Universidade do Minho

Departamento de Biologia da Universidade do Minho

## Mestrado em Genética Molecular

# Biologia Molecular

## Bloco 1- Expressão Genética

Guião das aulas práticas

Margarida Casal
Cândida Lucas
Célia Ferreira
Cristina Aguiar
Sandra Paiva
Leonor Pereira
Neide Vieira
Jorge Padrão
Sílvia Calado
Rui Oliveira

Dezembro - Janeiro 2007

| | |
|---|---|
| LOCAL | As aulas terão lugar nos laboratórios do Departamento de Biologia e/ou no anfiteatro MICA. |
| CALENDARIZAÇÃO | ***Trabalhos práticos*** |
| 1ª – Aula – 3 Dez | *Doseamento de proteína total. Electroforese de proteínas.* |
| 2ª – Aula – 4 Dez | *Métodos cromatográficos para separação de proteínas.* |
| 3ª – Aula – 5 Dez | *Electroforese de proteínas (continuação).*<br>*Métodos de detecção de proteínas.* |
| 4ª - Aula – 10 Dez (teórica) | *Análise da proliferação peroxissomal induzida por alterações na cadeia respiratória mitocondrial* |
| 5ª - Aula – 11 Dez (Turma 1) | *Observação de peroxissomas marcados com GFP recombinante com sequência sinal de endereçamento peroxissomal por microscopia de fluorescência* |
| 6ª - Aula – 12 Dez (Turma 2) | |
| 1ª – Aula – 7 Jan | *Desenho de primers* in silico<br>*Amplificação da cassete de inserção de GFP por PCR* |
| 2ª – Aula – 8 Jan | *Preparação de células competentes de* S. cerevisiae<br>*Transformação de* S. cerevisiae |
| 3ª – Aula – 9 Jan | *Colony PCR*<br>*Observação da localização subcelular de proteínas recombinantes marcadas com GFP*<br>*Observação dos resultados da transformação*<br>*Discussão dos resultados* |
| 4ª – Aula – 14 Jan | *Colheita de amostras de células de* S. cerevisiae *expressando uma proteína* tagged |
| 5ª – Aula – 15 Jan | *Tratamento das amostras e obtenção dos extractos proteicos*<br>*Preparação do gel para SDS-PAGE* |
| 6ª – Aula – 16 Jan | *Corrida do SDS-PAGE*<br>*Transferência – Western Blotting*<br>*Incubação com anticorpo – Western Blotting*<br>*Revelação – detecção da presença da proteína nos extractos celulares – Western Blotting*<br>*Discussão dos resultados* |
| HORÁRIO | **9.00h às 12.00h e 14.00h às 18.00h** |
| AVALIAÇÃO<br>28, 29 e 30 Jan | *Apresentação oral de um seminário correspondente a resultados das aulas ou a um artigo científico*<br>*Participação nas aulas práticas obrigatória* |

# I. DOSEAMENTO DE PROTEÍNA TOTAL

## A. MÉTODO DE LOWRY

**1.** Preparar os tubos indicados na tabela que se segue:

| Tubos | BSA (µg) | Amostra (µl) | $H_2O$ (µl) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | - | qbp volume final = 200 µl |
| 2 | 40 | - | |
| 3 | 100 | - | |
| 4 | 200 | - | |
| 5 | 400 | - | |
| 6 | 600 | - | |
| 7 | - | 20 | |
| 8 | - | 40 | |
| 9 | - | 60 | |

**2.** Adicionar 1 ml de solução A e misturar de imediato no vórtex. Incubar 10 min à temperatura ambiente.

**3.** Entretanto, preparar a solução B.

**4.** Adicionar 100 µl de solução B a cada tubo e misturar de imediato no vórtex. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente.

**5.** Transferir o conteúdo dos tubos para cuvettes de plástico de 1,5 ml. Ler a absorvância a 750nm.

**6.** Construir a curva padrão e determinar a concentração de proteína total presente na amostra.

*Soluções:*

**Solução A**

15 ml $Na_2CO_3$ 2% (p/v, em NaOH 0,1M)
150 µl $CuSO_4.5H_2O$ 1% (p/v)
150 µl tartarato duplo de sódio e potássio 2% (p/v)

**Solução B**

600 µl Reagente de Folin-Ciocalteau
600 µl água ultra-pura

## B. MÉTODO DE BRADFORD

Utilizar o *kit* Bio-Rad Protein Assay [Bio-Rad] de acordo com as instruções do fabricante.

**1.** Preparar os tubos a seguir indicados:

| Tubos | BSA (µg) | Amostra (µl) | $H_2O$ (µl) |
|---|---|---|---|
| 1 | 1 | - | qbp volume final = 800 µl |
| 2 | 2 | - | |
| 3 | 4 | - | |
| 4 | 8 | - | |
| 5 | 10 | - | |
| 6 | 16 | - | |
| 7 | 18 | - | |
| 8 | 20 | - | |
| 9 | - | 5 | |
| 10 | - | 10 | |
| 11 | - | 20 | |

**2.** Adicionar 200 µl do reagente fornecido com o *kit*. Misturar no vórtex e aguardar 10 min.

**3.** Transferir as amostras para cuvettes e proceder à leitura da absorvância a 595nm.

**4.** Construir a curva padrão e determinar a concentração de proteína total presente na amostra.

## II. ELECTROFORESE DE PROTEÍNAS EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

**Todas as etapas deste protocolo deverão ser executadas usando luvas. A manipulação de acrilamida deve ser feita com extrema precaução, uma vez que se trata de um poderoso agente neurotóxico e cancerígeno.**

**1.** Limpar cuidadosamente com álcool todas as partes do sistema de electroforese que irão estar em contacto com o gel de poliacrilamida (vidros, separadores, etc).

**2.** Proceder à montagem do suporte do gel.

**3.** Preparar as soluções do gel concentrador e do gel de resolução de acordo com a tabela que se segue, adicionando todos os componentes excepto o persulfato de amónio. Este só deverá ser adicionado imediatamente antes da aplicação do gel entre os vidros.

Tabela 1. Preparação do gel de poliacrilamida utilizado em SDS-PAGE

| | Gel concentrador | Gel de resolução |
|---|---|---|
| Soluções | 3,75% | 10% |
| Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8) | 2 ml | 6 ml |
| Tris-HCl 1,5 M; pH 6,8 | 5 ml | - |
| Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8 | - | 5 ml |

| | | |
|---|---|---|
| SDS 10% | 0,2 ml | 2 ml |
| Água ultrapura | 12 ml | 8,7 ml |
| Persulfato de amónio 1,5% (solução extemporânea) | 0,1 ml | 0,1 ml |
| TEMED | 20 µl | 10 µl |

**6.** Adicionar o perssulfato de amónio ao gel concentrador e homogeneizar cuidadosamente. Pipetar esta mistura, de imediato, para o topo do gel de resolução, até cerca de 1 cm do limite superior dos vidros.

**7.** Introduzir então o pente e perfazer o volume com gel concentrador, evitando a retenção/formação de bolhas de ar. Aguardar que o gel polimerize. Entretanto, proceder ao tratamento das amostras.

**8.** Adicionar, às amostras a aplicar no gel, igual volume de tampão de aplicação (2x) e incubar a 100ºC durante 5 min.

**9.** Deixar que as amostras arrefeçam. Entretanto, proceder à montagem do sistema de electroforese, colocando o tampão de electroforese.

**10.** Proceder à aplicação dos padrões de peso molecular e das amostras, tendo o cuidado de lavar bem as seringas com água e álcool entre as aplicações.

**11.** Programar a fonte de alimentação do sistema para 100 V e promover a electroforese até as amostras estarem completamente no gel de resolução.

