



Manual de transformação genética de plantas

2ª edição revista e ampliada

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro

Editoras Técnicas

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Manual de transformação genética de plantas

2ª edição revista e ampliada

*Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro*

Editoras Técnicas

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)
70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê Local de Publicações

Presidente

João Batista Teixeira

Secretário-executivo

Thales Lima Rocha

Membros

Jonny Everson Scherwinski Pereira

Lucília Helena Marcellino

Lígia Sardinha Fortes

Marcio Sanches

Samuel Resende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Daniela Aguiar de Souza Kols (suplente)

João Batista Tavares da Silva (suplente)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Manual de transformação genética de plantas / Ana Cristina Miranda Brasileiro, Vera Tavares de Campos Carneiro, editoras técnicas. – 2. ed. rev. ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2015.
453 p. : il. color. ; 23,0 cm x 20,5 cm.

ISBN 978-85-7035-452-5

1. Planta. 2. Biotecnologia. 3. Engenharia genética. 4. Agricultura. 5. Melhoramento genético vegetal. I. Brasileiro, Ana Cristina Miranda. II. Carneiro, Vera Tavares de Campos. III. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD 631.5233

© Embrapa, 2015

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pela edição
Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial

Selma Lúcia Lira Beltrão

Lucilene Maria de Andrade

Nilda Maria da Cunha Sette

Supervisão editorial

Juliana Meireles Fortaleza

Wyviane Carlos Lima Vidal

Revisão de texto

Ana Maranhão Nogueira

Normalização bibliográfica

Iara Del Fiaco Rocha

Projeto gráfico e capa

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

1ª edição

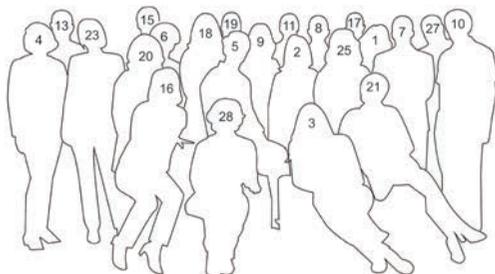
1ª impressão (1998): 2.000 exemplares

2ª edição

1ª impressão (2015): 500 exemplares

2ª impressão (2016): 500 exemplares

Autores



1) Ana Claudia Guerra Araujo

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biofísica), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

2) Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

3) Ana Cristina Miranda Brasileiro

Engenheira-florestal, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

4) Angela Mehta

Bióloga, Ph.D. em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

5) Cristiano Lacorte

Biólogo, doutor em Biologia Celular e Molecular de Plantas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

6) Diva Maria de Alencar Dusi

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Ciências de Plantas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

7) Eduardo Romano

Biólogo, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Foto: Claudio Bezerra Melo



8) Elíbio Leopoldo Rech

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

9) Érika Valéria Saliba Albuquerque

Bióloga, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

10) Francisco José Lima Aragão

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

11) Giovanni Rodrigues Vianna

Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

12) Glaucia Barbosa Cabral

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências (Energia Nuclear na Agricultura), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

13) Guy de Capdeville

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

14) Isabel Cristina Bezerra

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

15) Júlio Carlyle Macedo Rodrigues

Biólogo, Ph.D. em Biologia Molecular Vegetal, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

16) Leila Maria Gomes Barros

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

17) Luciano Paulino da Silva

Biólogo, Ph.D. em Biologia Animal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

18) Lucília Helena Marcellino

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

19) Marcelo Porto Bemquerer

Biólogo, doutor em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

20) Maria Cristina Mattar da Silva

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

21) Maria Fátima Grossi de Sá

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

22) Maria Imaculada Conceição dos Santos Gama

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, pesquisadora aposentada da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

23) Patrícia Messenberg Guimarães

Engenheira-agrônoma, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

24) Rosana Falcão

Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

25) Simone da Graça Ribeiro

Bióloga, doutora em Virologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

26) Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular de Microrganismos, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

27) Thales Lima Rocha

Biólogo, Ph.D. em Bioquímica e Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

28) Vera Tavares de Campos Carneiro

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Agradecimentos

Gostaríamos primeiramente de agradecer à chefia-geral e às chefias-adjuntas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelos incentivo e apoio à reedição deste Manual. Reconhecemos e agradecemos igualmente o trabalho e a dedicação da equipe da Embrapa Informação Tecnológica.

