



Universidade do Minho

Departamento de Biologia
Mestrado em Bioempendedorismo e Biotecnologia de PAM

Ferramentas de Engenharia Genética
2009/2010

Protocolos das aulas práticas

Docente: Rui Oliveira

P1-Análise da actividade do promotor CTA1 com o gene repórter GFP

Ligação

1. Num microtubo fazer a seguinte mistura:
 - plasmídeo digerido 9,5µl
 - DNA "insert" 9,5µl
 - tampão de ligação (10x) 2,5µl
 - T4 DNA ligase (1U/µl) 1µl
 - água ultrapura 2,5µl
2. Incubar 3-4h a 16°C. Guardar a 4°C
3. Usar 2µl da mistura de ligação para transformar *E. coli* (ver protocolo abaixo) e espalhar em placas de LBamp diferentes diluições da suspensão celular

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore

Meios de cultura e soluções

Consultar as fichas técnicas do fabricante das enzimas.

Transformação de *Escherichia coli*

I) Preparação de células competentes

1. Inocular 50ml de meio LB (em Erlenmeyer de 250ml) com uma só colónia da estirpe de *E. coli*. Incubar durante a noite a 37°C, a 250rpm
2. Inocular 400ml de LB (em Erlenmeyer de 2000ml) com 4ml da cultura e incubar nas mesmas condições de temperatura e agitação até $DO_{600}=0,375$
3. Transferir a cultura para 8 tubos de 50ml de polipropileno pré-arrefecidos e deixar no gelo durante 5-10min
4. Centrifugar a 1600g durante 7min, a 4°C
5. Ressuspender lentamente cada sedimento em 10ml de solução de CaCl₂ gelada
6. Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C
7. Ressuspender cada sedimento em 10ml de solução de CaCl₂ gelada. Manter a suspensão em gelo durante 30min

8. Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C
9. Ressuspender cada sedimento em 2ml de solução de CaCl₂
10. Distribuir alíquotas de 250µl por microtubos esterilizados e arrefecidos
11. Congelar imediatamente a -70°C

II) Transformação das células competentes

12. Descongelar uma alíquota de células competentes em banho de gelo e colocar 100µl num microtubo arrefecido. manter no gelo
13. Adicionar 10ng de DNA (10 a 25µl) e misturar com movimentos circulares da ponta da micropipeta. Manter em gelo durante 10min
14. Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo num banho a 42°C e deixar durante 2min
15. Adicionar 1ml de meio LB. Incubar 60min, 37°C a 250rpm
16. Espalhar em placa de LB suplementado com o antibiótico apropriado (ampicilina). Incubar a 37°C durante 12 a 16 horas

Fazer um controle com células competentes sem adição de DNA

Eficiência esperada: 10⁷-10⁸ transformantes/µg pDNA

Referências

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore
- Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E. coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition. Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK

Meios de cultura e soluções

- Meio LB ("Luria broth")
 - triptona 1% (p/v)
 - extracto de levedura 0,5% (p/v)
 - NaCl 1% (p/v)
 - ajustar pH 7,5 com NaOHaq.
 - autoclavar 20min, 120°C, 1bar
- Solução de CaCl₂
 - CaCl₂ 60mM
 - glicerol 15% (p/v)
- LB sólido com ampicilina
 - meio LB

agar 2% (p/v)

autoclavar a 120°C, 1bar durante 20min

Antes da distribuição pelas placas, adicionar ampicilina 100mg/ml esterilizada por filtração, para uma concentração final de 100µg/ml. Guardar as placas a 4°C.

