as a standard:
Total size of Lambda DNA: 48502 bp.
Concentration: 200ng/µl
Load on gel 10µl = 2000ng, 5µl = 1000ng, 2.5µl = 500ng

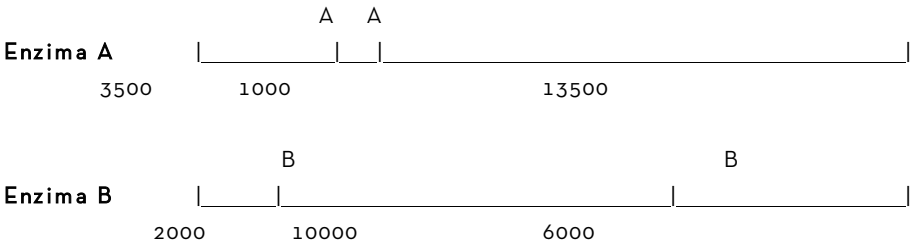
Band #	bp	% of total size	Load 2µg=__ng of DNA	Load 1µg=__ng of DNA	Load 0.5µg=__ng of DNA
1	23,130	47.69%	954ng	477ng	238.5ng
2	9,416	19.41%	388ng	194ng	97ng
3	6,557	13.52%	270ng	135ng	67.5ng
4	4,361	8.99%	180ng	90ng	45ng
5	2,322	4.79%	96ng	48ng	24ng
6	2,027	4.18%	84ng	42ng	21ng
7	564	1.16%	23ng	11.5ng	5.75ng
8	125	0.26%	5ng	2.5ng	1.25ng
Total	48502	100%	2000ng	1000ng	500ng

Exercício:

Partindo do facto que em condições normais só é bem visível uma banda de DNA com 10 ng de massa (visualizada com brometo de etídio/UV), qual será a **massa total** de DNA de lambda cortado com *Hin*d III a carregar no gel para que a banda de 125 bp fosse visível?

Exercício:

Na figura estão representados os mapas de restrição de um fragmento de DNA de 18 000 bp obtidos para a enzima de restrição **A** e para a enzima de restrição **B** respectivamente.



Faça os dois mapas de restrição possíveis do fragmento de DNA de 18 kb cortado com as duas enzimas **A e B.**

REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reacção em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) permite a amplificação de uma porção específica de DNA. Para poder efectuar esta reacção é necessário conhecer pequenas sequências nas extremidades do fragmento a amplificar (sequência alvo). O conhecimento destas sequências permite sintetizar dois oligonucleótidos complementares - iniciadores ou "primers". Em cada ciclo, o DNA é desnaturado por aquecimento (94ºC), seguidamente ocorre o emparelhamento dos oligonucleótidos (ex. 50-60ºC) e, posteriormente, a duplicação do DNA é catalisada por uma DNA polimerase resistente ao calor e purificada a partir da bactéria *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerase). Ciclos consecutivos vão permitir a amplificação da sequência alvo definida pelos 2 iniciadores.