Tal como aconteceu na primeira edição, todos os capítulos foram analisados por especialistas nos diversos assuntos. Esses colaboradores nos repassaram críticas e sugestões que muito contribuíram ao aprimoramento do *Manual*. Agradecemos aos colegas de instituições parceiras de ensino e pesquisa que dedicaram bastante atenção a este trabalho: Pierre Marraccini, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (França); Maria Cristina Falco, Centro de Tecnologia Canavieira; Eni Braga e Marcelo C. Dornelas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Diana Fernandez, Institut de Recherche pour le Développement (França); Janice de A. Engler, Institut National de la Recherche Agronomique (França); Stephan Nielen, International Atomic Energy Agency (Áustria); Érica D. Silveira, Pontificia Universidad Católica Argentina (Argentina); Goran Robic, Lek Pharmaceuticals d.d., Menges (Eslovênia); Antônio Américo, Nicolau Brito, Octávio L. Franco e Simoni Dias, Universidade Católica de Brasília (UCB); Carlos André O. Ricart, Robert Miller, Rosana Blawid e Wagner Fontes, Universidade de Brasília (UnB); Maria Magdalena Rossi, Universidade de São Paulo (USP); Elisabeth A. Mansur de Oliveira, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); André Luís L. Vanzela, Universidade

Estadual de Londrina (UEL); Karina Proite, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Poliane A. Zerbini, Universidade Federal de Viçosa (UFV); Márcio Alves Ferreira, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); Maria Helena B. Zanettini e Márcia Pinheiro Margis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Nosso agradecimento vai também para colegas das Unidades da Embrapa: Adilson Kenji Kobayashi e Betânia Ferraz Quirino, Embrapa Agroenergia; Rosângela Bevitori, Embrapa Arroz e Feijão; Rodrigo da R. Fragoso, Embrapa Cerrados; Abi S. dos Anjos Marques, Embrapa Quarentena Vegetal; Ana Luiza M. Lacerda, André S. T. Irsigler, Andréa del Pilar de S. Penaloza, Juliana D. de Almeida, Kazumitsu Matsumoto, Larissa A. Guimarães, Lilian H. Florentino, Márcio M. Sanches, Marcos A. Gimenes, Marília de C. R. Pappas, Osmundo Brillhante, Sérgio A. Figueiredo e Vânia C. R. Azevedo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Carolina V. Morgante, Embrapa Semiárido; Francismar C. Guimarães, Embrapa Soja; e Vera Maria Quecini, Embrapa Uva e Vinho.

Agradecemos à desenhista Laura de Alencar Dusi, que realizou os esquemas apresentados na segunda edição do Manual. Este trabalho baseou-se, em alguns momentos, nas ilustrações da primeira edição, de Rodolfo B. Batista, a quem somos gratas por ter disponibilizado os desenhos.

Nossos agradecimentos aos autores pela dedicação e pelo rigor com que redigiram seus capítulos, pelo empenho em nos atender prontamente e por todas as demonstrações de entusiasmo e incentivo.

Finalmente, dedicamos este trabalho a nossas famílias, sempre presentes e compreensivas.

Apresentação

O melhoramento genético das culturas agrícolas no Brasil é um dos resultados mais contundentes das pesquisas desenvolvidas pelas instituições de pesquisas brasileiras, inclusive a Embrapa. Os impactos obtidos por meio da genética levaram a um novo desenho da agricultura do País.

Assim, o desenvolvimento científico e tecnológico permite, hoje, sinalizar uma nova época, associando a produção agropecuária às novas exigências da sociedade por padrões nutricionais, ambientais e de saúde. Entre os desenvolvimentos científicos e tecnológicos está a biotecnologia, que, na Embrapa, teve seu início na década de 1980.

A biotecnologia possui uma série de ferramentas que podem ser utilizadas nas estratégias de melhoramento genético. A engenharia genética (transformação genética de plantas pela transferência de genes), por exemplo, evoluiu rapidamente na última década e está presente, efetivamente, no cenário da produção de sementes de vários cultivos no País.

As oportunidades de utilização de organismos geneticamente modificados (OGMs) são infinitas e podem estar associadas às mais diversas áreas da produção agropecuária. Talvez, a mais importante delas seja no desenho e na implementação de novos processos visando à sustentabilidade da produção, por meio do aumento de produtividade, com qualidade, a um custo menor e

sem necessidade de aumentar a área de cultivo, e com redução do uso de insumos agrícolas.

Na Embrapa, essa área de pesquisa busca, principalmente, reduzir a necessidade de irrigação e de insumos agrícolas e abrir as fronteiras do conhecimento com uma equipe de pesquisadores que, em 1998, lançou o *Manual de transformação genética de plantas*. Esse manual teve como principal objetivo descrever as principais estratégias utilizadas para a transformação de plantas, beneficiando estudantes, profissionais e demais interessados em técnicas de biologia celular e molecular utilizadas para a transformação genética de plantas.

Em 2014, completam-se duas décadas do desenvolvimento do primeiro produto alimentar geneticamente modificado no mundo – um tomate com maior durabilidade criado na Califórnia, Estados Unidos. Vinte anos depois, o mercado de transgênicos na agricultura é cada vez mais expressivo. A cada 100 ha plantados com soja hoje no planeta, 80 ha são de sementes com genes alterados. No caso do milho, são 30 ha para cada 100 ha.