Purificação de plasmídeo de *Escherichia coli*

- 1 - Inocular 2ml de meio LBamp com uma colónia da estirpe bacteriana. Incubar a 37°C com agitação forte (~200r.p.m.) durante a noite
- 2 - Transferir 1,5ml da cultura para um microtubo e centrifugar a 12000g, 30seg a 4°C numa microcentrífuga
- 3 - Remover o sobrenadante por aspiração, deixando o sedimento o mais seco possível
- 4 - Ressuspender o sedimento em 100µl de solução I a 4°C. Agitar bem em vortex para completa dispersão do sedimento
- 5 - Adicionar 200µl de solução II. Misturar por inversão rápida do microtubo cinco vezes (não usar o vortex), assegurando-se que toda a superfície interna do microtubo tenha entrado em contacto com a solução. Colocar o microtubo em gelo
- 6 - Adicionar 150µl de solução III. Misturar mantendo o microtubo invertido e agitando lentamente com movimentos circulares durante ~10seg
- 7 - Centrifugar a 12000g, 5min a 4°C numa microcentrífuga. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo
- 8 - Precipitar o DNA com 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente. Misturar no vortex e incubar 2min à mesma temperatura
- 9 - Centrifugar a 12000g, 5min a 4°C numa microcentrífuga
- 10 - Aspirar lentamente o sobrenadante. Colocar o tubo em posição invertida sobre papel absorvente. Remover gotas de sobrenadante que tenham ficado aderidas às paredes do microtubo
- 11 - Lavar o sedimento de DNA com 1ml de etanol 70% a 4°C. Repetir o passo 10. Deixar o sedimento secar ao ar durante ~10min
- 12 - Dissolver o DNA em 50µl de tampão TE (contendo RNAase A 20µg/ml), misturando brevemente em vortex. Armazenar o DNA a 4°C

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore

Meios de cultura e soluções

- Meio LB com ampicilina (LBamp)
 - triptona 1% (p/v)
 - extracto de levedura 0,5% (p/v)
 - NaCl 1% (p/v)
 - Ajustar pH 7,5 com NaOHaq
 - Autoclavar 20min, 120°C, 1bar
 - Antes de distribuir o meio pelas placas e quando estiver a uma temperatura de 50°C-60°C, adicionar ampicilina 100mg/ml em água ultra-pura esterilizada para uma concentração final de 100µg/ml
- Solução I
 - Glucose 50mM
 - tris·HCl 25mM, pH8,0
 - EDTA 10mM, pH8,0
- Solução II
 - NaOH 0,2N (diluído previamente dum "stock" 10N)
 - SDS 1%
- Solução III
 - acetato de potássio 5M 60ml
 - ácido acético glacial 11,5ml
 - H₂O (ultra-pura) 28,5ml
- Tampão TE
 - Tris·HCl 10mM, pH8,0
 - EDTA 1mM, pH8,0

Digestão de DNA com enzimas de restrição

1. A um microtubo colocado no gelo adicionar:
 - 0,2-1µg de DNA
 - 2µl de tampão conveniente (10x conc.)
 - água ultrapura esterilizada q.b.p. 19µl
2. Misturar suavemente agitando no vortex. Manter o microtubo no gelo

3. Adicionar 1 μ l da enzima de restrição e agitar novamente como em 1
4. Incubar a mistura à temperatura conveniente de acordo com a enzima (normalmente a 37°C) durante ~1,5h
5. A reacção pode ser parada através da adição de EDTA 0,5M para uma concentração final de 10mM ou, no caso de se tratar duma enzima termolábil, através do aquecimento da mistura a 65°C durante 10-15min
6. Analisar os produtos da reacção em electroforese em gel de agarose

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore

Meios de cultura e soluções

Consultar as fichas técnicas do fabricante das enzimas.

Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* por electroporação

1. Inocular 50ml de meio YPD com uma só colónia da estirpe de levedura a ser transformada. Incubar durante a noite a 30°C, 160rpm
2. Colher as células por centrifugação 5min a 4000g
3. Ressuspender em 10ml de LiAc/DTT/TE e incubar 60min a 30°C
4. Adicionar 250 μ l de DTT 1M e incubar 30min a 30°C
5. Adicionar 40ml de água u.p. esterilizada gelada
6. Centrifugar 5min a 6000g e lavar com 25ml de água u.p. esterilizada gelada
7. Centrifugar 5min a 6000g e lavar com 5ml de sorbitol 1M gelado
8. Ressuspender em 50 μ l de sorbitol 1M gelado (manter sempre no gelo)
9. Adicionar 40 μ l das células e 5-7 μ l do plasmídeo a uma cuvette de electroporação (0.2 cm) e misturar. Colocar a cuvette no electroporador e pulsar a 1.5kV, 25 μ F, 200ohms
10. Adicionar de imediato 1ml de YPD, transferir para um microtubo eppendorff e incubar 4h a 30°C com agitação
11. Espalhar em placas contendo meio selectivo apropriado (YNBD com suplementos auxotróficos convenientes)

Fazer controle com células sem adição de DNA.