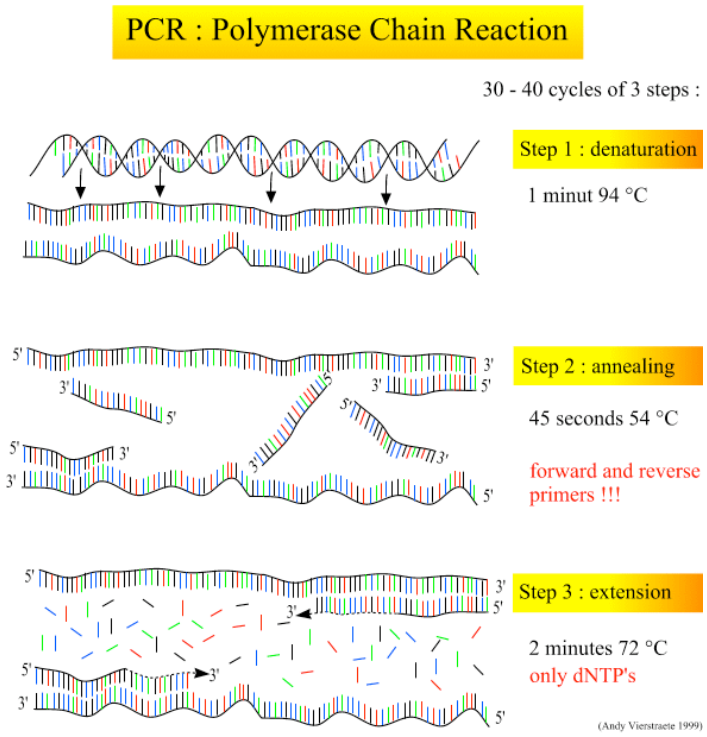


Figura 1 - Esquema representativo de um ciclo de PCR.

Neste trabalho será amplificado um fragmento de DNA (483 bp) do gene *hupL* da hidrogenase de assimilação (*uptake hydrogenase*) de Nostoc sp. PCC 7120 (ver Fig. 2)

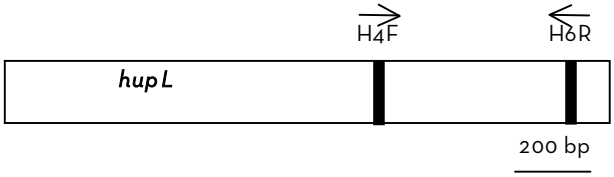


Figura 2 - Esquema representativo do gene hupL e dos locais de emparelhamento oligonucleótidos iniciadores (*primers*) a utilizar: H4F (a 5´, *forward*) e H6R (a 3´, *reverse*).

AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

Usar sempre material e soluções esterilizadas

1- Diluir o DNA fornecido para uma concentração de 5 ng/µL em água; manter o tubo em gelo.

2- Calcular os volumes a pipetar para um tubo de PCR e preencher a seguinte tabela:

Reagente	Volume a pipetar	[final]
H_2O estéril		----
Tampão de PCR 10 x[ii]	2 µL	1 x
dNTPs 2 mM	2 µL	0,2 mM
Oligonucleótido iniciador a 5' 1 µM	2 µL	0,1 µM
Oligonucleótido iniciador a 3' 1 µM	2 µL	0,1 µM
DNA		0.1-10 ng (cianobactérias)
Taq DNA Polimerase[iii]	0,2 µL	0,01 U/µL
Volume final	20 µL	----

3- Preparar um tubo controlo substituindo o DNA por água (controlo negativo).

4- Agitar e centrifugar brevemente para recolher o volume no fundo do tubos.

5- Colocar os tubos no termociclador e usar o programa seguinte:

Passo	Temperatura	Tempo	Nº ciclos
Desnaturação inicial	94 ºC	2'	--
Desnaturação	94 ºC	30''	35
Emparelhamento	55 ºC	30''	
Extensão	72 ºC	1'	
Extensão final	72 ºC	5'	--
Fim de reacção	6 ºC	∞	--

Separação electroforética dos produtos de PCR

Utilizar o gel de agarose preparado anteriormente aplicando 10 µl de produto de PCR (não esquecer de juntar tampão de amostra).

Observações: _____

[ii] Com $MgCl_2$ para obter uma concentração final de 1,5 mM na reacção.

[iii] À semelhança das enzimas de restrição, a *Taq* DNA Polimerase deverá ser adicionada em último lugar e só deverá sair do congelador na altura da pipetagem, devendo ser mantida sempre em gelo.

Segurança no manuseamento de Escherichia coli

Escherichia coli faz parte da flora intestinal normal e raramente pode estar associada a situações de doença grave em indivíduos saudáveis. Contudo, devem ser tomadas precauções para a **não ingestão** de *E. coli*, particularmente as transformadas com plasmídios.

As estirpes de *E. coli* geralmente utilizadas em clonagem de DNA são frequentemente derivadas da estirpe selvagem K-12 que não tem possibilidade de colonizar eficientemente o intestino humano, provavelmente devido a alterações genéticas acumuladas durante décadas de cultura *in vitro*.