Nessas duas décadas, a área com culturas transgênicas subiu 100 vezes, de 1,7 milhão de hectares para 175,2 milhões. Os Estados Unidos lideram o plantio, seguidos pelo Brasil e Argentina. Entre os OGMs vegetais estão a soja, o milho, o algodão e a canola.

Para comemorar as duas décadas de OGMs no mercado mundial, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia lança, em 2015, a segunda edição do *Manual de transformação genética de plantas*, que, além

de revista e ampliada, apresenta novas técnicas desenvolvidas e adotadas neste período, com a colaboração de novos pesquisadores.

É com satisfação que oferecemos à comunidade técnico-científica e às instituições públicas e privadas os conhecimentos necessários para a transformação genética de plantas. Esperamos que as aplicações dessas

tecnologias contribuam para o desenvolvimento sustentável do agronegócio brasileiro e para a alimentação, a nutrição e a saúde de nosso povo.

Mauro Carneiro

Chefe-geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prefácio

Quando publicamos, em 1998, a primeira edição do *Manual de transformação genética de plantas*, o Brasil e o mundo ainda viviam um intenso debate sobre os benefícios e os riscos potenciais associados à tecnologia dos transgênicos. Nosso principal propósito, ao lançarmos a primeira edição naquela ocasião, era que o *Manual* se tornasse “um bom companheiro de bancada” para todos aqueles que desejam se iniciar ou se aperfeiçoar na pesquisa em biotecnologia. Acreditamos que conseguimos alcançar nosso objetivo, pois a primeira edição do *Manual* está esgotada há mais de 10 anos e a encontramos facilmente espalhada pelas bancadas de laboratórios de Norte a Sul do País. Temos inúmeros depoimentos de estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado, e de profissionais de todos os níveis que realmente tiveram, e ainda têm, o *Manual de transformação genética de plantas* como um companheiro inseparável. Hoje, quase 20 anos depois do lançamento da primeira edição, a adoção dos transgênicos é uma realidade, com 175 milhões de hectares plantados com cultivos geneticamente modificados em 27 países. Sentimos, então, a necessidade de atualizá-lo, aportando novas técnicas, excluindo aquelas obsoletas e revisando as publicadas na primeira edição.

A segunda edição vem, então, preencher a lacuna deixada pela primeira e oferecer à comunidade científica um material didático de qualidade em língua portuguesa. Nele, são apresentadas: as principais técnicas para clonagem de genes de interesse em vetores de

expressão para transformação de plantas (Capítulos 1 a 3); as principais metodologias atualmente utilizadas para a transformação genética de plantas envolvendo estratégias de transformação direta (Capítulos 4 e 5) e do sistema *Agrobacterium* (Capítulos 6 e 7); e a análise da atividade de genes repórteres no monitoramento da eficiência de transformação (Capítulo 8). Uma vez obtida uma planta geneticamente modificada, análises moleculares são necessárias para avaliar a introdução e integração do transgene (Capítulos 9 a 13), a sua correta transcrição (Capítulos 14 a 16), e a tradução e o endereçamento das proteínas codificadas (Capítulos 17 a 21). No final desta obra, há seis anexos contendo a descrição de meios para crescimento de bactérias e de cultura de plantas, preparo de soluções e tampões utilizados nos capítulos, assim como informações técnicas gerais que ajudarão o leitor a realizar seus experimentos.

Em cada capítulo, o leitor encontrará um breve embasamento teórico e a descrição metodológica detalhada da técnica abordada, com dicas e observações práticas para facilitar a compreensão das diferentes etapas do protocolo. A equipe de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza essas técnicas rotineiramente em seus laboratórios e procurou descrevê-las com o maior detalhamento possível, permitindo ao leitor adaptar o protocolo apresentado a outros laboratórios ou materiais vegetais.

Entregamos, assim, a toda a comunidade científica brasileira, a segunda edição do *Manual de transformação*

genética de plantas, revista e ampliada, esperando que este continue espalhado pelas bancadas dos laboratórios, como um “bom companheiro” de alunos e profissionais em suas rotinas de trabalho.

As Editoras

Prefácio à 1ª edição

Em 1995, organizamos pela primeira vez o curso *Métodos de transferência e expressão de genes em plantas*, que a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia oferece regularmente a estudantes de pós-graduação e pesquisadores que atuam na área. Naquela ocasião, sentimos a enorme carência de material didático em língua portuguesa. Para supri-la, tivemos a iniciativa de redigir este *Manual*. Nele, são apresentadas diferentes técnicas utilizadas na transformação genética de plantas: transferência de genes através da eletroporação de protoplastos e biobalística ou por vetores baseados no sistema *Agrobacterium*. Experimentos para a detecção da expressão de genes repórteres e análises moleculares da integração e da expressão de genes exógenos em plantas encontram-se também descritos. No final do *Manual*, foram adicionados oito apêndices contendo a descrição de meios de cultura e soluções utilizadas nos capítulos, uma relação das principais plantas transgênicas já obtidas, normas para constituição das Comissões Internas

de Biossegurança (CIBio) e um exemplo de plano de radioproteção.

