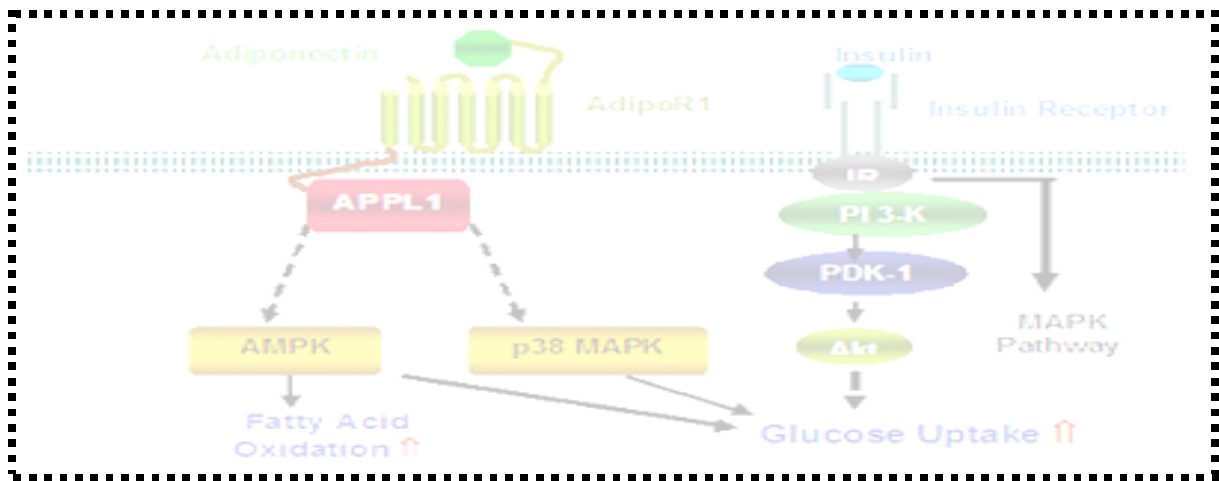




Departamento de Biologia da Universidade do Minho

Mestrado em Genética Molecular



Sinalização, expressão génica e regulação pós-transcricional
Guião das aulas práticas

Ana Preto
Andreia Gomes
Cristina Aguiar
Rui Oliveira

MÉTODOS DE ANÁLISE E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

I. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LITICASE

A. INDUÇÃO

1. Inocular *E. coli* DH5 α em meio LB-amp e incubar overnight.
2. Fazer uma diluição de 1/1000 da cultura anterior em LB-amp e incubar até OD₆₀₀ 0,5.
3. Adicionar IPTG para uma concentração final de 0,4mM.
4. Incubar durante 5h a 37 °C.

B. SHOCKING

1. Centrifugar 200 mL da cultura anterior e ressuspender as células com 200 mL de 25mM Tris pH=7,4.
2. Centrifugar e desprezar sobrenadante.
3. Adicionar 8 mL de Tris - EDTA e 8 mL de Tris – Sucrose.
4. Agitar gentilmente por 20 min.
5. Centrifugar e desprezar o sobrenadante.
6. Adicionar 8 mL de 0,5mM MgSO₄ e agitar gentilmente durante 20 min.
7. Realizar uma nova centrifugação, transferir o sobrenadante para tubos eppendorf.
8. Congelar rapidamente com azoto líquido e guardar a -80 °C.

C. ENSAIO

1. Inocular em meio YPD a estirpe BY4741 a 30 °C até OD₆₀₀ < 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 OD₆₀₀ 5.
4. Fazer tampão fresco Tris – DTT.
5. Fazer uma mistura para OD₆₀₀ 0,2 de:
10 mL de Tris DTT + 9,2 mL de H₂O + 0,8 μ L de células

6. Remover 1 mL da mistura anterior e definir OD₆₀₀ 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 µL).
8. Determinar a actividade.

NOTA: 1 unidade de Liticase = 10% de diminuição de OD₆₀₀ após 30 min a 30 °C.

