



Universidade do Minho

## **Departamento de Biologia da Universidade do Minho**

### **Mestrado em Genética Molecular**

Ano lectivo de 2004/2005, edição de 2004-2006

**Estudo da regulação do gene *STL1* codificando o sistema de simporte  $H^+$ /glicerol em *Saccharomyces cerevisiae***

### **Protocolos**

Rui Oliveira

## Amplificação da cassette de interrupção (ZZ-KanMX) por PCR

### Protocolo

1. Em microtubos de 200 $\mu$ l, preparar a seguinte mistura de reacção de PCR para a cassette de interrupção e um controlo negativo com omissão do DNA molde (manter sempre a mistura reaccional em gelo):

Componente	Quantidade ( $\mu$ l)
Tampão de reacção	5
dNTP's	1
Primer 1	1
Primer 2	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3
Taq DNA Polymerase (Fermentas)	0,5
DNA molde	100ng-1 $\mu$ g
H <sub>2</sub> O ultra-pura	q.b.p. 50 $\mu$ l

2. Colocar os tubos no aparelho de PCR e proceder à amplificação com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	10min	
52°C	3min	1
72°C	3min	
94°C	30seg	
52°C	3min	34
72°C	3min	
94°C	30seg	
52°C	3min	1
72°C	10min	

3. Analisar 5 $\mu$ l do produto das reacções por electroforese em gel de agarose 0,8%
4. Se for visível uma única banda correspondendo à massa molecular esperada, proceder à purificação do *amplicon* com as "MicroSpin S-300 HR Columns" (Amersham Biosciences); anexo 1.

## Extracção de plasmídeo (pUG35-STL1) de *Escherichia coli*

Seguir o protocolo do kit "GenElute™ Plasmid Miniprep Kit" (Sigma); anexo 2.

## Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

### Protocolo

1. Inocular 5ml de meio YPD com uma só colónia da estirpe de levedura a ser transformada (FVY24 MATa *leu2-3, 1 12ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 stl1::kanMX*). Incubar durante a noite a 30°C, 160r.p.m.
2. Inocular 300ml de YPD em balão Erlenmeyer de 1000ml com a cultura de 5ml. Incubar a 30°C, 160r.p.m. 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 200 $\mu$ g de DNA "carrier" com 5 $\mu$ g de DNA para transformar num microtubo (o volume total de DNA não deverá exceder 20 $\mu$ l)
7. Adicionar 200 $\mu$ l 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 (YNBDA com suplementos auxotróficos convenientes)

### **Meios de cultura e soluções**

- YPD
  - Extracto de levedura 1% (p/v)
  - Peptona 2% (p/v)
  - Glucose 2% (p/v)
- YNBDA (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 PEG (polietilenoglicol)
  - PEG 4000 ou 3500 (esterilizado por filtração) 50% (p/v) 8vol.
  - Tampão TE, pH 7,5 (10x) 1vol.
  - Acetato de lítio (10x)
- Solução de lítio
  - Tampão TE, pH 7,5 (10x) 1vol.
  - Acetato de lítio (10x) 1vol.
  - Água ultra-pura esterilizada 8vol.
- Tampão TE, pH 7,5 (10X)
  - Tris·HCl 100mM, pH 7,5
  - EDTA 10mM, pH 7,5
- Acetato de lítio (10x):
  - Acetato de lítio 1M, pH 7,5 ajustado com ácido acético diluído
  - Esterilizar por filtração
- Tampão TE, pH 7,5
  - Tris·HCl 10mM, pH 7,5
  - EDTA 1mM, pH 7,5

### **Preparação de amostras para microscopia de fluorescência**

#### **Protocolo**

1. Inocular meio SCGly-ura com a estirpe FVY24 (*MATa leu2-3, 112ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 stl1::kanMX*) transformada com o plasmídeo pUG35-*STL1* e incubar *overnight* a 30°C, 180 r.p.m.
2. Colher as células por centrifugação a 4000g, 5min. Fazer uma suspensão celular com OD<sub>600</sub>≈0,25 em meio SCGly-ura fresco
3. Colher as células a meio da fase exponencial de crescimento (OD<sub>600</sub>≈0,6) e transferir para meio SCGly-ura sem metionina e incubar durante 1-2h
4. Colher as células por centrifugação e separar uma alíquota para visualização por microscopia de fluorescência
5. Suspende as restantes células em SCGluc-ura contendo metionina e incubar durante 1h
6. Colher as células para visualização por microscopia de fluorescência

#### **Meios de cultura**

- SCGly-ura
  - Ácido succínico 1% (p/v)

- YNB w/o amino acids (Difco) 0,67% (p/v)
- Glicerol 2% (p/v)
- Suplementos auxotróficos 40mg/L
- SCGluc-ura
  - Ácido succínico 1% (p/v)
  - YNB w/o amino acids (Difco) 0,67% (p/v)
  - Glucose 2% (p/v)
  - Suplementos auxotróficos 40mg/L