Em cada capítulo, os autores forneceram o embasamento teórico da técnica abordada, que pode ser adaptada para outras espécies ou materiais vegetais. As técnicas apresentadas são utilizadas por pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e da Embrapa Hortaliças em sua rotina de laboratório, contribuindo, assim, com dicas e observações que facilitam a compreensão e a repetição dos protocolos. Qualquer sugestão sobre os protocolos descritos neste *Manual* será bem-vinda no seguinte endereço eletrônico: manual@cenargen.embrapa.br.

Nosso propósito é que este *Manual* acompanhe, como um bom companheiro de bancada, todos aqueles que desejam se iniciar ou se aperfeiçoar na pesquisa em biotecnologia.

As Editoras

Sumário

Introdução à transformação genética de plantas 15

Ana Cristina Miranda Brasileiro e Vera Tavares de Campos Carneiro

Capítulo 1

Cultivo e conservação de *Escherichia coli*
e *Agrobacterium* spp. 21

Ana Cristina Miranda Brasileiro e Patrícia Messenberg Guimarães

Capítulo 2

Isolamento de vetores para transformação direta 39

Francisco José Lima Aragão e Elíbio Leopoldo Rech

Capítulo 3

Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. 55

Cristiano Lacorte e Eduardo Romano

Capítulo 4

Eletroporação de protoplastos 73

Leila Maria Gomes Barros e Vera Tavares de Campos Carneiro

Capítulo 5

O sistema biobalístico 89

Giovanni Rodrigues Vianna, Francisco José Lima Aragão e Elíbio Leopoldo Rech

Capítulo 6

Transformação de plantas-modelo
via *Agrobacterium* spp. 105

Ana Cristina Miranda Brasileiro, Glaucia Barbosa Cabral e Maria Cristina Mattar da Silva

Capítulo 7

Expressão transiente e indução de silenciamento
utilizando *Agrobacterium* spp. e vetores virais 137

Cristiano Lacorte e Simone da Graça Ribeiro

Capítulo 8

Genes repórteres: *gus* (β -glucuronidase)
e *gfp* (proteína verde-fluorescente) 147

Cristiano Lacorte e Leila Maria Gomes Barros

Capítulo 9

Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais 165

Eduardo Romano e Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli

Capítulo 10

Análise de plantas transgênicas por
reação em cadeia da polimerase (PCR) 181

*Júlio Carlyle Macedo Rodrigues, Maria Imaculada Conceição dos Santos Gama
e Francisco José Lima Aragão*

Capítulo 11

Preparação de sondas 199

Simone da Graça Ribeiro e Ana Claudia Guerra Araujo

Capítulo 12

Análise da integração de transgenes
pela técnica de *Southern blot* 215

Eduardo Romano e Giovanni Rodrigues Vianna

Capítulo 13

Hibridização in situ por fluorescência (FISH) 233

Ana Claudia Guerra Araujo, Rosana Falcão e Guy de Capdeville

Capítulo 14

Análise de RNA total e RNA interferente
pela técnica *Northern blot* 261

*Patrícia Messenberg Guimarães, Isabel Cristina Bezerra
e Francisco José Lima Aragão*

Capítulo 15

Quantificação gênica pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa 283
Júlio Carlyle Macedo Rodrigues e Érika Valéria Saliba Albuquerque

Capítulo 16

Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais 303
Diva Maria de Alencar Dusi

Capítulo 17

Deteção de proteínas pela técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)..... 329
Francisco José Lima Aragão e Simone da Graça Ribeiro

Capítulo 18

Imunocitoquímica..... 343
Ana Cláudia Guerra Araujo e Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

Capítulo 19

Deteção e análise de proteínas pela técnica *Western blot*.... 359
Lucília Helena Marcellino e Maria Fátima Grossi de Sá

Capítulo 20

Análise proteômica por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa 377
Angela Mehta, Thales Lima Rocha e Maria Fátima Grossi de Sá

Capítulo 21

Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa 391
Luciano Paulino da Silva e Marcelo Porto Bemquerer

Apêndice 1

Meios para crescimento de bactérias 407

Apêndice 2

Meios de cultura de plantas e reguladores de crescimento..... 411

Apêndice 3

Antibióticos 417

Apêndice 4

Soluções e tampões 421

Apêndice 5

Informações técnicas gerais 431

Apêndice 6

Abreviaturas 437

Índice 441

Introdução à transformação genética de plantas

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Vera Tavares de Campos Carneiro

A incorporação da biotecnologia aos programas de melhoramento genético de plantas, tão debatida nas décadas passadas, é hoje uma realidade e permitiu acelerar o processo de obtenção de variedades com características superiores, de uma maneira mais acurada e eficiente. A partir de 1996, a adoção da tecnologia dos transgênicos impôs uma reestruturação da cadeia produtiva em todo o mundo, com uma área de 181 milhões de hectares em 2014 plantada com cultivos geneticamente modificados em 28 países.