**12.** Aumentar então a voltagem para 180 V e deixar correr até que a frente de migração atinja o limite inferior do gel.

*Soluções:*

**Tampão de aplicação (2x); pH 6,8**

Tris-HCl 125 mM
Glicerol 20% (p/v)
SDS 4% (p/v)
Azul de bromofenol 0,01% (p/v)
β-mercaptoetanol 1% (v/v)

**Tampão de electroforese; pH 8,3**

Tris-HCl 25 mM; pH 8,3
SDS 0,1% (p/v)

## III. MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS

**Executar todas as etapas em material de vidro, corando um gel por tina. Colocar as tinas de vidro no agitador orbital, com agitação suave. Se for necessário tocar no gel, usar uma luva sobre a luva de látex.**

## A. COLORAÇÃO DE COOMASSIE

**1.** Após electroforese colocar o gel na solução de coloração e incubar 15 min sob agitação.

**2.** Remover a solução anterior e substituir pela solução de descoloração.

**3.** Incubar sob agitação até aparecimento das bandas e remoção completa da coloração inespecífica.

**4.** Descartar a solução anterior e conservar o gel em água.

*Soluções:*
**Solução de coloração**
**Azul de Coomassie (R 250) 0,25% (p/v)**
**Metanol 50% (v/v)**
**Ácido acético 10% (v/v)**

**Solução de descoloração**
**Metanol 25% (v/v)**
**Ácido acético 5% (v/v)**

## B. COLORAÇÃO DE COBRE

**1.** Após electroforese colocar o gel na tina de coloração.

**2.** Adicionar a solução de coloração, preparada no momento, e incubar 15 min sob agitação.

**3.** Descartar a solução anterior e cobrir o gel com água destilada.

**4.** Conservar o gel em água destilada.

*Soluções:*
**Solução de coloração**
**$CuCl_2$ 0,3M (p/v) em água destilada**

## C. COLORAÇÃO DE SCHIFF

**1.** Após electroforese mergulhar o gel na solução de ácido acético e incubar durante 30 min à temperatura ambiente.

**2.** Descartar a solução anterior e incubar o gel em ácido periódico, durante 60 min a 4ºC.

**3.** Descartar a solução anterior e incubar o gel na presença de Reagente de Schiff, durante a noite, a 4ºC e no escuro.

**4.** Descartar a solução anterior e incubar o gel na presença de nova solução de ácido acético durante 60 min à temperatura ambiente.

**5.** Remover a solução anterior e conservar o gel em água destilada.

*Soluções:*
**Solução de ácido acético**
**Ácido acético 7,5% (v/v)**

**Solução de ácido periódico**
**Ácido periódico 0,2% (p/v)**

**Reagente de Schiff**

## D. COLORAÇÃO PELO NITRATO DE PRATA

**1.** Após electroforese colocar o gel em solução de fixação durante 60 min, à temperatura ambiente (se necessário, deixar durante a noite).

**2.** Remover a solução anterior e incubar 60 min em solução de metanol

**3.** Descartar a solução de metanol e adicionar água ultra-pura, incubando durante 10 min. Repetir esta lavagem duas vezes mais.

4. **Substituir a água por um pouco de solução de tiossulfato de sódio e incubar 15 min. Substituir por nova solução de tiossulfato sódico e incubar durante 2h30m.**

**5.** Rejeitar a solução anterior e enxaguar em água ultra-pura (3 x 10 min).

**6.** Descartar a água e colocar o gel em solução de coloração durante 60 min.

**7.** Rejeitar a solução anterior e enxaguar em água ultra-pura (2 x 1 min).

8. **Rejeitar a água e colocar em solução redutora. Substituir esta solução por nova solução logo que fique amarelada e incubar até adquirir a intensidade de coloração desejada.**

**9.** Substituir a solução anterior pela solução de paragem.

**10.** Descartar a solução de EDTA e substituir por água.

*Soluções* (preparar cerca de 100 ml de cada solução para cada gel):
**Solução de fixação**
Metanol 50% (v/v)
Ácido acético 5% (v/v)

**Solução de metanol**
Metanol 50% (v/v)

**Solução de tiossulfato**
Tiossulfato de sódio 0,02% (p/v)

**Solução de coloração**
Nitrato de prata 0,1% (p/v)

**Solução redutora** (preparada no momento)
Formaldeído 0,04% (v/v)
Carbonato de potássio 2% (p/v)

**Solução de paragem**
**EDTA 1,46% (p/v)**

## E. MÉTODO DE COLORAÇÃO RÁPIDA PELO NITRATO DE PRATA

**1.** Após electroforese colocar o gel em solução de fixação e levar ao micro-ondas durante 1 min.

**2.** Lavar brevemente com água ultra-pura.

3. **Adicionar a solução de DTT e colocar no micro-ondas 1min.**

**4.** Rejeitar a solução anterior e adicionar a solução de coloração e levar ao micro-ondas 1min. Agitar, de seguida, durante 2 min.

5. **Rejeitar a solução anterior e colocar em solução redutora. Logo que fique acastanhada, descartar e adicionar nova solução. Incubar até adquirir a intensidade de coloração desejada.**

**6.** Substituir a solução anterior pela solução de paragem.

*Soluções* (preparar cerca de 100 ml de cada solução para cada gel):
**Solução de fixação**
Metanol 40% (v/v)

Etanol 10% (v/v)

**Solução de DTT**
DTT 32 mM

**Solução de coloração**
Nitrato de prata 0,1% (p/v)

**Solução redutora** (preparada no momento)
CH2O 0,04% (v/v)
$Na_2CO_3$ 3% (p/v)

**Solução de paragem**
Metanol 50% (p/v)

## IV. SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO TROCADORES IÓNICOS (*em batch*)

**1.** Homogeneizar a suspensão de resina e transferir 1 ml para (A) um tubo Falcon ou para (B) uma seringa de plástico de 2,5ml contendo um pouco de lã de vidro no fundo.

**2.** Lavar a resina adicionando 10 ml de tampão de lavagem.

**3.** No caso (A) agitar lentamente, centrifugar durante 5 minutos a 1500*g* e 4ºC e descartar o sobrenadante. No caso (B) aguardar que o volume adicionado escorra completamente.

**4.** Equilibrar a resina com 10 ml de tampão de equilíbrio. Repetir o procedimento **3**.

**5.** Repetir o procedimento **4**.

**6.** Adicionar 1 ml de amostra e, no caso (A), promover a adsorção entre a amostra e a resina durante 30 min, sob agitação lenta e constante. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 *g* e 4ºC e transferir o sobrenadante para um tubo Eppendorf (A1).
No caso (B) recolher todo o volume num tubo Eppendorf (B1) após passagem na coluna.

**7.** Adicionar 1 ml de tampão de lavagem e, no caso (A), misturar sob agitação lenta e constante durante 30 min. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 *g* e 4ºC e transferir este sobrenadante para um novo tubo Eppendorf (A2).
No caso (B) recolher todo o volume do tampão de lavagem num tubo Eppendorf (B2) após passagem na coluna.

**8.** Adicionar 1 ml de tampão de eluição e, no caso (A), misturar sob agitação lenta e constante durante 30 min. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 *g* e 4ºC e transferir este sobrenadante para um novo tubo Eppendorf (A3).
No caso (B) recolher todo o volume do tampão de eluição num tubo Eppendorf após passagem na coluna (B3).

Quer no caso (A) quer no (B) são obtidas três fracções diferentes, correspondentes ao material que não adsorveu à resina **(1)**, à lavagem da matriz **(2)** e ao material eluído **(3)**.

**9.** Se pretender utilizar mais que um tampão de eluição (gradiente de pH ou sal, por exemplo), repetir o procedimento **8.** o número de vezes considerado necessário (A3a, A3b, … ou B3a, B3b, …).