## “Western blots”

### Protocolo

1. Inocular meio de cultura YPD com a estirpe FVY28 (*MATa leu2-3, 112ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1 can1-100 stl1::STL1-2ZZ kanMX*) e incubar a 30°C, 180r.p.m.
  2. Colher as células correspondentes a DO<sub>600</sub>=1 durante a fase exponencial de crescimento (OD<sub>600</sub>≈0,3-0,4) por centrifugação a 4000g, 5min (considerar 1ml o volume de cultura usado para as medições de DO<sub>600</sub>)
  3. Ressuspender o sedimento em 200μl de NaOH 0,2M e β-mercaptoetanol 2%
  4. Incubar 10min a 4°C
  5. Precipitar proteínas com 200μl de ácido tricloroacético (TCA) 10% (**usar luvas**)
  6. Centrifugar a 14000r.p.m., 10min
  7. Lavar duas vezes o sedimento com 200μl de acetona
  8. Incubar 10min a 4°C para evaporação da acetona restante
  9. Dissolver as proteínas com 100μl de tampão de amostra/duodecil sulfato de sódio (SDS)
  10. Incubar 10min a 95°C (furar a tampa do microtubo)
- Neste ponto do protocolo, as amostras podem ser congeladas a -20°C para análise posterior (neste caso deve-se incubar novamente 10min a 95°C antes da aplicação no gel de electroforese) ou usadas para aplicação directa no gel para electroforese.
11. Proceder à montagem do sistema de electroforese com espaçadores de 0,75mm
  12. Preparar o gel separador e aplicar no sistema com uma pipeta Pasteur logo após a adição de TEMED. Cobrir a superfície exposta do gel com água e deixar polimerizar 30-60min à temperatura ambiente
  13. Retirar a água sobreposta ao gel, preparar o gel de concentração e aplicar logo após a adição do TEMED até à parte superior do contentor. Colocar o pente de 0,75mm de espessura e deixar polimerizar o gel 30-45min à temperatura ambiente
  14. Aplicar as amostras nos poços respectivos (15-20μl)
  15. Separar as proteínas das amostras por SDS-PAGE (12%)
  16. Transferir para membranas de nitrocelulose
    - Mergulhar a membrana em TBS-T (TBS com 0,1% Tween 20) com 5% de leite magro em pó para bloqueamento de locais de ligação não específica. Agitar durante 1h à temperatura ambiente
  17. Lavar a membrana duas vezes com TBS-T
  18. Diluir 1/100 o anticorpo conjugado com a peroxidase com TBS 30min antes da utilização
  19. Incubar as membranas com o imunocomplexo solúvel peroxidase e anticorpo antiperoxidase de coelho (PAP, Dako-Cytomation)
  20. Lavar brevemente duas vezes a membrana com TBS-T e incubar 15min em excesso de TBS-T à temperatura ambiente
  21. Fazer mais 3 lavagens da membrana com TBS-T, 5min à temperatura ambiente
  22. Revelar as reacções com “ECL Plus Western Blotting Detection System” (Amersham Biosciences); anexo 3

**Meios de cultura e reagentes**

- Tampão de amostra/SDS (2x)  
Tris HCl 0,125M + SDS 0,1% (p/v), pH 6,8  
Glicerol 20% (v/v)  
SDS 4% (p/v)  
β-mercaptoetanol 2% (v/v)
- Gel separador (12%)  
3ml acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)  
950μl tampão Tris 3M, pH 8,8  
3,22ml água  
75μl SDS 10%  
250μl persulfato de amónio (PSA) 10%  
5μl N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED)
- Gel de concentração (4%)  
250μl acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)  
500μl tampão Tris 3M, pH 8,8  
1,13ml água  
2μl SDS 10%  
100μl PSA 10%  
2μl TEMED
- Tampão de aplicação  
Tris.HCl 125mM  
Glicerol 20%  
SDS 4%  
Azul de bromofenol 0,01%  
β-mercaptoetanol 1% (pH 6,8)
- TBS  
8g NaCl  
20ml Tris HCl 1M, pH 7,6  
Diluir com água desionizada para 1000ml (verificar pH)
- Solução de Coomassie  
Metanol 50%  
Ácido acético 10%  
Coomassie R258 0,25%
- Solução de descoloração  
Metanol 25%  
Ácido acético 5%