O Brasil, após os Estados Unidos, é hoje o segundo maior produtor de transgênicos no mundo, com cerca de 40 milhões de hectares plantados com plantas geneticamente modificadas (PGMs) de soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e milho (*Zea mays*). Na safra 2014/2015, estima-se que, pela primeira vez no Brasil, a área plantada com cultivares transgênicas será maior do que com cultivares convencionais. A maioria dos países que cultiva PGM criou uma legislação própria de biossegurança, e, no Brasil, todas as etapas de produção de uma PGM devem atender às exigências de biossegurança e à aprovação pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio), descritas nas leis nº 8.974/1995 e 11.105/2005.

O desenvolvimento de uma PGM envolve várias áreas de conhecimento, em particular a biologia celular e molecular, e utiliza processos que vão desde a prospecção e o isolamento de genes de interesse até a fenotipagem a campo dos eventos transgênicos mais promissores. A tecnologia dos transgênicos permite que genes oriundos de

qualquer organismo possam ser introduzidos e expressos de forma controlada no genoma vegetal receptor, de modo independente da fecundação, tornando ilimitado o *pool* gênico a ser explorado por essa tecnologia. Assim, a prospecção e a caracterização de genes e moléculas que possam conferir novas características às plantas, e sua disponibilização para programas de melhoramento genético, têm sido prioridade para diferentes equipes. Em particular, nos últimos anos, o sequenciamento e a análise em larga escala do genoma e do transcrito de várias espécies vegetais e de outros organismos têm possibilitado a identificação de novos genes de interesse. Entretanto, até o momento, ainda é relativamente pequena a lista de genes que sejam comprovadamente efetivos e que já tenham sido introgrididos com sucesso em variedades comerciais. A grande maioria das culturas comerciais de transgênicos do mundo contém duas características: resistência a insetos ou tolerância a herbicidas, ou a combinação delas.

Após a prospecção e identificação de um gene de interesse, ele deve ser clonado em um vetor de expressão, e sua função deve ser validada in planta para obtenção da prova de conceito. O gene-candidato pode ser superexpresso ou silenciado em plantas-modelo, como *Arabidopsis thaliana*, fumo (*Nicotiana tabacum*) ou arroz (*Oryza sativa*) ou diretamente na planta-alvo. Para tal, é necessário o uso de protocolos eficientes de transformação, a incorporação adequada do transgene no genoma da planta e sua correta expressão nos tecidos-alvo. Uma posterior avaliação fenotípica acurada dos eventos transgênicos que se mostrarem

promissores, sob condições parcialmente controladas (casa de vegetação) ou em campo, também se faz necessária. Essa avaliação consiste no estudo das características fisiológicas, moleculares e anatômicas das plantas transgênicas, assim como de eventuais efeitos pleiotrópicos indesejáveis relacionados à introdução do transgene.

Apesar dos grandes avanços do conhecimento nessa área, as estratégias de transformação de plantas continuam majoritariamente restritas ao uso dos sistemas *Agrobacterium* e o biobalístico. A bactéria fitopatogênica, *Agrobacterium tumefaciens*, é um eficiente vetor natural para engenharia genética de plantas, tanto de dicotiledôneas como de monocotiledôneas. Durante o seu processo de infecção, essa bactéria do solo transfere, às células vegetais, parte de seu genoma, o T-DNA. No início da década de 1980, o conhecimento das bases moleculares do mecanismo de infecção mostrou que o T-DNA da agrobactéria pode ser manipulado por engenharia genética de maneira a portar genes de interesse em substituição aos genes responsáveis pela infecção, sem alterar o seu processo de transferência e integração no genoma da planta. As agrobactérias são, por isso, chamadas de engenheiros genéticos naturais. A regeneração das células que contêm o T-DNA engenheirado dará origem a plantas transgênicas, transmitindo o gene integrado à progênie de forma Mendeliana.