O DNA plasmídico pode ser transferido de uma célula bacteriana a outra pelo processo de conjugação. Esse transporte requer uma proteína de mobilidade (codificada pelo gene plasmídico *mob*) e um local específico no plasmídio (*nic*). A proteína *mob* cria uma descontinuidade ("nick") no plasmídio, no local *nic*, e liga-se à cadeia interrompida, de modo a conduzir o plasmídio através do canal de conjugação. A maior parte dos plasmídios utilizados mais recentemente não possui o gene *mob* nem o local *nic* de modo que não podem ser mobilizados para transporte.

Cuidados no manuseamento de Escherichia coli

No início do trabalho, limpar a bancada com etanol 70% ou outro desinfectante adequado.
Não colocar a ponta da pipeta muito perto da boca ou nariz para evitar inalar aerossóis.
Para evitar contaminações, voltar a esterilizar os espalhadores ou ansas depois de os utilizar e antes de os pousar na mesa.
Manter o material utilizado com as bactérias (tubos, pontas de pipeta) separado do restante material e desinfectá-lo imediatamente: a) autoclavar a 121º durante 15 minutos ou b) imergir em lixívia a 10% durante 15 minutos.
No final, lavar as mãos e limpar a bancada com etanol 70% ou outro desinfectante adequado.

Nota: embora existam inúmeras estirpes de *E. coli* no ambiente, só um número muito reduzido é usado em laboratório. Estas são derivadas de uma estirpe ancestral K-12 que não apresenta problemas de segurança, dado que não se multiplica fora do meio de cultura, particularmente no tubo digestivo. Quando cultivadas em meio nutritivo apresentam uma elevada taxa de multiplicação, permitindo a obtenção de resultados rapidamente.

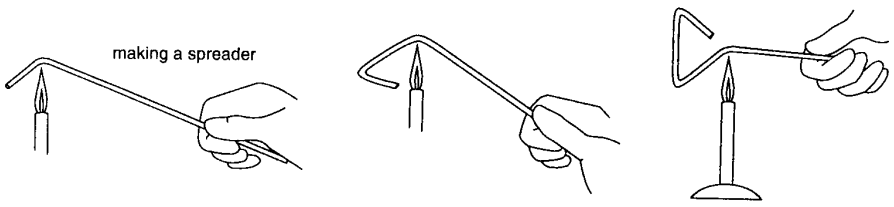


Figura 3- Como fazer um espalhador à chama a partir de uma barra de vidro ou pipeta de Pasteur

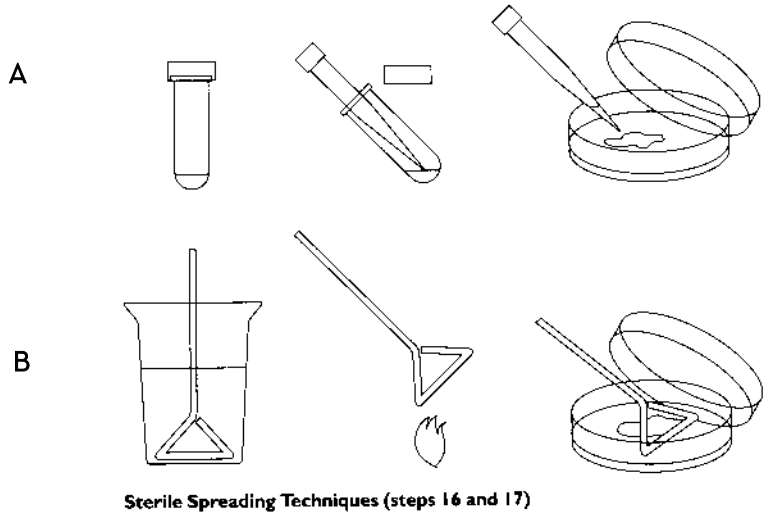


Figura 4 - Inoculação de uma placa de meio de cultura sólido com uma cultura líquida de bactérias utilizando um espalhador.