## Anexo I

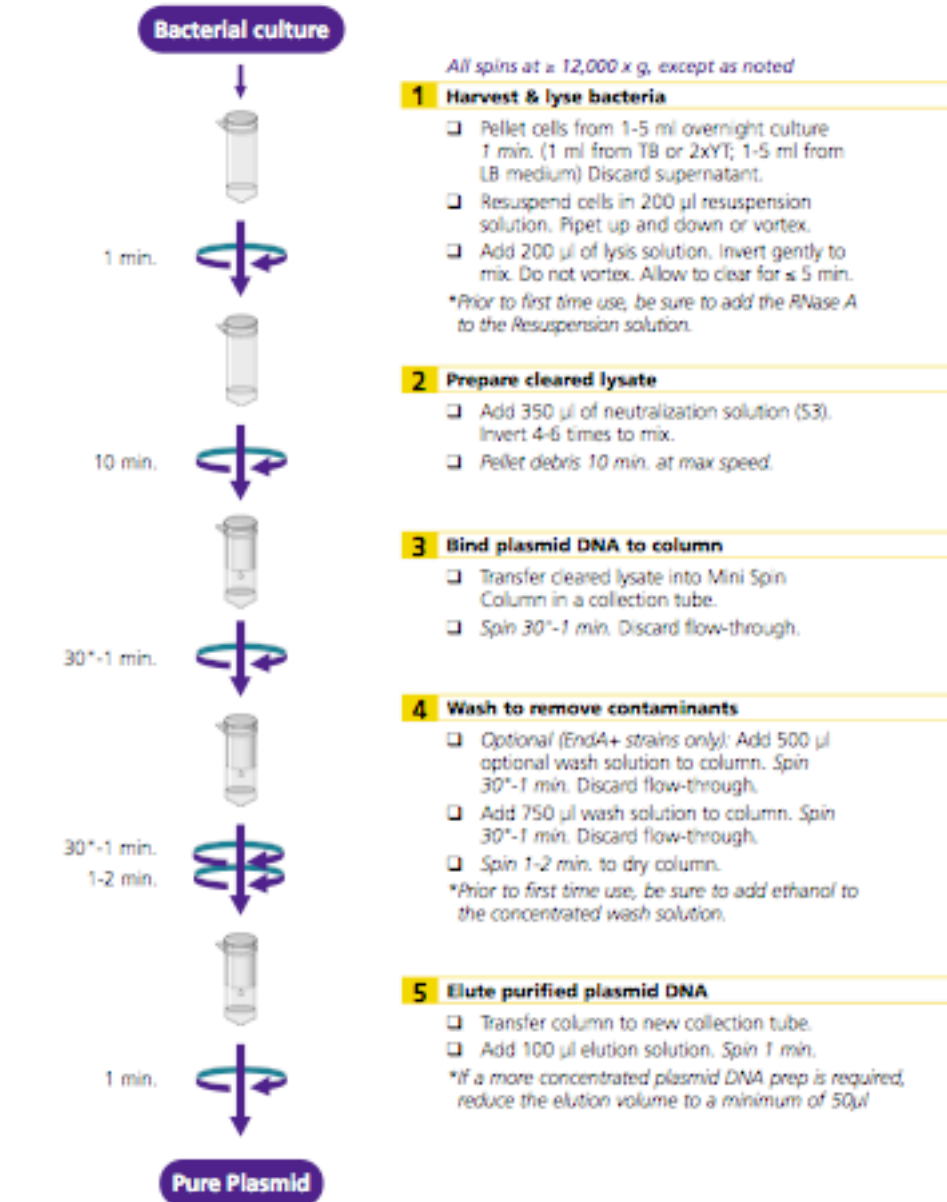
### Protocols

#### 1 General protocol

The procedure below is appropriate for all recommended applications excluding the two described in Protocol 2. It is based on use with a variable-speed microcentrifuge, but can be adapted for use with a clinical centrifuge, if required, or for use with MicroPlex 24. See the section "Centrifuge information" for additional details.

- 1.1 Resuspend the resin in the column by vortexing.
- 1.2 Loosen the cap one-fourth turn and snap off the bottom closure.
- 1.3 Place the column in a 1.5 ml screw-cap microcentrifuge tube for support. Alternatively, cut the cap from a flip-top tube and use this tube as a support.
- 1.4 Pre-spin the column at  $735 \times g$  (e.g. 3 000 rpm in an Eppendorf model 5415C variable-speed centrifuge with an 18-position fixed-angle rotor) for 1 min. Start the timer at the same time as you start the microcentrifuge.
- 1.5 Place the column in a new 1.5 ml tube, remove and discard the cap and slowly apply the sample to the top-center of the resin, being careful not to disturb the bed. Spin the column at  $735 \times g$  for 2 min. The purified sample is collected in the bottom of the support tube.

Anexo 2



## Anexo 3

### 5 Streptavidin bridge incubation

---

Protocol	Notes
5.1) Dilute the Streptavidin HRP conjugate or Streptavidin-biotinylated HRP complex in PBS-T or TBS-T.	5.1) The dilution factor should be determined empirically (see page 17).
5.2) Incubate the membrane in the dilution for 45–60 minutes at room temperature on an orbital shaker.	
5.3) Briefly rinse the membrane with two changes of wash buffer and then wash the membrane in > 4 ml/cm <sup>2</sup> of wash buffer for 15 minutes at room temperature.	
5.4) Rinse the membrane for 3 × 5 minutes with fresh changes of wash buffer at room temperature.	

### 6 Detection

---

Protocol	Notes
6.1) Remove the detection reagents from storage at 2–8 °C and allow to equilibrate to room temperature before opening.	
6.2) Mix detection solutions A and B in a ratio of 40:1 (for example, 2 ml solution A + 50 µl	6.2) If the mixed reagent is not to be used immediately protect it from exposure to the light either