**10.** Analisar as fracções obtidas em SDS-PAGE e proceder à quantificação de proteína total.

*Soluções:*
**Tampão de equilíbrio e de lavagem**
Tris 25 mM, pH 7,6

**Tampões de eluição**
Tris 25 mM, pH 7,6 + NaCl 0,3M
Tris 25 mM, pH 7,6 + NaCl 0,6M
Tris 25 mM, pH 7,6 + NaCl 1M

## *Adaptação metabólica em resposta a alterações da cadeia respiratória mitocondrial. O papel da via de regulação retrógrada em* Sacharomyces cerevisiae

Docente: Rui Oliveira
10, 11 e 12 Dez/2007

### Procedimento

- Preparação das culturas. 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 10ml do meio de cultura indicado de acordo com a tabela seguinte

| Grupo | Cultura |
|---|---|
| 1 | YNBR |
| 2 | YNBR + antimicina 1μg/ml |
| 3 | Usar a cultura fornecida (YNBD) sem transferência de células |
| 4 | YNBD |

- Transferir as culturas para Erlenmeyers esterilizados de 50ml
- 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 peroxissomas de 20 células escolhidas ao acaso
- Incubar as culturas a 30ºC, 180 r.p.m.
- Repetir o procedimento ao fim de 3h (t3)

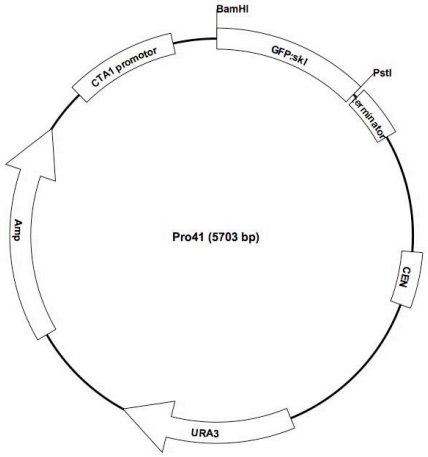
- Após a remoção da alíquota em t3, dividir a cultura por dois Erlenmeyers (2 balões de 25ml com 5ml de meio cada) adicionar a um deles um composto de acordo com a tabela seguinte

| Grupo | Adição à cultura (concentração final) |
|---|---|
| 1 | Antimicina 1μg/ml |
| 1 | s/ antimicina |
| 2 | Glutamato 0,2% (p/v) |
| 2 | s/ glutamato |
| 3 | Glutamato 0,2% (p/v) |
| 3 | s/ glutamato |
| 4 | Antimicina 1μg/ml |
| 4 | s/ antimicina |

- Continuar a incubação nas mesmas condições
- Fazer novas contagens de peroxissomas 1h (t4) e 3h (t6) após a adição do composto

## Materiais

Material biológico: *Saccharomyces cerevisiae* estirpe BY4741 (*MAT*a; *his3*D1; *leu2*D0; *met15*D0; *ura3*D0)
Plasmídeo: Pro41 (derivado do Pca41)




Meios de cultura:

- YNBR; Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), rafinose 2%
- YNBD; Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), glucose 2%

## Referências

Epstein CB, Waddle JA, Hale W 4th, Davé V, Thornton J, Macatee TL, Garner HR, Butow RA. 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* **12**(2):297-308

Liu Z, Butow RA. 1999. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* **19**(10):6720-8

Marshall PA, Dyer JM, Quick ME, Goodman JM. 1996. Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J Cell Biol* **135**(1):123-37

van Roermund CW, Drissen R, van Den Berg M, Ijlst L, Hettema EH, Tabak HF, Waterham HR, Wanders RJ. 2001. Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-

chain fatty acid beta-oxidation and normal peroxisome proliferation in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **21**(13):4321-9

## Análise funcional de genes.

## Interrupção génica em *Saccharomyces cerevisiae*

Nesta série de experiências vamos contactar com algumas das ferramentas disponíveis para realizar a análise funcional de genes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Do programa de sequenciação do genoma da levedura terminado em 1996, na Europa estabeleceu-se uma rede de pesquisa, denominada EUROFAN, *European Functional Analyses Network*, http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/index.html com o objectivo de efectuar a análise sistemática da função de todos os genes encontrados. Actividades paralelas foram realizadas no Canadá, Japão e EUA. Destes esforços nasceu uma abordagem comum, a delecção de genes individuais através de técnicas de interrupção génica. A técnica adoptada, de custo relativamente baixo e elevada eficácia e precisão, tem vindo a permitir a produção de mutantes nulos em todos os genes. Estes materiais constituem uma fonte de trabalho muito importante para a comunidade científica no que se refere à análise funcional do genoma, bem como no que respeita ao mapeamento funcional do genoma de outros organismos superiores, tendo como referência o da levedura. Durante mais de 8000 anos, que esta espécie tem desempenhado um papel central na produção e conservação de alimentos devido à sua capacidade de fermentar glucose a etanol e dióxido de carbono. O papel de *S. cerevisiae* como um modelo eucarionte deve-se em grande parte às suas vantagens como sistema experimental. É um organismo unicelular simples, que, ao contrário de muitos eucariontes mais complexos, pode ser mantido, a baixos custos, em meio definido, dando ao investigador um controlo completo sobre o seu ambiente físico e químico. Na aula prática vamos realizar a técnica de "*PCR - generated short flanking homology*", descrita por Wach e colaboradores em 1994.

## Construção de cassettes de delecção

Usa-se o modulo de resistência dominante, KanMX4, contendo a ORF $Kan^r$ do transposão

*Tn* 903 de *E. coli*, que codifica para a enzima aminoglicosil fosfotransferase incluído no plasmídeo pFA6a-KanMX4 (Wach *et al*., 1994), para interromper a sequência codificante da levedura e seleccionar transformantes de *S. cerevisiae*. A enzima aminoglicosil fosfotransferase fosforila e inactiva antibióticos aminoglicosídicos que contenham um grupo 2-deoxiestreptamina, na posição 3´hidroxil, nomeadamente, a geneticina (G418). A actividade desta enzima torna, assim, *S. cerevisiae* resistente à geneticina. Recorre-se à tecnologia de PCR para construir as *cassettes* de delecção usando pequenas sequências flanqueadoras homólogas ao local alvo (SFH-PCR, "s*hort flanking homology PCR*").

## Síntese por PCR de fragmentos de DNA com pequenas sequências ladeadoras homólogas ao local alvo

Para cada ORF é desenhado um par de primers híbridos (S1 e S2) com cerca de 40 a 45 bases homólogas ao gene de interesse e 18 a 19 bases homólogas à região do *polylinker* do plasmídeo pFA6a-KanMX4 (figura 4). O primer S1 é composto por 40 a 45 bases homólogas com a sequência codificante na extremidade 5' da ORF que se pretende interromper e por 18 a 19 bases homólogas ao polylinker do plasmídeo (5' do módulo KanMX4). O primer S2 consiste em 40 a 45 bases homólogas com a sequência não codificante na extremidade 3' da ORF e por 18 a 19 bases homólogas ao polylinker do plasmídeo (3' do módulo KanMX4).