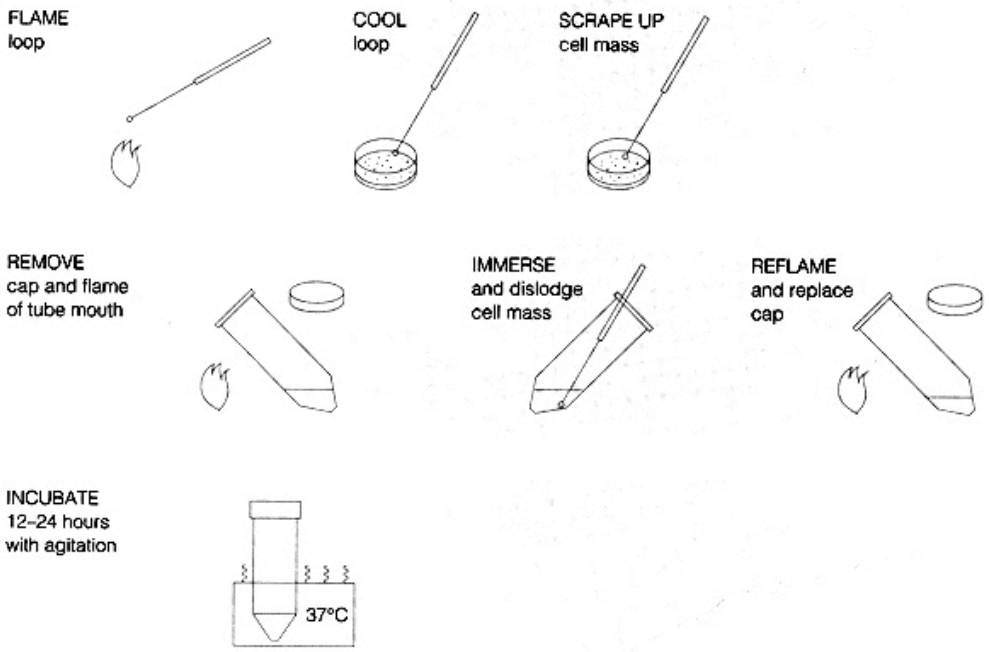
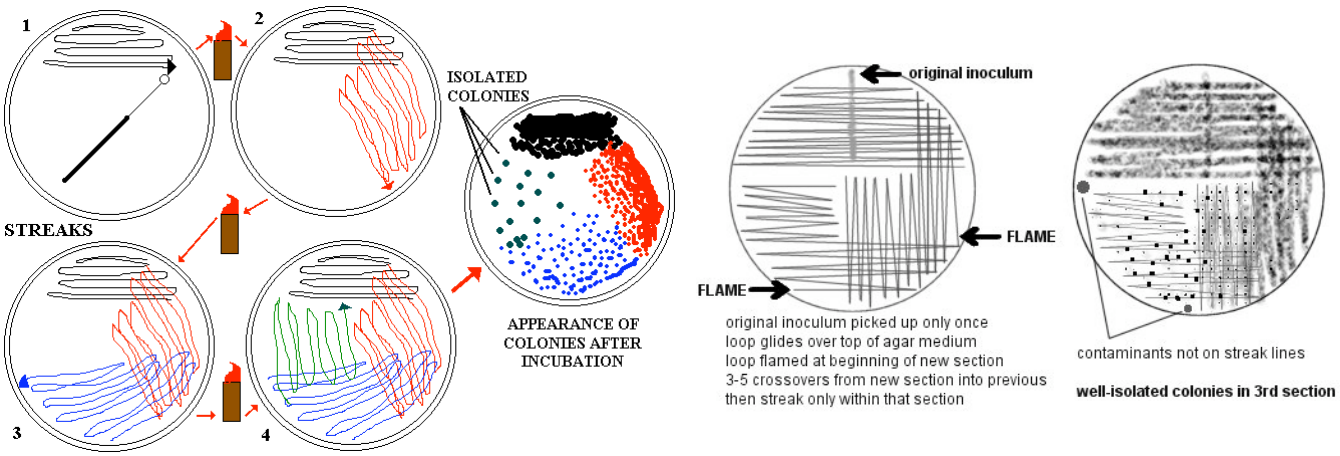


Figura 5 - Inoculação de uma cultura de *E. coli*.