Eficiência esperada: 10^5 - 10^6 transformantes/ μ g pDNA.

Referências

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore

Materiais biológicos

- *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa*; *his3D1*; *leu2D0*; *met15D0*; *ura3D0*)
- Plasmídeo Pro41

Meios de cultura e soluções

•YPD

Extracto de levedura 1% (p/v)

peptona 2% (p/v)

glucose 2% (p/v)

•YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco)

YNB 0,67% (p/v)

glucose 2% (p/v)

agar 2% (p/v)

suplementos auxotróficos 40mg/L

Preparar o YNB, glucose e suplementos auxotróficos em solução concentrada 10x e esterilizar por filtração. Adicionar ao agar mais água esterilizados por autoclavagem para fazer o volume total antes da distribuição pelas placas.

•Solução LiAc/DTT/TE

8ml de água u.p esterilizada

1ml 10XTE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA, pH7.5)

1ml 1M LiAc (1M LiAC, pH7.5)

Indução da expressão da GFP sob regulação do promotor da catalase

1. Inocular 5ml de YNBDUra- em balão de 10ml ou tubo Falcon de 50ml com a estirpe de *S. cerevisiae* (BY4741) e incubar a 30°C, 200rpm
2. Lavar as células dos pré-inóculos por centrifugação em tubos Falcon de 15ml e ressuspender em igual volume de água desionizada esterilizada. Após nova centrifugação, eliminar o sobrenadante e ressuspender as células em 5ml do meio de cultura indicado de acordo com a tabela seguinte:

Grupo	Cultura
1	YNBMethUra-
2	YNBDUra-+H ₂ O ₂ 0,5mM
3	YNBDUra- (incubar a 39°C)
4	YNBEthUra-
	YNBDUra- (incubar a 30°C)

3. Transferir as culturas para Erlenmeyers esterilizados de 50ml
4. Logo após a transferência das células (t₀), retirar 15µl da cultura e colocar entre lâmina e lamela para observação por microscopia de fluorescência. Contar o número de células com fluorescência citoplasmática punctiforme (peroxissomas)
5. Incubar as culturas a 30°C, 180 rpm
6. Repetir o procedimento ao fim de 6h (t₆)

Materiais

- Material biológico: *Saccharomyces cerevisiae* estirpe BY4741 (MATa; *his3D1*; *leu2D0*; *met15D0*; *ura3D0*)
- Plasmídeo: Pro41 (derivado do Pca41)

Meios de cultura

- YNBMethUra-: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), metanol 0,5% (v/v), L-leucina 40mg/L
- YNBDUra- + H₂O₂ 0,5mM: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), L-leucina 40mg/L
- YNBDUra-: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), L-leucina 40mg/L
- YNBEthUra-: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), etanol 2% (p/v), L-leucina 40mg/L