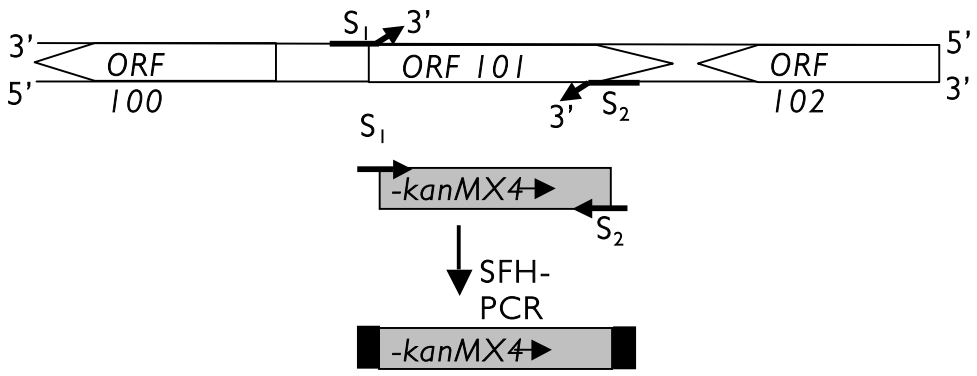



Figura 1 – Esquema da técnica SFH-PCR.

***Procedimento:***

- Preparar a mistura reaccional (100$\mu$l).

Tampão 1X

2,5 mM $MgCl_2$

0,2 mM dNTP

1 μM de cada *primer*

1 U taq DNA polimerase

0,3 μg plasmídeo pFA6a-KanMX4

- A mistura, depois de agitada no *vortex*, é sujeita a PCR nas seguintes condições:

| | | |
|---|---|---|
| 120 segundos, 94°C | (desnaturação inicial) | Esta sequência é repetida 20 vezes |
| 30 segundos, 94°C | (desnaturação) | |
| 30 segundos, 54°C | (emparelhamento) | |
| 90 segundos, 72°C | (enlongamento) | |
| 120 segundos, 72°C | (enlongamento final) | |

- Verificar o tamanho dos fragmentos obtidos num gel de agarose.

### Transformação de células de *S. cerevisiae* com os produtos de PCR e selecção de clones G418$^r$

Utiliza-se cerca de 1-5 μg de cada produto de PCR para transformar células de *S. cerevisiae* W303 A/B pelo método de tratamento das células com catiões (Ausubel *et al*., 1996). Células transformadas são crescidas a 30°C em meio líquido YPD cerca de 2 a 3 horas e, posteriormente, plaqueadas em meio YPD com 200 mg/l de geneticina. Seleccionam-se as colónias de maior dimensão e espalham-se de novo em meio YPD-G418, a fim de purificar as células transformadas. Apenas os clones capazes de crescer neste meio são seleccionados e, posteriormente, analisados como transformantes potencialmente correctos.

### Verificação dos transformantes G418$^r$ por PCR

A correcta interrupção das ORFs pode ser confirmada quer recorrendo a uma análise por *Southern-blotting* quer através de uma análise por PCR, usando células inteiras de *S. cerevisiae*. Na figura 5 pode observar-se o princípio do método do PCR analítico e na tabela 1 descreve-se a composição dos *primer*s utilizados.

Tabela 1 – Composição dos *primer*s utilizados na PCR analítica.

| ***Primer*** | **Posição seleccionada** |
|---|---|
| *A1* | 18-20 bases da cadeia codificante ≥ 400 pb *upstream* do ATG |
| A2 | 18-20 bases da cadeia não codificante a partir da extremidade 5' da ORF interrompida |
| A3 | 18-20 bases da cadeia codificante a partir da extremidade 3' da ORF interrompida |
| A4 | 18-20 bases da cadeia não codificante ≥ 300 pb *downstream do* codão stop |
| K2 | 18-20 bases da cadeia não codificante, 100 pb *downstream* da extremidade 5' da KanMX4 |
| K3 | 18-20 bases da cadeia codificante, 100 pb *upstream* da extremidade 5' da KanMX4 |

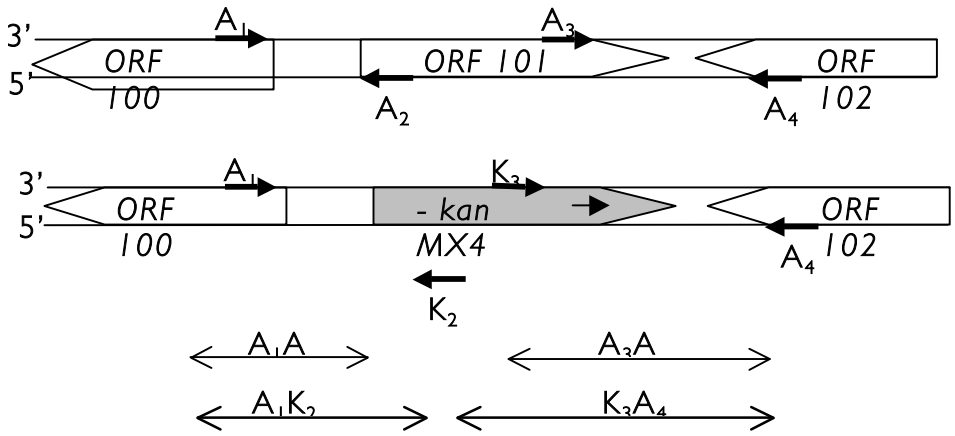



Figura 2 – Estratégia de PCR analítico

• Partindo de culturas frescas transfere-se uma colónia para um tubo *eppendorf* e aquece-se, durante 1 minuto, num micro-ondas, no máximo da potência. As células são arrefecidas no gelo e ressuspendidas em 25 µl de mistura reaccional, contendo:

Tampão 1X

2,5 mM $MgCl_2$

0,2 mM dNTP

1 µM de cada *primer* ($A_1$, $A_2$, $K_2$ ou $A_3$, $A_4$, $K_3$)

1 U Taq DNA polimerase

• A mistura, depois de homogeneizada, é sujeita a PCR nas seguintes condições:

120 segundos, 94°C (desnaturação inicial)

30 segundos, 94°C (desnaturação)

30 segundos, 50°C (emparelhamento)

} Esta sequência é repetida 30 vezes

90 segundos, 72°C (enlongamento)

120 segundos, 72°C (enlongamento final)

- Após a PCR as amostras são centrifugadas, a 10 000 rpm, durante 1 minuto, e analisa-se 25 μl de cada reacção em gel de agarose.

## Localização subcelular de proteínas recombinantes marcadas com GFP

Desde a clonagem do cDNA da proteína verde fluorescente (GFP-**G**reen **F**luorescent **P**rotein) em 1992 e a sua subsequente expressão heteróloga em *Escherichia coli* e *Caenorhabditis elegans* (Chalfie *et al*., 1994), que a GFP tem sido extensivamente utilizada em biologia celular e molecular como uma ferramenta poderosa e versátil. A GFP é uma proteína com 238 aminoácidos (peso molecular de 27 kDa), proveniente de um organismo do Atlântico Norte, a medusa *Aequorea victoria*. Quando excitada por luz azul, a um comprimento de onda de 395 nm, emite luz verde a 509 nm. A formação do fluoróforo na GFP requer o oxigénio molecular, mas uma vez formado absorve e emite luz sem quaisquer co-factores. Devido a esta vantagem de não requerer qualquer co-factor, o sinal GFP pode ser registado *in vivo* sem prejudicar a integridade celular. Para além disso, a GFP tem inúmeras características que a tornam uma ferramenta extremamente útil, para estudar fenómenos bioquímicos e celulares funcionais que não se distinguem das observadas nas proteínas nativas. GFP pode, igualmente, ser usado como repórter quantitativo da abundância proteica, através do uso de técnicas de fluorimetria e espectroscopia. Por outro lado, o sinal de fluorescência da proteína de fusão com GFP pode ser usado para monitorizar a localização sub-celular e dinâmica do tráfego da proteína em células vivas.

No presente trabalho, o nosso estudo irá incidir sobre o gene *JEN1* (ORF YKL217w), que codifica para um transportador de lactato na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De modo a estudar a expressão, abundância, localização e tráfego da proteína Jen1, construiu-se uma proteína de fusão Jen1::GFP.