Outras metodologias de introdução e expressão de genes exógenos no genoma de plantas também foram desenvolvidas e aperfeiçoadas e podem também ser

aplicadas, tanto em dicotiledôneas quanto monocotiledôneas. Essas técnicas, conhecidas como métodos diretos de transformação, permitem a introdução do DNA contendo o gene de interesse em células e tecidos vegetais in vivo por meio de mecanismos físicos ou químicos. Na eletroporação de protoplastos, por exemplo, utilizam-se pulsos elétricos de alta voltagem em uma solução contendo DNA e protoplastos, que são células vegetais desprovidas de paredes celulares. O choque elétrico promove a formação de poros reversíveis nas membranas celulares e, assim, possibilita a passagem e introdução de macromoléculas nas células. Essa metodologia exige técnicas precisas de cultura de tecidos, uma vez que a regeneração a partir de protoplastos, muitas vezes genótipo-específica, deve ser desenvolvida. Outra metodologia de transformação direta, o bombardeamento de partículas ou sistema biobalístico, utiliza micropartículas impulsionadas em alta velocidade para carrear DNA exógeno para dentro das células. As partículas penetram na parede e na membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares e podem ser usadas em tecidos intactos, dispensando procedimentos prévios de cultura de tecidos. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma do organismo receptor.

Ao longo dos últimos anos, o estabelecimento dos mais diversos protocolos de transformação genética de plantas, utilizando o sistema *Agrobacterium* ou o sistema biobalístico, foi realizado, sobretudo, em plantas-modelo e, posteriormente, adaptado a outras plantas de

interesse agrônomo, geralmente mais recalcitrantes à transformação. Atualmente, são inúmeros os protocolos estabelecidos, e não existe nenhuma espécie vegetal de importância comercial ou científica para a qual não exista protocolo estabelecido, com maior ou menor eficiência de transformação em função da espécie ou do genótipo estudado. Plantas-modelo apresentam, por sua vez, grande interesse em estudos básicos de biologia em virtude da alta eficiência dos protocolos de transformação, da grande quantidade de ferramentas genéticas e genômicas disponíveis, do ciclo de vida curto e genoma relativamente pequeno, entre outras características. Estudos da função biológica e regulação da expressão de diferentes genes em plantas-modelo são realizados utilizando-se estratégias de superexpressão ou expressão específica com o uso de promotores constitutivos, com regulação temporal ou espacial, ou induzíveis sob condições específicas. Por sua vez, estratégias de redução ou supressão da expressão também podem ser aplicadas nesses estudos por meio de diferentes mecanismos de regulação gênica negativa como a do RNA interferente (RNAi), silenciamento gênico transcricional, silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) ou pequenos RNAs (microRNAs).

A pesquisa que envolve a transgenia busca ampliar o número de espécies vegetais e de genes de interesse disponíveis, visando aumentar o leque de oferta de genótipos que apresentam características superiores à isolinha não transgênica para os programas de melhoramento genético de plantas. Essas características devem ir além daquelas utilizadas atualmente em cultivares transgênicas e

abordar outras características agrônomicas importantes como tolerância a condições ambientais adversas (seca, temperaturas extremas, salinidade, metais pesados, luminosidade extrema, excesso de CO₂, etc.), resistência a pragas (insetos, fungos, bactérias, nematoides e vírus), maior produtividade, aumento da qualidade de sementes e frutos, aumento do valor nutricional, modificações de arquitetura e modo de reprodução, entre outras. Estratégias de piramidação de genes, quando dois ou mais eventos de transformação genética (*stacked events*) estão presentes em uma mesma PGM, também é uma tendência das pesquisas para obtenção de genótipos com características múltiplas. Além do seu uso agrônomo, em um futuro breve, as PGMs serão também utilizadas como biorreatores para a produção em larga escala de proteínas e moléculas de interesse para a indústria farmacêutica (vacinas e fármacos), alimentícia ou cosmética, com redução dos custos de produção e com um enorme impacto para a sociedade. Além de todas essas implicações, as PGMs constituem também uma excelente ferramenta para estudos básicos em diferentes campos da biologia, como fisiologia, genética, botânica, biologia molecular e celular.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia estabeleceu, desde o início dos anos 1980, uma equipe de pesquisadores especializada em prospecção, identificação, caracterização e clonagem de genes de interesse e no desenvolvimento de protocolos e metodologias para obtenção e análise de plantas transgênicas. Hoje, essa equipe é responsável pelo desenvolvimento de

diferentes produtos biotecnológicos, em parceria com outras Unidades de pesquisa da Empresa, mas também com instituições públicas e privadas de ensino e pesquisa, no Brasil e no mundo. Entre as tecnologias geradas pela equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia destacam-se variedades transgênicas de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) resistentes ao vírus-do-mosaico-dou-

rado (BGMV), produzido em colaboração com a Embrapa Arroz e Feijão, e a soja resistente a herbicidas, em parceria com a Embrapa Soja e a empresa Basf. Essas cultivares transgênicas já receberam aprovação da CTNBio para a produção comercial, e novas tecnologias estão a caminho para oferecer ao produtor brasileiro a oportunidade de usar a tecnologia transgênica em cultivares nacionais.