A. Preparação de um riscado de *E. coli*

1- Perto da chama, inocular meio de cultura com agar (LB-agar), fazend
o um riscado de acordo com a figura apresentada, não esquecendo de flamejar a ansa antes de cada riscado.
2- Identificar na base da caixa a data, o tipo de inóculo (ex: estirpe bacteriana), o grupo e a turma.



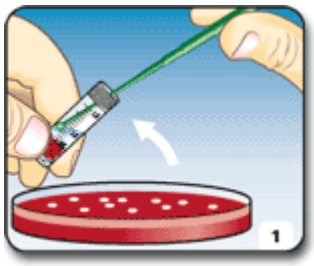
3- Incubar a caixa de Petri em posição invertida a 37 ºC durante a noite

4- Vedar a caixa com parafilme e conservar a 4 ºC em posição invertida até ser utilizada.

B. Preparação da cultura líquida de *E. coli*

1- Perto da chama seleccionar uma colónia isolada e recolhê-la com o auxílio de um objecto estéril (ansa, palito, ponta de micropipeta...).

2- Mergulhar a colónia seleccionada em 10 mL de meio de cultura líquido (LB) e agitar de modo a provocar a dispersão das bactérias no meio.



3- Incubar a 37 ºC com agitação constante durante a noite

Transformação de Escherichia coli

Transformação é a incorporação e expressão de DNA externo nas células bacterianas. Embora algumas bactérias tenham a capacidade de incorporar DNA a partir do meio, a maior parte não o consegue fazer. As células que têm esta capacidade designam-se por **células competentes**; contudo a competência natural é um fenómeno raro. Assim, é necessário desenvolver essa capacidade, ou seja, é necessário tornar as células competentes (ou mais competentes) para viabilizar a introdução de DNA.

Na **transformação química** clássica as células bacterianas são tornadas competentes por incubação numa solução fria de cloreto de cálcio, seguida de um choque térmico de curta duração já na presença do DNA a incorporar. Embora o mecanismo pelo qual as células se tornam competentes ainda não esteja totalmente esclarecido sabe-se que:

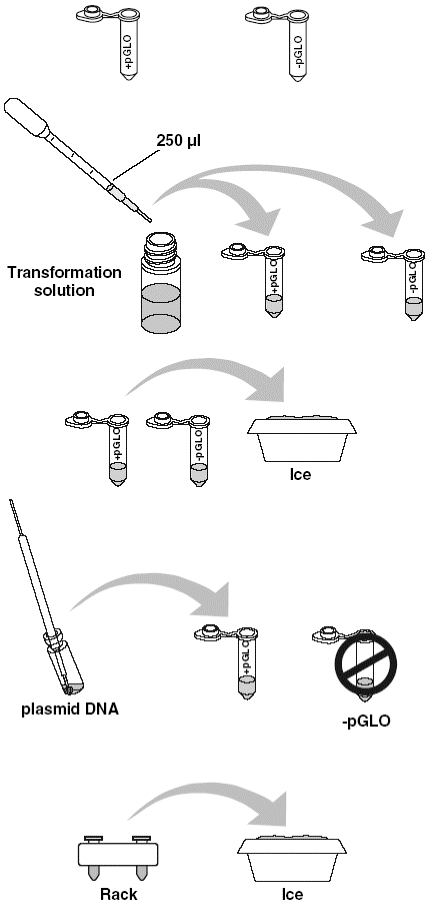
- o arrefecimento a 0ºC torna as membranas menos fluidas
- catiões (ex. Ca^{2+}) neutralizam as cargas negativas quer dos fosfolípidos da membrana celular quer dos grupos fosfato do DNA permitindo a aproximação do DNA a ser incorporado (ex. plasmídio)
- o choque térmico cria um desequilíbrio térmico que provavelmente cria uma corrente responsável pelo arrastamento do DNA para o interior célula bacteriana