## Construção de um fragmento de DNA quimérico *JEN1::GFP*

A construção de uma quimera genética entre *JEN1* e *GFP* tem por base a tecnologia de "Flanking Homology PCR Cassette" (Wach *et al*., 1994; Wach *et al*., 1997). É possível, desta forma, originar um gene de fusão no *locus* cromossomal *JEN1* (Figura 1). Esta abordagem é vantajosa devido à estabilidade da construção resultante, e à boa correspondência entre a expressão da estirpe selvagem e os genes de fusão. Na reacção de PCR utilizam-se 2 *primers* híbridos, designados por S1 e S2, e o plasmídeo pFA6a-GFPS5T-KanMX6 (Wach *et al*., 1997). O *primer* S1, de 5' para 3', tem cerca de 46 bases de DNA homólogas com a extremidade 3' da ORF do *JEN1*, seguidas de 21 bases de sequência derivada da extremidade 5' do gene reporter *GFP* no plasmídeo pFA6a-GFPS5T-KanMX6. O *primer* S2 tem cerca de 45 bases de DNA homólogas com a região 3' da ORF *JEN1*, seguidas de 19 bases de DNA homólogas com a região 3' do terminador *ADH1*, no plasmídeo pFA6a-GFPS5T-KanMX6.

***Protocolo experimental***

- Procurar nas bases de dados a sequência do gene *JEN1* de *S. cerevisae*.
- Desenhar os *primers* híbridos S1 e S2.
- Preparar, em gelo, 100 µl da seguinte mistura reaccional:

  Tampão 1X
  1,5 mM mM $MgCl_2$
  0,2 mM dNTPs
  1,0 µM *Primer* S1
  1,0 µM *Primer* S2
  Plasmídeo 0,3 µg
  1U taq DNA polimerase
  $H_2O$ até 100 µl

- A mistura, depois de homogeneizada, é sujeita a PCR nas seguintes condições:
  - 120 segundos, 94°C (desnaturação inicial)
  - 30 segundos, 94°C (desnaturação)
  - 30 segundos, 54°C (emparelhamento)
  - 90 segundos, 72°C (enlongamento)

  } Esta sequência é repetida 20 vezes

  - 120 segundos, 72°C (enlongamento final)
  - Analisar o fragmento obtido por gel de agarose.
  - Purificar o fragmento de DNA obtido após reaccção de PCR.

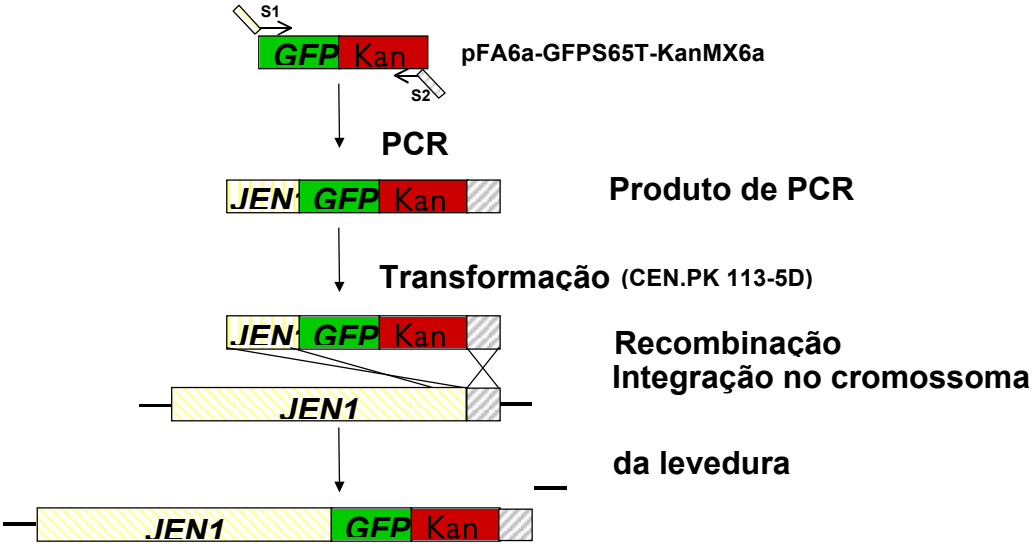



Figura 3 – Estratégia seguida na construção da fusão *JEN1::GFP*.

## Preparação de células competentes e transformação de levedura

Células competentes de *S. cerevisiae* serão preparadas de acordo com um protocolo optimizado, adaptado de Gietz e Woods (1994).

***Protocolo experimental***

- Partindo de uma colónia isolada de *S. cerevisiae* (CEN.PK113-5D), inocular 5 ml de meio YPD. A cultura é crescida durante a noite a 30°C.
- Inocular 50 ml de YPD a uma densidade celular de 5 x $10^6$/ml cultura. Incubar a cultura a 30°C, até atingir o equivalente a 2 x $10^7$ células/ml. É importante permitir que as células completem pelo menos 2 divisões.
- Recolher a cultura em tubos falcon de 50 ml e centrifigar a 5000 rpm, durante 5 minutos.
- Recolher o *pellet* e ressuspender as células em 25 ml de água esterilizada.
- Centrifugar novamente nas mesmas condições.
- Ressuspender o *pellet* em 1 ml de 100 mM de acetato de lítio (preparar fresco a partir de uma solução stock de 1,0 M) e transferir a suspensão para um tubo eppendorf.
- Centrifugar à velocidade máxima, durante 15 segundos.

- Remover o acetato de lítio e ressuspender as células num volume final de 500 μl (2 x $10^9$ células/ml), cerca de 400 μl de 100 mM de acetato de lítio.
- Ferver, durante 5 minutos, 1 ml de uma amostra de esperma de salmão. Imediatamente arrefecer em gelo.
- Submeter a suspensão celular ao vortex e pipetar amostras de 50 μl para tubos eppendorf.
- Centrifugar as células e remover o acetato de lítio com uma micropipeta.
- Preparar a mistura de transformação, seguidamente descrita:

  240 μl PEG (50%, v/v)
  36 μl 1,0 M acetato de lítio
  50 μl SS-DNA (2,0 mg/ml)
  X μl plasmídeo (0,1-10 μg)
  34-X μl água esterilizada
  360 μl Total

- Submeter o *pellet*, vigorosamente, ao vortex até este estar completamente misturado.
- Incubar a 30°C durante 30 minutos.
- Num banho térmico efectuar um choque térmico a 42°C, durante 30 minutos.

***Nota**: O tempo óptimo de choque térmico pode variar de acordo com cada estirpe*.

- Centrifugar a 5000 rpm, durante 15 segundos e remover a mistura de transformação com uma micropipeta.
- Ressuspender as células em 1 ml de YPD e incubar as culturas durante 2 a 3 horas.
- Centrifugar a 5000 rpm, 1 minuto. Ressuspender as células em 400 μl de água esterilizada.
- Plaquear 200 μl de células em placas YPD contendo 200 mg/L de geneticina (G418, GIBCO, BRL).
- Incubar as placas a 30°C, durante 2 a 3 dias
- Após o período de incubação surgem várias colónias de tamanhos distintos. Seleccionar as colónias grandes (3-4 mm de diâmetro) e voltar a plaquear em meio YPD contendo 200 mg/L G418.

