

Universidade do Minho

**Departamento de Biologia**  
**Mestrado em Bioempendedorismo e Biotecnologia de PAM**

Ferramentas de Engenharia Genética  
2008/2009

Protocolos das aulas práticas

Docente: Rui Oliveira

## Construção de um plasmídeo com o gene da GFP sob regulação do promotor da catalase

### 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 durante a noite 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*, 2<sup>nd</sup> 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.

### 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*, 2<sup>nd</sup> 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
  - H<sub>2</sub>O (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 1µl 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*, 2<sup>nd</sup> 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  $CaCl_2$  gelada
6. Centrifugar a 1100g, 5min a 4°C
7. Ressuspender cada sedimento em 10ml de solução de  $CaCl_2$  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  $CaCl_2$
10. Distribuir alíquotas de 250 $\mu$ l 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 100 $\mu$ l num microtubo arrefecido. manter no gelo
13. Adicionar 10ng de DNA (10 a 25 $\mu$ l) 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:  $10^7$ - $10^8$  transformantes/ $\mu$ g 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*, 2<sup>nd</sup> 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 CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 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.

### **Transformação de *Saccharomyces cerevisiae***

1. Inocular 5ml de meio YPD com uma só colónia da estirpe de levedura a ser transformada. Incubar durante a noite a 30°C, 160rpm
2. Inocular 300ml de YPD em balão Erlenmeyer de 1000ml com a cultura de 5ml. Incubar a 30°C, 160rpm até DO<sub>600</sub> entre 0,3 e 0,5 (~1x10<sup>7</sup> células/ml)
3. Colher as células por centrifugação 5min a 4000g. Ressuspender em 10ml de água ultra pura e transferir para um tubo de centrífuga de polipropileno de 50ml
4. Centrifugar 5min a 6000g e rejeitar o sobrenadante
5. Ressuspender em 1,5ml de solução de lítio
6. Misturar 200µg de DNA "carrier" com 5µg de DNA para transformar num microtubo (o volume total de DNA não deverá exceder 20µl)
7. Adicionar 200µl da suspensão celular
8. Adicionar 1,2ml de solução de PEG e incubar com agitação a 30°C durante 30min
9. Provocar choque térmico de 42°C durante, exactamente, 15min
10. Centrifugar em microcentrífuga à máxima velocidade durante 5seg à temperatura ambiente
11. Ressuspender as células em 200µl de tampão TE e espalhar em placas contendo meio selectivo apropriado (YNBD com suplementos auxotróficos convenientes)

Fazer controle com células sem adição de DNA.

Eficiência esperada: 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> transformantes/µg pDNA.

## Referências

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

## Materiais biológicos

- *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa*; *his3D1*; *leu2D0*; *met15D0*; *ura3D0*)
- Plasmídeo Pro41
- "Carrier" DNA: DNA de esperma de salmão

## 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 de lítio:

Tampão TE, pH7,5 (10x) 1vol.  
acetato de lítio (10x) 1vol.  
água ultra-pura esterilizada 8vol

Tampão TE, pH7,5 (10X)

Tris·HCl 100mM, pH7,5

EDTA 10mM, pH7,5

Acetato de lítio (10x)

Acetato de lítio 1M, pH7,5 ajustado com ácido acético diluído

Esterilizar por filtração

### •Solução de PEG (polietilenolico)

PEG 4000 ou 3500 (esterilizado por filtração) 50% (p/v) 8vol.

tampão TE, pH7,5 (10x) 1vol.

acetato de lítio (10x)

•Tampão TE, pH7,5

Tris·HCl 10mM, pH7,5

EDTA 1mM, 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5mM
3	YNBDUra- (incubar a 39°C)
4	YNBOIUra-
	YNBDUra- (incubar a 30°C)

3. Transferir as culturas para Erlenmeyers esterilizados de 50ml
4. Logo após a transferência das células (t<sub>0</sub>), 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 (t<sub>6</sub>)