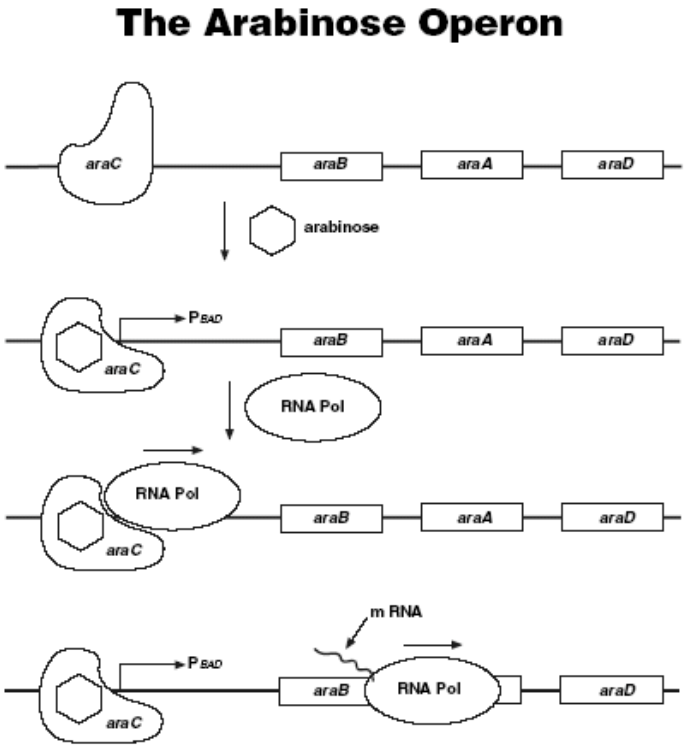
Após estes passos colocam-se as células em meio nutritivo a 37ºC para recuperarem e começarem a sintetizar proteínas.