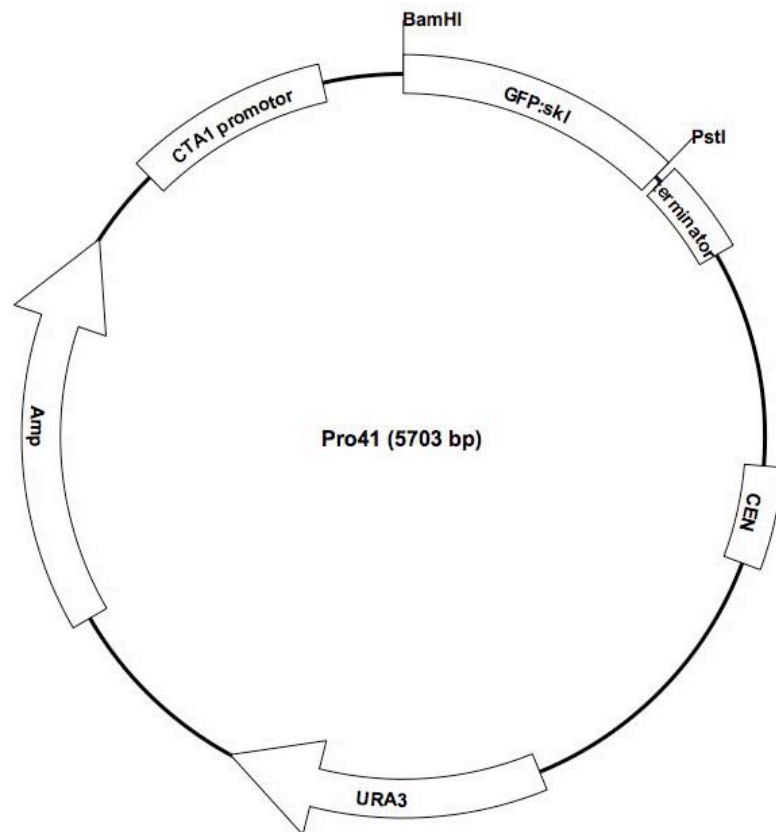


Fig. 1. Mapa do plasmídeo Pro41

P2-Análise da frequência de recombinação intracromossomal induzida por stresse oxidativo através do DEL “assay”

Ligação

1. Inocular 5ml de YNBDLeu- com uma colónia da estirpe RS112 (*S. cerevisiae*) e incubar 24h a 30°C, 200rpm
2. Diluir a cultura para $OD_{600}=0,1$ em meio fresco e voltar a incubar a 30°C até $OD_{600}=0,4$ (duas duplicações)
3. Colher 2,5ml da cultura para tubos Falcon de 50ml (2 tubos: ensaio e controlo) e centrifugar a 500rpm, 5min, 4°C
4. Lavar com 2,5ml de água desionizada gelada e centrifugar novamente
5. Ressuspender as células em 2,5ml de meio YNBDLeu- + L-leucina (40mg/ml) e adicionar o H₂O₂ para uma concentração final de 10mM. Incubar 10min a 30°C

6. Remover 100µl e fazer diluições seriadas até 10⁻⁴. Da diluição 10⁻⁴, remover e colocar 7 gotas de 40µl numa placa de meio YNBD e da diluição 10⁻¹, fazer o mesmo para uma placa de YNBDHis-
7. Incubar 2-3 dias a 30°C e contar as colónias de sobreviventes (YNBD) e de recombinantes (YNBDHis-). Calcular a percentagem de recombinação induzida pelo tóxico

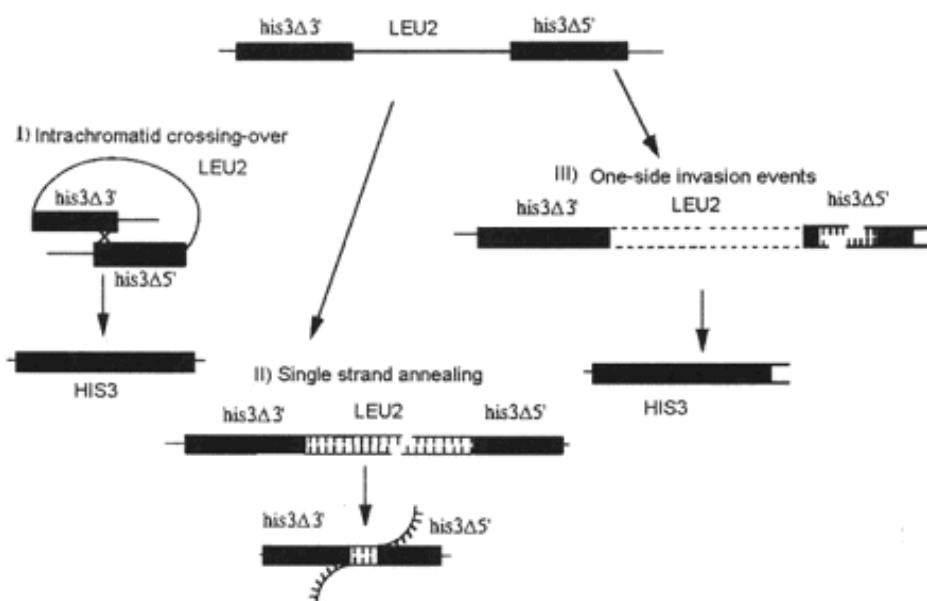


Fig. 2. Esquema das recombinações possíveis na “cassete” reporter do DEL “assay”