## Confirmação por PCR analítico

A correcta integração pode ser confirmada através de uma análise por PCR, usando células inteiras de *S. cerevisiae*. Na figura 2 observa-se a estratégia seguida:

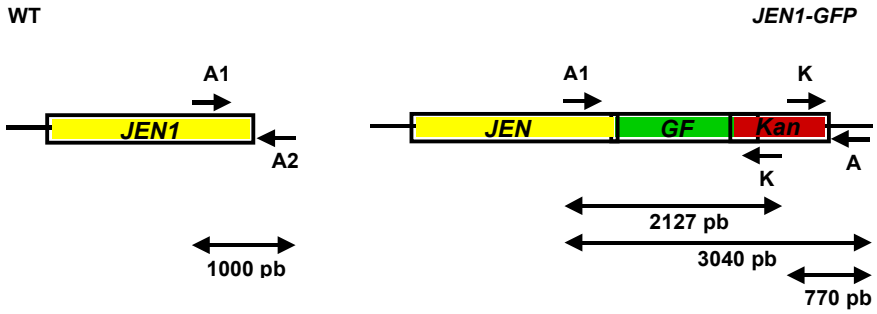



Figura 4 – Estratégia de PCR analítico

### *Protocolo experimental*

- Partindo de uma cultura fresca, transfere-se uma colónia de um potencial transformante para um tubo eppendorf.
- Incubam-se as células, durante um minuto, num micro-ondas, no máximo da potência.
- Arrefecem-se as células em gelo e resssuspendem-se na seguinte mistura reaccional:

  Tampão 1X
  1,5 mM $MgCl_2$
  0,2 mM dNTPs
  1,0 µM *Primer* 1
  1,0 µM *Primer* 2
  1U taq DNA polimerase
  $H_2O$ até 25 µl

- Correr a reacção de PCR nas seguintes condições:
  - 120 segundos, 94°C (desnaturação inicial)
  - 30 segundos, 94°C (desnaturação)
  - 30 segundos, 50°C (emparelhamento)
  - 90 segundos, 72°C (elongamento)

  } Esta sequência é repetida 30 vezes

## Monitorização da expressão *JEN1::GFP*

Neste trabalho as células serão observadas por microscopia de epifluorescência usando o filtro para a excitação de GFP. As imagens serão gravados usando uma câmara de vídeo Leica DC 200 e processadas através do programa Adobe Photoshop. Para observação microscópica, misturam-se 7 µl de cultura com 7 µl de 1% (p/v) agarose.

***Protocolo experimental***

- Crescer uma cultura da estirpe *S. cerevisiae* U2 urante a noite, a 30°C, em meio YNB, suplementado com glucose 2%, p/v, até atingir $D.O._{640}$ nm de aproximadamente 0,5.
- Lavar as células 2 vezes com água esterilizada e transferir a cultura para meio YNB, suplementado com ácido láctico (0,5%, v/v, pH 5,0).
- Recolher amostras da cultura de hora a hora, ao longo de 5 horas, e observar as células, ao longo do tempo, por microscopia de fluorescência, efectuando o correspondente registo das imagens observadas.

## Envolvimento da via de endocitose na remoção de Jen1–GFP da membrana plasmática

Seguidamente será estudado o papel da via de endocitose relativamente ao seu envolvimento na degradação de Jen1p por glucose. Mais especificamente, iremos utilizar um mutante interrompido no gene *end3*. Estirpes com alelos *end3-1* ou *end4-1* exibem alterações sensíveis à temperatura na via de endocitose.

***Protocolo experimental***

- Crescer culturas das estirpes *S. cerevisiae* U2 e *S. cerevisiae* 181 durante a noite, à temperatura permissiva de 23 °C, em meio YNB, suplementado com glucose 2%, p/v, até atingir $D.O._{640}$ nm de aproximadamente 0,5.
- Lavar as células 2 vezes com água esterilizada. e transferir cada cultura para meio YNB, suplementado com ácido láctico (0,5%, v/v, pH 5,0).

- Dividir cada cultura em 4 alíquotas, manter duas à temperatura permissiva de 23 °C e duas à temperatura restritiva de 37 °C.
- Após 4 horas de indução, suplementar uma das alíquotas de cada temperatura com 2% de glucose.
- Observar as células, ao longo do tempo, por microscopia de fluorescência, efectuando o correspondente registo das imagens observadas.

***Materiais biológicos***

*S. cerevisiae* U2 (*MATa ura3-52 JEN1::GFP*)

*S. cerevisiae* 181 (*MATa his4 ura3-52 bar1-1 end3-1 JEN1::GFP*)

## Bibliografia

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., e Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-5.

Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. e Riezman, H. (1993). *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in Saccharomyces. *J. Cell Biol*. 120: 55-65.

Tsien, R. 1998. The Green Fluorescent Protein. Ann. Rev. Biochemistry. 67: 509-544.

Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., Philippsen, P. 1997. Heterologous *HIS3* Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1065-1075.

## *Western Blotting*

A técnica usada para detecção de uma proteína *in vitro* é conhecida pela designação Western Blotting (http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/91), por contraposição com a detecção de DNA, Southern, ou RNA, Northern Blotting. Basicamente, esta técnica corresponde à extracção das proteínas totais de uma suspensão celular, a sua separação por electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Weber & Osborn, 1969; Laemmli, 1970), e a detecção da proteína desejada mediante a hibridação deste material com um anticorpo específico marcado. (http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Introduction/Ab4Beginners.html)

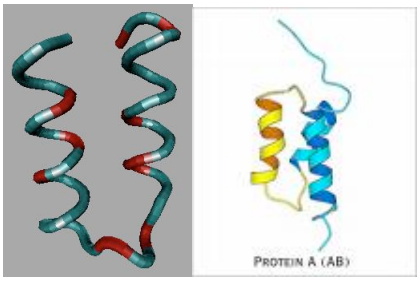
A extracção das proteínas totais pode ser substituída por extracção selectiva de proteínas de parede, de membrana, de mitocôndrias, etc. após fraccionamento celular. A separação de proteínas faz-se em condições desnaturantes, ou seja na presença de um detergente, o SDS (*sodium dodecyl sulfate*) que cobre a superfície externa da proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga íntrinseca à proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se constante. Assim, as proteínas são separadas em função do seu tamanho, tal como no caso das moléculas de DNA na electroforese de ácidos nucleicos, em que as amostras aplicadas no gel migram no sentido do eléctrodo positivo. A separação faz-se por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

Para poder detectar a proteína desejada é preciso que esta possa ser reconhecida por um anticorpo marcado. Para isso existem duas alternativas. Pode-se mandar marcar o anticorpo, sendo para isso necessário que ele já exista ou seja produzido por imunização de ratinhos com proteína purificada. Acima de tudo é preciso que esteja puro e em quantidade apreciável. Este processo é demorado, dispendioso e acima de tudo muito falível. Por isso, a forma mais usada é a de promover uma construção cromossomal que adicione uma *cauda* à sequência aminoacídica da proteína que desejamos detectar que possa ser usada para detecção com um anticorpo comercial. Esta metodologia tem a vantagem de poder ser usada com outros fins para além dos Westerns, como por exemplo para cromatografia de afinidade para purificação da proteína em causa. Um exemplo dessa multifuncionalidade é a cauda de histidinas (com ≥ 6 HIS) (http://en.wikipedia.org/wiki/His-*tag*), ou as HA, provenientes de uma pequena parte das sequências aminoacídicas de hemaglutininas (epítopo)

(http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Introduction/Ab4Beginners.html), para as quais existe um conjunto muito diversificado de anticorpos e metodologias disponíveis.

Esta construção é obtida por introdução de uma *cassete* de interrupção no *locus* do gene correspondente, substituindo o gene por um alelo idêntico com os nucleótidos codificantes para a cauda de aminoácidos clonados a jusante do, e *in frame* com, o codão de terminação.

No nosso caso vamos utilizar uma construção em que se introduziu uma *tag* que corresponde ao sub-domínio Z do domínio G da proteína A de *Staphylococcus aureus* que promove a ligação às imunoglobulinas (*IgG-binding domain Z)* (Hearn & Acosta, 2001; http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/proteins/htm/page16.htm). Este domínio, é repetido duas vezes na construção correspondente, para obtenção de uma estrutura semelhante à da imagem ao lado.