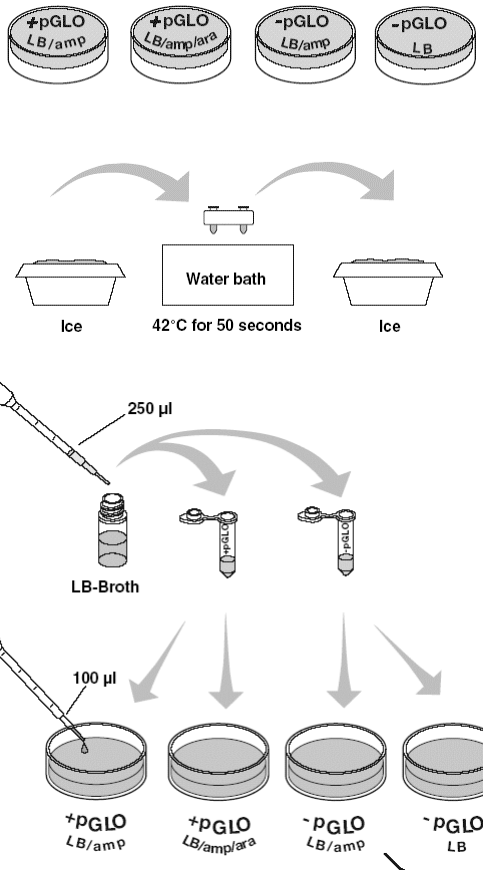
Operão ara

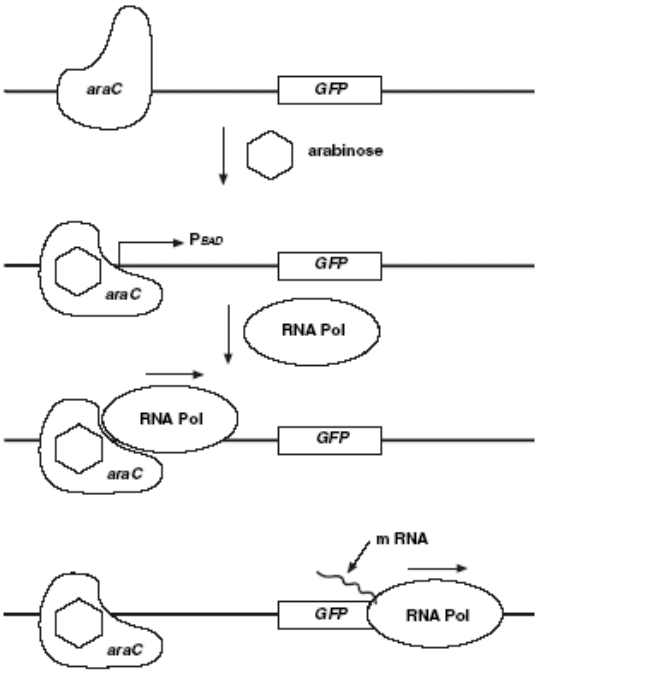
O operão da arabinose é constituído por três genes designados por *araA*, *araB* e *araD* que codificam três enzimas envolvidas no catabolismo da arabinose, um açúcar que é uma fonte de carbono e energia para as bactérias. Estes genes são transcritos a partir de um único promotor - P_{BAD}. A transcrição dos três genes requer a presença simultânea da RNA polimerase, da proteína AraC (codificada pelo gene *araC*) e da arabinose. Quando existe arabinose no meio a bactéria internaliza este açúcar que vai interagir com a proteína AraC alterando a sua conformação. A proteína AraC com a conformação modificada pela arabinose liga-se ao DNA favorecendo a ligação da RNA polimerase ao promotor P_{BAD} e consequentemente a transcrição dos genes.

Transformação com pGLO







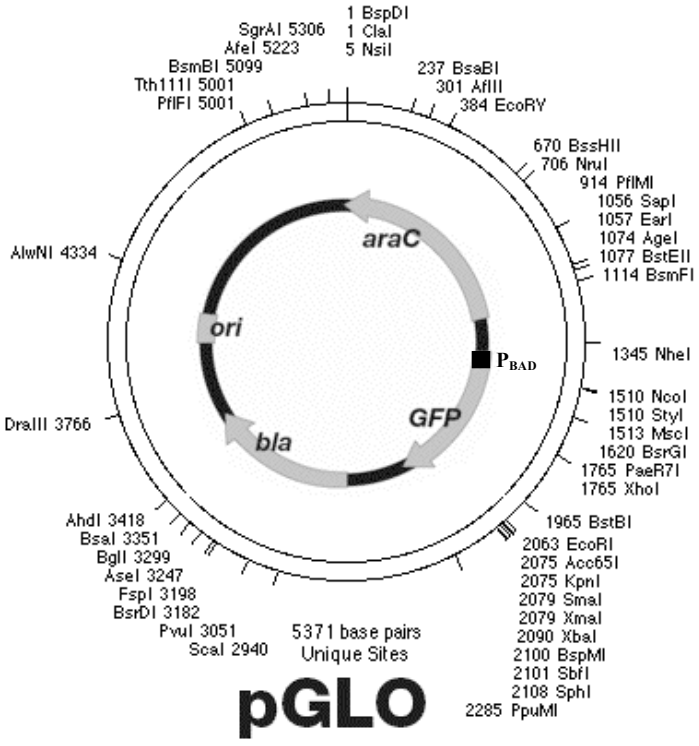


Plasmídio pGLO

O plasmídio pGLO tem 5,4 kb e contem:

- uma origem de replicação - *ori*
- o gene *GFP*, que codifica a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- o gene *bla*, que codifica a β-lactamase, uma proteína que confere resistência ao antibiótico ampicilina (marcador de selecção)
- o gene *ara*C, que codifica a proteína AraC
- o promotor P_{BAD}

O sistema de regulação da expressão da GFP no pGLO é semelhante ao do operão arabinose, uma vez que está sob o controlo do promotor P_{BAD} e da proteína AraC.



Análise dos resultados da transformação de E. coli com pGLO

Observar se houve ou não crescimento das bactérias e o tipo de crescimento (em filme (película) ou em colónias), a cor das bactérias na presença de luz UV. Registar os resultados na tabela.

Tabela 1 -

	-pGLO	+pGLO
LB		------
LB + AMP		
LB + AMP + ARA	------	

Observações: _____

_____