Meios e Soluções

Meio LB

5g Extracto de Levedura
10g Peptona
5g NaCl

Meio YPD

10g Extracto de Levedura
10g Peptona
20g Dextrose/ Glucose

Tris - EDTA (25mM Tris + 2mM EDTA):

25mL 50mM Tris
200µL 500mM EDTA
Água até V_f = 50 mL

Tris - Sucrose (25mM Tris + 40% Sucrose):

25mL 50mM Tris
20g Sucrose
Água até V_f = 50 mL

Tris - DTT (100mM Tris-Cl pH=7,4 + 1mM DTT)

5mL 1M Tris
77mg DTT
Água até V_f = 50 mL

Ampicilina

100 µg/mL meio sólido
50 µg/mL meio líquido

II. DOSEAMENTO DE PROTEÍNA TOTAL

A. MÉTODO DE LOWRY

1. Preparar os tubos indicados na tabela da página seguinte:
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.

Tubos	BSA (µg)	Amostra (µL)	H ₂ O (µL)
1	0	-	qbp volume final = 200 µL
2	4	-	
3	10	-	
4	20	-	
5	40	-	
6	60	-	
7	-	20	
8	-	40	
9	-	60	

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 Na₂CO₃ 2% (p/v, em NaOH 0,1M)
150 µL CuSO₄.5H₂O 1% (p/v)
150 µL tartarato duplo de sódio e potássio 2% (p/v)

Solução B

- 600 µL Reagente de Folin-Ciocalteu
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 ₂ O (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 595 nm.
4. Construir a curva padrão e determinar a concentração de proteína total presente na amostra.

III. 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 poli(acrilamida) (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 poli(acrilamida) utilizado em SDS-PAGE

Soluções	Gel concentrador 3,75%	Gel de resolução 10%
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	2 mL	6 mL
Tris-HCl 0,5 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

Nota: receita para quatro geis

4. Adicionar o persulfato 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.
5. 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.

6. Adicionar, às amostras a aplicar no gel, igual volume de tampão de aplicação (2x) e incubar a 100°C durante 5 min.
7. Deixar que as amostras arrefeçam. Entretanto, proceder à montagem do sistema de electroforese, colocando o tampão de electroforese.
8. 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.
9. Programar a fonte de alimentação do sistema para 100 V e promover a electroforese até as amostras estarem completamente no gel de resolução.
10. 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)

IV. 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

CuCl₂ 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 4°C.
3. Descartar a solução anterior e incubar o gel na presença de Reagente de Schiff, durante a noite, a 4°C 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 tiosulfato de sódio e incubar 15 min. Substituir por nova solução de tiosulfato 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

50% (v/v) Metanol

Solução de tiosulfato

Tiosulfato 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

32 mM DTT

Solução de coloração

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

Solução redutora (preparada no momento)

CH₂O 0,04% (v/v)

Na₂CO₃ 3% (p/v)

Solução de paragem

Metanol 50% (p/v)

V. 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 1500g e 4°C e descartar o sobrenadante. No caso (B) aguardar que o volume adicionado esorra 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 4°C 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 4°C 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 4°C 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

25 mM Tris, pH 7,6

Tampões de eluição

25 mM Tris, pH 7,6 + NaCl 0,3M

25 mM Tris, pH 7,6 + NaCl 0,6M

25 mM Tris, pH 7,6 + NaCl 1M

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

Rui Oliveira

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*, 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.

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 150 μ l 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 50 μ l de tampão TE (contendo RNAase A 20 μ g/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 100 μ g/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 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*, 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 $CaCl_2$ 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 μ 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 μ l num microtubo arrefecido. manter no gelo
13. Adicionar 10ng de DNA (10 a 25 μ 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/ μ 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*, 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.

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 DO₆₀₀ entre 0,3 e 0,5 (~1x10⁷ 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: 10⁵-10⁶ 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*. 3rd 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 ₂ O ₂ 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 (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)