Capítulo 1

Cultivo e conservação
de *Escherichia coli* e
Agrobacterium spp.

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Patrícia Messenberg Guimarães

1 Introdução

Uma das primeiras etapas no desenvolvimento de uma planta transgênica consiste na construção de um vetor para a transformação, contendo, de maneira geral, um gene de interesse e um gene marcador de seleção ou repórter e as respectivas sequências regulatórias para expressão no sistema eucarioto vegetal. Esses vetores são, geralmente, plasmídios bacterianos construídos de forma a conter a origem de replicação compatível com *Escherichia coli*, que é organismo preferencial para a engenharia genética. Uma vez obtido, o vetor de transformação poderá ser utilizado em um sistema de transformação direta (Capítulo 2) ou transferido para uma linhagem de *Agrobacterium* spp., visando utilizar essa bactéria como vetor natural de transformação (Capítulo 3). Assim, a estruturação e a conservação de uma coleção de linhagens de *E. coli* e *Agrobacterium* spp. são estratégicas para laboratórios que trabalham com transformação genética de plantas, pois esse acervo permitirá a preservação, a troca e a salvaguarda das linhagens e dos vetores nelas contidos. Uma vez estabelecida uma coleção, sua manutenção deverá garantir a sobrevivência, a estabilidade e a pureza das culturas, conservando suas características genéticas e propriedades morfológicas e fisiológicas por longo prazo.

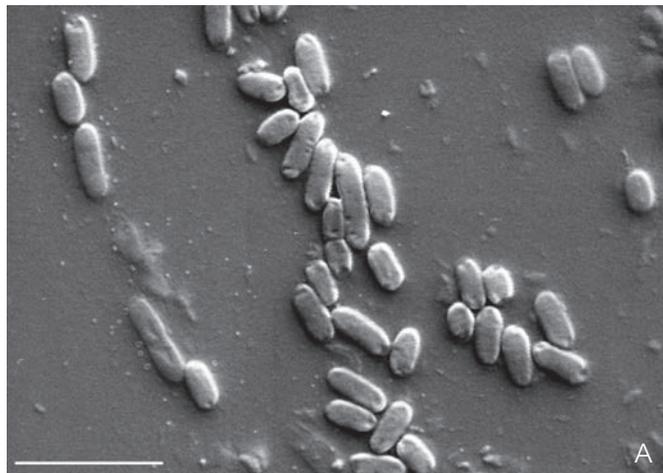
Escherichia coli

Escherichia coli é um microrganismo unicelular, Gram-negativo, que pertence à família Enterobacteriaceae e contém membrana externa composta principalmente de

lipossacarídeos. Membros dessa espécie apresentam forma de bacilo, com tamanho de 1,1 μm a 1,5 μm x 2,0 μm a 6,0 μm , são anaeróbicos facultativos, móveis por meio de flagelos peritríquios e crescem a 37 °C (Figura 1A). Quanto à atividade bioquímica, membros dessa espécie são oxidase negativa, catalase positiva, reduzem nitrato, fermentam lactose, possuem lisina descarboxilase, são Voges Proskauer negativos, produzem indol, não apresentam crescimento em nitrato e não produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S) (HOLT et al., 1994).

E. coli é um inócuo ocupante comensal do intestino humano, que também exerce funções benéficas, já que contribui para a supressão do crescimento de outras espécies bacterianas danosas e para a síntese de vitaminas K e B12 (ELSAS et al., 2011). Essa bactéria é componente importante da comunidade microbiana, colonizando o intestino grosso de várias espécies animais e apresentando altas taxas de sobrevivência no meio ambiente, o que possibilita ampla disseminação para novos hospedeiros. As linhagens patogênicas de *E. coli*, por sua vez, são responsáveis por infecções nos sistemas digestivo, urinário, respiratório e nervoso, causando desde simples incômodo até a morte (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006).

Há décadas, linhagens atenuadas de *E. coli* são rotineiramente utilizadas em estudos de DNA recombinante. Segundo alguns autores (MADIGAN et al., 2000; WEAVER; HEDRICK, 1989), as principais razões para a ampla utilização dessa bactéria são:



Fotos: Ana Cristina Menezes Gomes

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura mostrando isolados (A) da linhagem DH5- α de *Escherichia coli* (barra = 5 μm) e (B) da linhagem C58 de *Agrobacterium tumefaciens* (barra = 2 μm).