Os anticorpos disponíveis comercialmente para cada *tag* podem ser marcados de diversas formas, embora as empresas que os comercializam optem por estratégias moleculares que limitam as escolhas. A marcação por ECL, ou Enhanced Chemiluminescence, baseia-se numa reacção complexa que permite a emissão e subsequente detecção de um sinal luminoso pelo anticorpo ligado ao seu antigénio, ou seja à proteína a detectar.

Para além disso, esta metodologia permite a amplificação da detecção através da utilização combinada de um anticorpo primário e outro secundário.

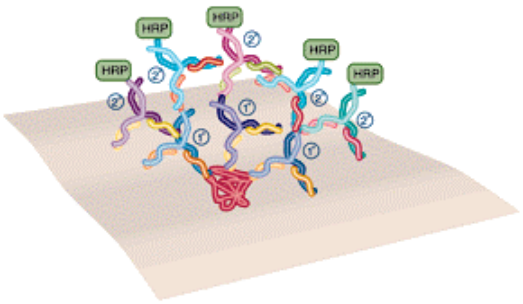



Fig. 1 Representação da adição em cadeia dos anticorpos primário e secundário conjugado com a HRP.

A reacção segue a seguinte sequência:

1- Ligação da *tag* ao anticorpo primário.
2- Ligação do anticorpo primário ao secundário, que contém ligada uma peroxidase de largo espectro de afinidade, a *Horseradish peroxidase*, HRP (Fig. 2)
3- Reacção desta enzima com a $H_2O_2$ e o luminol – produz uma cadeia de oxidações reduções (Fig 2,I) que culmina na emissão de luminiscência (Fig 2,II; Fig. 3).
4- Detecção da emissão de luz num filme sensível.

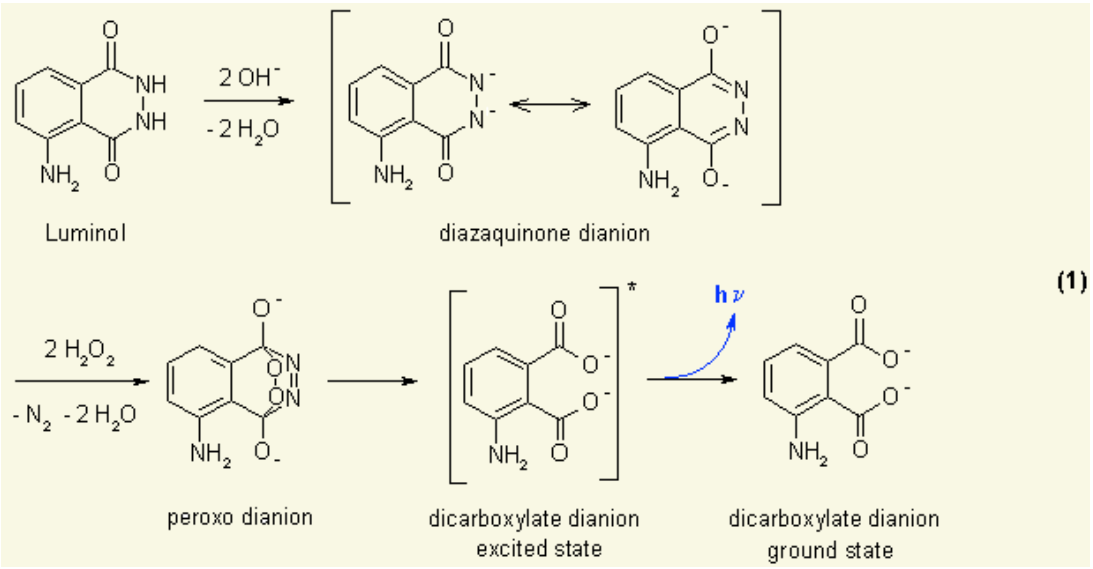



Fig. 2 Reacções de oxidação redução catalizadas pela HRP a partir da adição de peróxido de Hidrogénio e de luminol.

## SDS-PAGE - Procedimento experimental

No presente trabalho, o nosso estudo irá incidir sobre o gene *STL1*, que codifica para o transportador activo de glicerol na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Ferreira *et al*. 2005). A expressão efectiva do gene STL1, produzindo proteína detectável, vai ser analisada por Western Blotting em extractos proteicos de células wt e mutante *gpd1Δgpd2Δ*, colhidas em diferentes condições e fase de crescimento. O objectivo é saber se a proteína é expressão ou não nas diversas estirpes/condições.

### 1ª Parte
### Preparação das amostras

1. Inocular meio de cultura YPD com a estirpe FVVY28 (*MAT*a *leu2-3, 112ura3-1 trp1-his3-11, 15 ade2-1 can1-100 stl1::STL1-2ZZ kanMX*) e incubar a 30°C, 180 r.p.m.
2. Colher as células correspondentes a $DO_{600}$=1 durante a fase exponencial de crescimento ($OD_{600}$≈0,6) por centrifugação a 4000*g*, 5min (considerar 1ml o volume de cultura usado para as medições de $DO_{600}$)

*Pode-se congelar o pellet a -20ºC para utilização posterior*.

3. Ressuspender o sedimento em 200µl de NaOH 0,2M e β-mercaptoetanol 2%
4. Incubar 10min a 4°C
5. Precipitar proteínas com 400µl de ácido tricloroacético (TCA) 20% (**usar luvas**)
6. Arrefecer em gelo 10 min
7. Centrifugar a 13000 r.p.m., 5 min
8. Lavar o sedimento com 500µl de acetona
9. Centrifugar a 13000 r.p.m., 5 min
10. Incubar 10min a 4°C para evaporação da acetona restante
11. Dissolver as proteínas com 100µl de tampão de amostra/duodecil sulfato de sódio (SDS)
12. Juntar 3*µ*l DTT 0.01M para inibir proteases
13. Incubar 10min a 95°C (furar a tampa do microtubo) se utilizar de imediato

*Pode-se congelar a -20ºC para utilização posterior*.

Comentários:

- A lise das células de levedura é obtida mediante a incubação em TCA.
- Neste caso usa-se o extracto total, incluindo todo o *debris* celular não proteico.
- Como se parte de uma quantidade de células definida e igual em todos os ensaios e apenas se pretende verificar a presença da proteína e não quantificá-la, não é necessário dosear a proteína total. Caso contrario, o doseamento faz-se geralmente pelo método de Bradford.

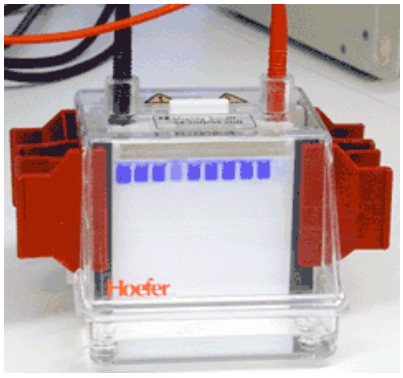
## 2ª Parte

### Preparação do gel de poliacrilamida

A tina de electroforese que vamos usar tem capacidade para 2 geis em simultâneo. Por seu lado, cada um deles é constituído por duas partes com composição em poliacrilamida diferente e com funções distintas: a de separar amostras muito diferentes entre si – gel de resolução - e a de concentrar estas amostras – gel de concentração.

1- Preparar o sistema para fazer os geis. Estes são preparados entre duas placas de vidro separadas por separadores. Todo o material deve ser bem lavado e seco para evitar irregularidades no gel.

2- Proceder à montagem do sistema de electroforese com espaçadores de 0,75mm.