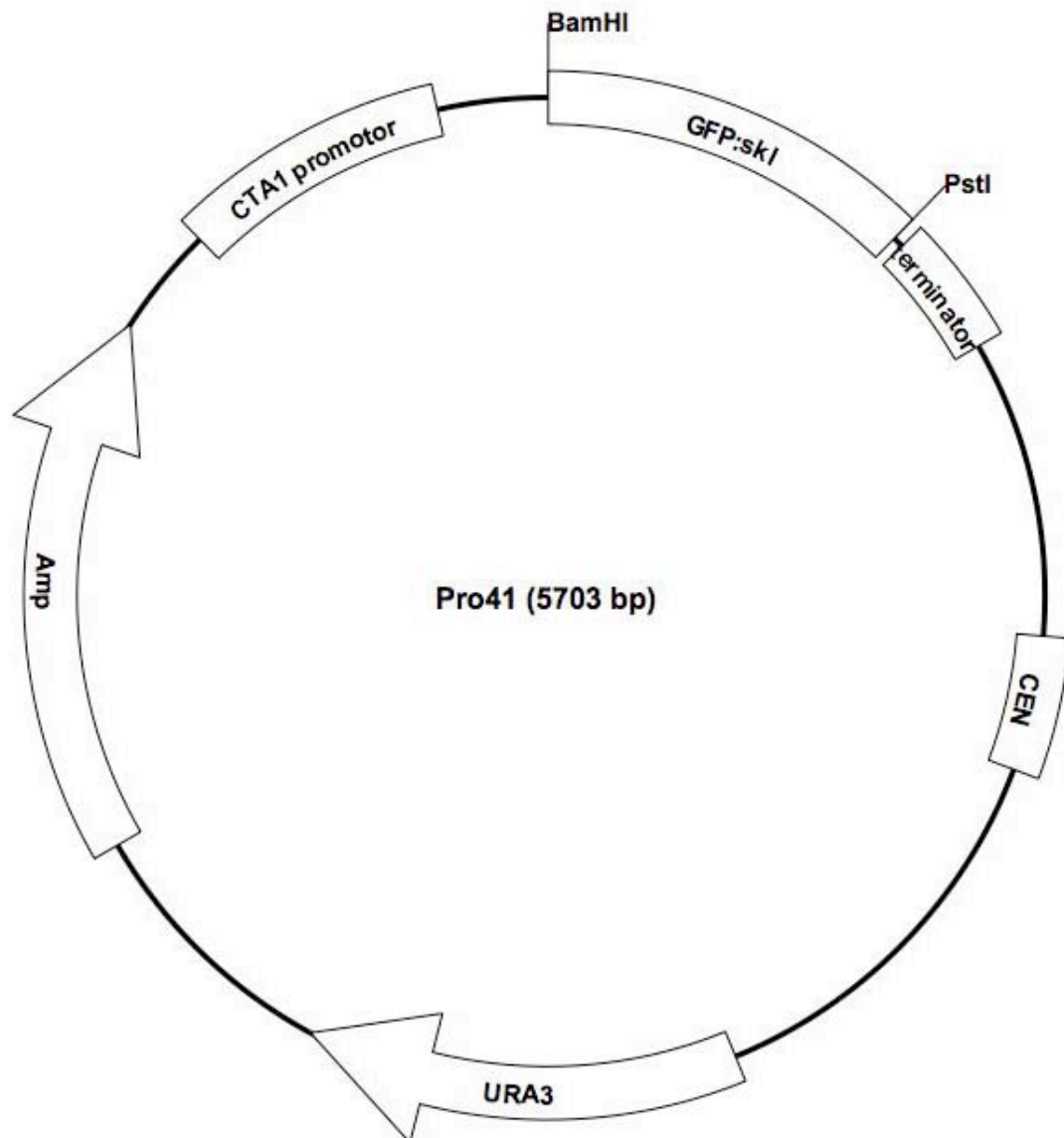
Materiais

- 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

- YNBOUra: Yeast Nitrogen Base 0,67% (p/v), ácido oleico 0,1% (p/v), tween 80 0,5% (p/v), L-leucina 40mg/L



TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS

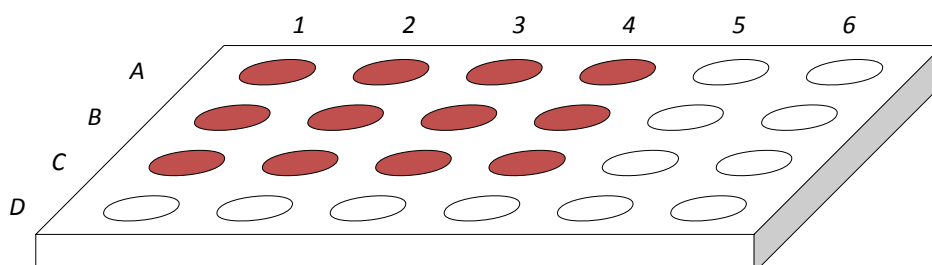
I. LIPOFEÇÃO DE CÉLULAS 293T COM PLASMÍDEO CONTENDO GENE REPÓRTER DA BETA-GALACTOSIDASE

As células serão previamente plaqueadas em poços de placas (de 24 poços), ou seja 2×10^5 cels/poço num volume de 500 μl , o que vai corresponder a 50-80% de confluência das células no dia seguinte.