Referências

- Kirpnick *et al.*, 2005. Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research* 582:116-134

Materiais

- Material biológico: *Saccharomyces cerevisiae* estirpe RS112 (*MATA/MATα ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-Δ98 trp5-27/TRP5 arg4-3/ARG4 ade2-40/ade2-101 ilv1-92/ILV1 HIS::pRS6/his3Δ200 LYS2/lys2-801*)

Meios de cultura

- YNBD: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), uracilo 40mg/L, L-leucina 40mg/L, adenina 40mg/L
- YNBDHis-: Yeast Nitrogen Base without amino acids 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), uracilo 40mg/L, L-leucina 40mg/L, adenina 40mg/L
- YNBDLeu-: Yeast Nitrogen Base without amino acids 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), uracilo 40mg/L, L-histidina 40mg/L, adenina 40mg/L

P3-Reacção de PCR

1. Num microtubo de 0,2ml misturar:
 - água ultra-pura esterilizada - 35,75µl
 - tampão da polimerase (10x) - 5µl
 - MgCl₂ 25mM - 6µl
 - dNTPs (10mM cada) - 1,25µl
 - primer forward 100µM - 0,5µl
 - primer reverse 100µM - 0,5µl
 - DNA molde 0,1ng - 0,5µl
 - *taq* DNA polimerase (5U/µl) - 0,5µl
 - água ultra-pura esterilizada q.b.p. 50µl

Incluir um controle com todos os componentes da reacção excepto o DNA a amplificar

2. Misturar cuidadosamente os componentes da mistura com a micropipeta e manter no gelo até à transferência para o termociclador
3. Proceder à amplificação no aparelho de PCR por 30 ciclos de acordo com o seguinte programa:

Ciclo	Desnaturação	Emparelhamento	Polimerização
1º ciclo	5min a 94°C	2min a 56°C	3min a 72°C
Ciclos subsequentes	1min a 94°C	2min a 56°C	3min a 72°C
Último ciclo	1min a 94°C	2min a 56°C	8min a 72°C

4. Retirar uma amostra do DNA amplificado e analisar por electroforese em gel de agarose. Guardar o restante DNA a -20°C

Referências

- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore

Reagentes

- Todos os reagentes são fornecidos pelo fabricante que comercializa *taq* DNA polimerase e os dNTPs. Consultar ficha técnica do fabricante
- Primer "forward":

ACGATGAAGACTATGATCATAATGTTTCATGAAGCGGGCGATGAGGATTCGGAATATGAAAGttcccgctcac
gacgtt

- Primer “reverse”:

CTGGTATTAGATTAGCTGATTTGTGATTGGTAGTTGAAGCCATTTGTTGTGATGTTTGTGTTgtggaattgag
cggata

- DNA molde: “disruption cassette” (fig. 3)

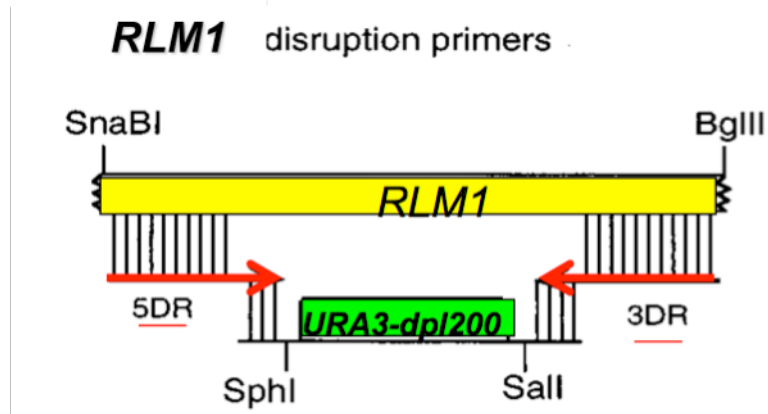


Fig. 3. Esquema da amplificação da “disruption cassette” do gene *RLM1* de *Candida albicans*. Amplicon de 1777bp.