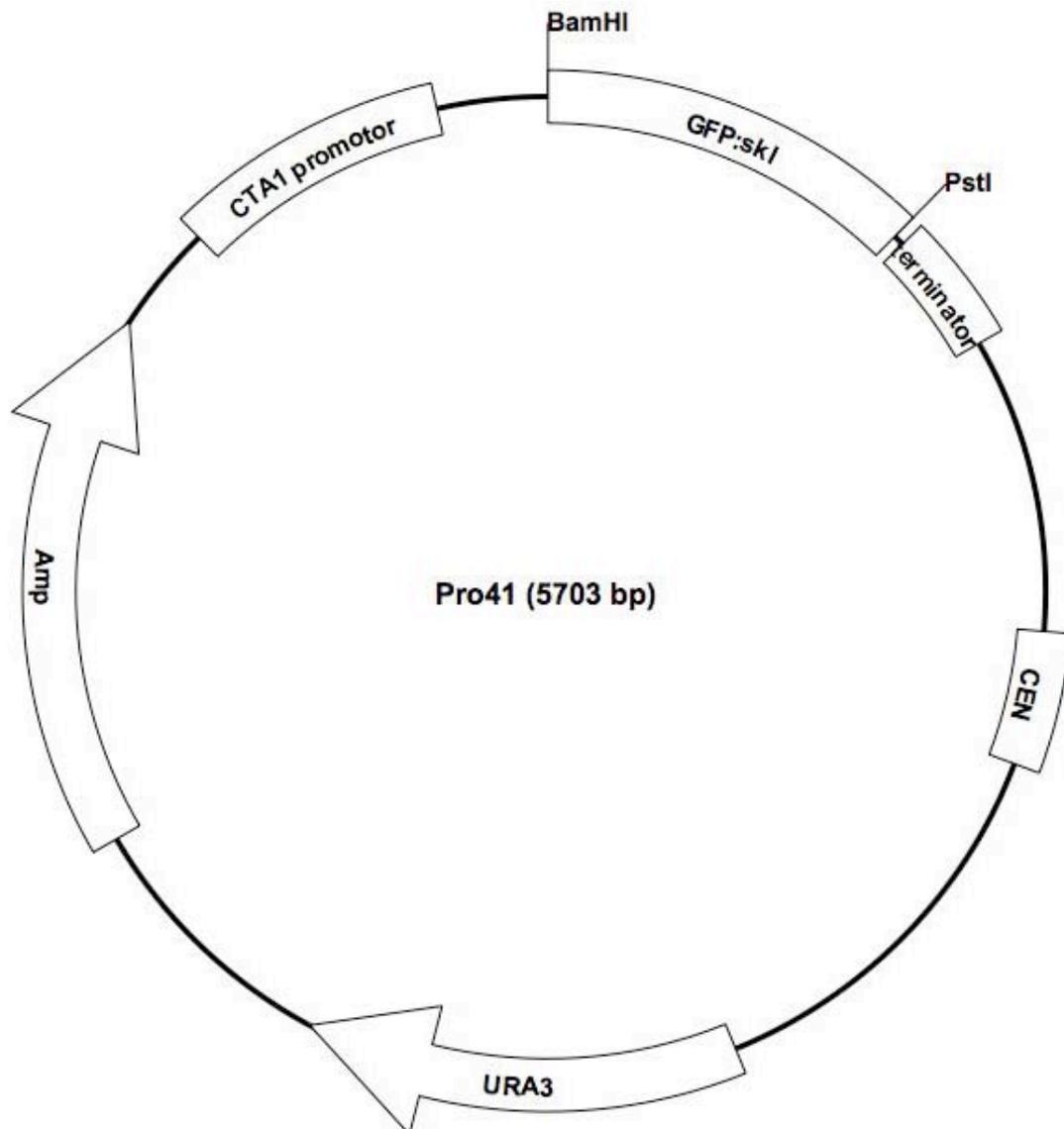
### Materiais

- 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- + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), L-leucina 40mg/L

- YNB/Ura-: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2% (p/v), L-leucina 40mg/L



## Expressão heteróloga de liticase

### Indução da expressão e purificação

1. Inocular *E. coli* DH5 $\alpha$  em meio LB-amp e incubar overnight
2. Fazer uma diluição de 1/1000 da cultura anterior em LB-amp e incubar até OD<sub>600</sub> 0,5
3. Adicionar IPTG para uma concentração final de 0,4mM
4. Incubar durante 5h a 37 °C
5. Centrifugar 200 mL da cultura anterior e ressuspender as células com 200 mL de 25mM Tris pH=7,4
6. Centrifugar e desprezar sobrenadante
7. Adicionar 8 mL de Tris - EDTA e 8 mL de Tris – Sacarose
8. Agitar gentilmente por 20 min
9. Centrifugar e desprezar o sobrenadante
10. Adicionar 8 mL de 0,5mM MgSO<sub>4</sub> e agitar gentilmente durante 20 min
11. Realizar uma nova centrifugação, transferir o sobrenadante para tubos eppendorf
12. Congelar rapidamente com azoto líquido e guardar a -80 °C

### Determinação da actividade da liticase

1. Inocular em meio YPD a estirpe BY4741 a 30 °C até OD<sub>600</sub> < 1
2. Centrifugar a cultura e lavar as células com água destilada
3. Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 50mM Tris pH=7,4 para uma OD<sub>600</sub>=5
4. Fazer tampão fresco Tris – DTT
5. Fazer uma mistura para OD<sub>600</sub> 0,2 de: 10 mL de Tris DTT + 9,2 mL de H<sub>2</sub>O + 0,8 mL de células
6. Remover 1 mL da mistura anterior e definir OD<sub>600</sub> obtido como ponto “zero”
7. Incubar, a 30 °C e durante 30 min 1 mL da mesma mistura com volumes de liticase obtida anteriormente (2, 5, 10, 15, 20 e 25  $\mu$ L)
8. Determinar a actividade (1 unidade de liticase = 10% de diminuição de OD<sub>600</sub> após 30min a 30°C)

### 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
- YPD
  - Extracto de levedura 1% (p/v)

- peptona 2% (p/v)
- glucose 2% (p/v)
- Tris-EDTA (25mM tris, 2mM EDTA)
  - Tris 50mM 25ml
  - EDTA 500mM 200 $\mu$ l
  - Água desionizada até 50ml
- Tris-sacarose (25mM tris, 40% sacarose)
  - Tris 50mM 25ml
  - Sacarose 20g
  - Água desionizada até 50ml
- Tris-DTT (100mM tris-HCl pH7,4, 1mM DTT)
  - Tris 1M 5ml
  - DTT 77mg
  - Água desionizada até 50ml