A cada poço será adicionado 0.5 μg de DNA plasmídico e 1.25 μl de Lipofectamine® LTX. Após a transfecção, as células serão incubadas até ao dia seguinte na incubadora a 37 °C, com 5% CO₂.

1. Preparar as soluções:

- Para cada poço, diluir 0.5 μg de DNA plasmídico em 100 μl *Optimem Reduced Serum Medium* e misturar bem (com a pipeta).
- Misturar *Lipofectamine® LTX Reagent* cuidadosamente antes de usar, adicionar 1,5 μl por poço directamente à solução com DNA e misturar bem.
- Homogenizar as soluções e deixar a temperatura ambiente durante 30-45 min.
- Remover o meio de cultura em cada poço por aspiração, adicionar meio de cultura fresco.
- Cuidadosamente, adicionar a mistura (100 μl por poço) e incubar 48 h.



- A1-A4: Controlol
- B1-B4: Lipofectamin® plasmídeo 1
- C1-C4: Lipofectamin® plasmídeo 2

II. QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DA BETA-GALACTOSIDASE

A. PREPARAÇÃO DOS LISADOS PROTEICOS

1. Adicionar 4 volumes de água a 1 volume de RLB 5X para obter solução stock 1x
2. Aspirar o meio de cultura das células a serem testadas (poços A1-2; B1-2; C1-2). Lavar as células duas vezes com PBS 1x, cuidadosamente. No final da última lavagem, aspirar o mais possível do poço.
3. Adicionar 200 μ l de RLB 1x a cada poço. Garantir que o tampão banha todas as células.
4. Incubar à temperatura ambiente durante 15 min, rodando suavemente a placa.
5. Raspar todas as áreas da superfície do poço, inclinar suavemente e raspar o lisado para a porção inferior do poço. Com uma micropipeta, transferir o lisado para um microtubo, colocando-o em gelo.
6. Colocar o microtubo no vortex 10-15 seg, depois centrifugar à velocidade máxima durante 2 min a 4°C.
7. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo.
8. Os lisados podem ser analisados directamente ou armazenados a -70°C durante dois meses.

B. PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO

Para preparar padrões contendo 0 a 5.0x10³ unidades de β -galactosidase.

Preparar a série de diluições em RLB 1x imediatamente antes de usar.

1. Adicionar 10 μ l de 1u/ μ l β -galactosidase a 990 μ l de RLB 1x. Vortex. (diluição 1:100)
2. Adicionar 10 μ l desta diluição 1:100 a 990 μ l de RLB 1x. Vortex. (diluição 1:10 000)
3. Com este stock, preparar 50 μ l de cada padrão para β -galactosidase conforme a tabela:

Padrões de β -galactosidase (Miliunidades)

	Volume de solução stock 1:10000 (μl)	Volume de RLB 1x
0.0	0	50
1.0	10	40
2.0	20	30
3.0	30	20
4.0	40	10
5.0	50	0

4. Adicionar 50 μ l do tampão *Assay 2X Buffer* a cada poço na placa de 96 poços.
5. Misturar bem as amostras pipetando os conteúdos dos poços. Cobrir a placa com papel de alumínio.
6. Incubar a placa a 37°C durante 30min ou até se desenvolver uma ligeira cor amarela (no máximo 3h).
7. Parar a reacção adicionando 150 μ l de carbonato de sódio 1M. Misturar bem pipetando o conteúdo de cada poço. Evitar bolhas, que interferem com a leitura da absorbância.
8. Fazer a leitura da absorbância a 420 nm imediatamente após adição de solução de carbonato de sódio no leitor de microplacas.

C. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS TRANSFECTADAS

Para quantificar as amostras, o procedimento é exactamente o mesmo que para os padrões. O volume máximo por amostra será de 50 μ l, diluída ou não.