3- Proceder à preparação das soluções de acrilamida que deverá polimerizar neste suporte. (Uma vez que a acrilamida é um composto neurotóxico, a preparação de géis de acrilamida poderá eventualmente ser evitada por recurso a géis pré-encastrados, disponíveis no mercado.)

4- Preparar o gel de resolução, juntando:

| | |
|---|---|
| Tris-HCl 1,5M pH 8.8 | 5 ml |
| Solução de acrilamida 40%/Bis 29:1 | 6 ml |
| SDS 10% | 2 ml |
| $H_2O$ | 8,7 ml |
| TEMED | 10 $\mu$l |
| APS (Persulfato de Amónia) 10% | 100 $\mu$l |

5- Misturar cuidadosamente e pipetar imediatamente a solução entre as placas de vidro até uma altura de aproximadamente 6 cm. Colocar uma camada de 1 ml de

isopropanol de forma a obter uma superfície plana. Deixar polimerizar 30-60min à temperatura ambiente.

6- Após polimerização remover o isopropanol com papel absorvente.

7- Preparar o gel de concentração, juntando:

| | |
|---|---|
| Tris-HCl 1,5M pH 6.8 | 5 ml |
| Solução de acrilamida 40%/Bis 29:1 | 2 ml |
| SDS 10% | 200 $\mu$l |
| $H_2O$ | 12 ml |
| TEMED | 20 $\mu$l |
| APS (Persulfato de Amónia) 10% | 100 $\mu$l |

8- Misturar cuidadosamente, encher o espaço entre as placas com esta solução e colocar o pente. Deixar polimerizar 30-45min à temperatura ambiente.

9- Aplicar as amostras nos poços respectivos (15-20µl).

**Separação electroforética de proteínas**

1- Preparar as amostras para aplicação no gel, juntando o volume equivalente a 15 $\mu$g de cada uma das fracções a um volume de tampão da amostra até perfazer 25 $\mu$l. Ferver durante 5 min;

2- Aplicar as amostras e o marcador de pesos moleculares (LMW (BioRad)) nos poços do gel;

3- Proceder à electroforese aplicando uma corrente constante de 200 V, durante 1h.

4- Retirar um dos geis e colocá-lo numa solução corante – azul de Coomassie. Levar ao micro-ondas 30 s e agitar 10 min.

5- Colocar o gel numa solução descorante. Levar ao micro-ondas 30 s e agitar 10 min. Findo este tempo devem-se ver as bandas de proteínas.

6- O 2º gel vai ser usado para a transferência/*Blotting*.

## 3ª Parte
### Transferência das proteínas para a membrana de *blotting*

1- Usa-se uma mebrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) que tem de ser estabilizada primeiro
2- Mergulhar a membrana em metanol 1 min
3- Lavar com $H_2O$
4- Incubar em TBS 20 min
5- Montar o dispositivo de *blotting*:

Mergulhar as esponjas, os papéis de filtro (8), as membranas e o gel na solução de transferência. Deixar equilibrar 30 min.

6- Preparar a cassete:

Colocar a cassete com o lado prreto para baixo

Sobre o lado preto colocar a 1ª esponja

Colocar 2 papéis de filtro (remover bolhas de ar com 1 pipeta)

Colocar o gel (remover bolhas de ar)

Colocar a membrana de PVDF (remover bolhas de ar)

Colocar 2 papéis de filtro (remover bolhas de ar)

Colocar outra esponja

Fechar firmemente a cassete e mantê-la mergulhada em tampão de transferência da BioRad (diluir para 1X concentrado)

Colocar a cassete no módulo e este em posição correcta dentro do tanque.

Adicionar gelo.

Adicionar uma barra magnética e tampão de transferência de forma a que o tanque fique bem cheio.

7- Ligar a 100V durante 1 a 2 h.

8- Verificar a eficiência da transferência com coloração de Ponceau[1]:

Incubar 1 a 2 min com o corante

Lavar com TBS-T

[1] Detecta a presença de pontes bisulfito (SS)

## 4ª Parte
## Hibridação do anticorpo

1- Colocar a membrana de PVDF em TBS-T com 5% de leite magro em pó (leite em pó magro Molico) para bloqueamento de locais de ligação não específica. Agitar durante 1 a 2 h à temperatura ambiente.

2- Lavar a membrana duas vezes com TBS-T.

3- Diluir 1/100 o anticorpo antiperoxidase de coelho (PAP, Dako-Cytomation), conjugado com a Horseradish peroxidase (HRP) com TBS:

Tubo Falcon com: 10 ml TBS-T + 100 $\mu$l anticorpo

4- Incubar as membranas com o imunocomplexo solúvel HRP/PAPA 4°C overnight.

5- Lavar brevemente duas vezes a membrana com TBS-T e incubar 15min em excesso de TBS-T à temperatura ambiente para remover os excessos de anticorpo não ligado.

6- Fazer mais 2 lavagens da membrana com TBS, 15 min à temperatura ambiente.

7- Revelar as reacções com "ECL Plus Western Blotting Detection System" (Amersham Biosciences).

## Bibliografia citada

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M., Lucas, C. and Brandt, A. (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H+ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell, 16: 2068-2076.

Hearn, M. T. W. & Acosta, D. (2001) Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *J. Mol. Recognit*. 14: 323-369.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol Chem*. 244(16): 4406-12

## Anexo

### [2]*Reagentes e tampões*

- Tampão de amostra/SDS
  Tris HCl 0,125M pH 6,8
  SDS 2% (p/v)
  EDTA 5mM
  Azul de Bromofemol 0.005%

- Tampão de aplicação
  Tris.HCl 125mM
  Glicerol 20%
  SDS 4%
  Azul de bromofenol 0,01%
  β-mercaptoetanol 1% (pH 6,8)

- TBS (Transference Buffer solution)
  8g NaCl
  20ml Tris HCl 1M, pH 7,6
  Diluir com água desionizada para 1000ml (verificar pH)

- TBS-T
  1% de Tween 20 em TBS

- Solução de Coomassie
  Metanol 50%
  Ácido acético 10%
  Coomassie R258 0,25%

- Solução de descoloração
  Metanol 25%
  Ácido acético 5%

- Solução de Ponceau
  2g de Ponceau
  30g TCA
  30g Acido Sulfosalicílico
  100 ml $H_2O$

## Anexo

### *Construção da estirpe FVV28*

A PCR-generated fragment encoding a duplicated IgG binding domain (Z) of protein A, and containing a *KanMX* cassette, was amplified from plasmid pFZ according to Whyte and Munro (2001) using primers 5' CAA ACA TCA AAA ATG AAG ATA CAG TGA ACG ATA AAG CAA ATT TTG AGG GTG GAG CAG GGG CGG GTG 3' and 5' AAT GCT TTC TTA AGT AAA TTA CAA AAT ATG ATT TGT GAG TTG TGT GTG AAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG 3'. This was used to transform yeast to construct the epitope-tagged strains. Correct integration was verified by PCR. For Western blots, cells (0.2 mg dry weight) were collected by centrifugation, and protein extracts were prepared according to Burke *et al*. (2000), separated by SDS-PAGE (10%) and transferred to nitrocellulose filters (Sartorius) according to Kyhse-Andersen (1994). The filters were incubated with a commercial mixture of horseradish peroxidase and anti peroxidase rabbit antibody (PAP, cat. no. Z0113, Dako-Cytomation A/S, Copenhagen, Denmark), and reacting polypeptides were visualized using ECL Plus Western Blotting Detection system (Amersham Biosciences) and a Storm 860 Scanner (Molecular Dynamics).


- Whyte, J.R., and Munro, S. (2001). The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. Dev. Cell 1, 527-537.
- Kyhse-Andersen, J. (1994). The semi-dry electroblotter. J. Biophys. Biochem. Meth. 10, 203-209.
- Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000). Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.