Soluções:

PBS, Tween 20 0,5%, BSA 0,05% (guardar a 4°C)

III. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE EGFP

A. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS PARA RNA

1. As células transfectadas serão lisadas directamente no poço de cultura: aspira-se o meio e induz-se a lise com 500 μ l de Lysis buffer (RNeasy mini kit, QIAGEN).
2. Com a P1000, homogenizar e recolher o lisado para um eppendorf estéril e sem RNases.
3. Congelar a -80°C .

B. PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total será purificado de acordo com o protocolo standard para isolamento de RNA total de células animais com o kit RNeasy mini (QIAGEN).

C. TRANSCRIÇÃO REVERSA

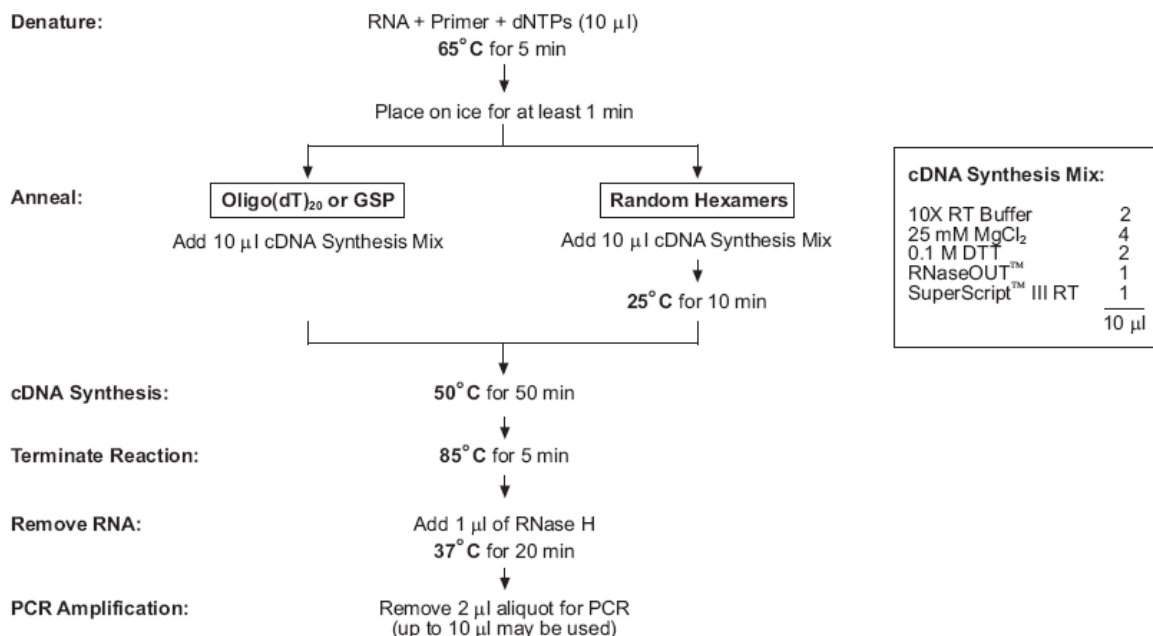
A conversão de RNA em cDNA será realizada com a enzima Superscript III (Invitrogen).

RNA total: 2 μ g

oligo(dT)₂₀: 1 μ l

dNTPs: 1 μ l

Summary of Procedure



Adaptado das instruções do fabricante

D. PCR PARA DETECÇÃO DE TRANSCRIPTOS DE EGFP

5x Go Taq Flexi buffer	4
25mM MgCl ₂	0.8
dNTP 10mM	0.5
Primer mix (10µM each)	2
H ₂ O	10.25
Go Taq pol.	0.3
cDNA	2
Amplicação	233bp

Condições do PCR:

94°C 5min

35 ciclos (94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s)

72°C 7min

Preparar um gel de agarose 1% para electroforese.

Colocar 20µl de cada produto de PCR por poço e 10µl de marcador de pesos moleculares.

Electroforese 70V, 45-60min.

Visualizar.

Soluções:

Tampão TAE1x

242 g base Tris

57.1 ml de ácido acetic glacial

100 ml de 0.5 M EDTA (pH 8.0)

em 1000ml H₂O.