- Baixa complexidade genética: possui genoma pequeno (4.400 genes), além de ser haploide, o que elimina a possibilidade de um segundo alelo mascarar os efeitos de mutações durante experimentos de engenharia genética.
- Alta taxa de crescimento: cresce rapidamente, produzindo uma nova geração a cada 20 minutos sob condições ideais, possibilitando que a sua fase exponencial de crescimento seja atingida após 12 horas. Dessa forma, experimentos com essa bactéria podem ser realizados em apenas algumas horas.
- Segurança biológica: é naturalmente encontrada no intestino humano e, apesar da existência de linhagens patogênicas produtoras de toxinas, a maioria é inócua ao organismo humano quando manipulada dentro das normas de saúde e segurança laboratorial.
- Estrutura genômica conhecida: o genoma de *E. coli* foi completamente sequenciado, e seu mapeamento genético é facilitado pela conjugação entre linhagens. É o organismo cuja genética é a mais estudada, incluindo seus mecanismos de expressão.

- Capacidade de hospedar DNA exógeno: células competentes de *E. coli* podem ser facilmente transformadas com plasmídios ou com outros vetores recombinantes (Capítulo 2). Células de *E. coli* também podem sofrer transdução por bacteriófagos.

Linhagens de *E. coli* manipuladas geneticamente são utilizadas para produzir grandes quantidades de DNA recombinante por meio da inserção (clonagem) da sequência de DNA de interesse em um vetor, o qual é definido neste Manual como uma molécula de DNA circular com uma origem de replicação bacteriana compatível. Esse vetor, contendo a sequência de interesse (vetor recombinante), é, então, introduzido por transformação em uma célula hospedeira de *E. coli* (Capítulo 2). Em razão do rápido crescimento da colônia bacteriana transformada, derivada de uma única célula original que contém o vetor recombinante (clone), em poucas horas, é produzido exponencialmente um grande número de cópias desse vetor. Essa habilidade da bactéria em produzir moléculas de interesse, como a insulina, os antibióticos ou outras proteínas de uso farmacêutico, é explorada com sucesso pela indústria (CHEN, 2012; WILLIAMS et al., 1982).

A linhagem de *E. coli* mais comumente utilizada em laboratório é a K-12, cujo genoma foi completamente sequenciado em 1997 (BLATTNER et al., 1997) e é constituída de apenas um cromossomo circular, de aproximadamente 4.600 kb, com 4.300 regiões codificadoras identificadas e apenas 1.800 proteínas com função co-

nhecida. Atualmente, existem várias linhagens derivadas de *E. coli* K-12 que, por sua vez, apresentam características específicas desenvolvidas para facilitar a clonagem e a expressão de genes e proteínas recombinantes (Tabela 1).

***Agrobacterium* spp.**

As agrobactérias são microrganismos tipicamente do solo, aeróbicas e Gram-negativas, movendo-se na rizosfera por meio de dois flagelos polares e de dois a quatro filamentos laterais. Suas células em forma de bacilo apresentam tamanho de 0,6 µm a 1,0 µm x 1,5 µm a 30 µm, ocorrendo isoladas ou aos pares, e não formam esporos (Figura 1). As agrobactérias foram inicialmente classificadas no gênero *Agrobacterium* e, após revisão em 2001, foram incluídas no gênero *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001, 2005). Entretanto, essa revisão taxonômica ainda é contestada e não é adotada completamente (FARRAND et al., 2003; LINDSTRÖM; YOUNG, 2011). Além disso, o sequenciamento completo do genoma de diferentes linhagens de *Agrobacterium* mostrou alta conservação, mesmo entre espécies diferentes, o que pode ser considerado um novo ponto de partida para uma reclassificação do gênero (GELVIN, 2009; MORIGUCHI et al., 2001; SLATER et al., 2009, 2013). Vários laboratórios já utilizam como rotina técnica como PCR ou RFLP, para identificar e comparar as linhagens de *Agrobacterium* spp. em estudos de filogenia, fitopatologia, epidemiologia, entre outros. No presente Manual, as agrobactérias serão consideradas, ainda, como membros do gênero *Agrobacterium*, pertencentes à família Rhizobiaceae, que também agrupa os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*,

Tabela 1. Marcadores genéticos encontrados em linhagens de *Escherichia coli* comumente utilizadas em engenharia genética.

Gene	Descrição do marcador	Função
Expressão de proteínas		
DE3	Codifica para o promotor da T7 RNA polimerase de bacteriófago	Usado para expressão proteica induzida pelo promotor T7
lon	Inativação da Lon ATPase–protease	Diminui a degradação de proteínas recombinantes
ompT	Mutação em protease da membrana externa	Aumenta a produção de algumas proteínas recombinantes
pLys	O plasmídeo pLys codifica para a T7 lisozima	Inibe a expressão da T7 RNA polimerase, pois suprime a expressão basal do promotor T7
relA	Elimina fator de estringência (inibição de transcrição) resultando em fenótipo relaxado	Possibilita a síntese de RNA na ausência da síntese proteica
Seleção de recombinantes		
gyrA96	Mutante de DNA girase	Confere resistência a ácido nalidíxico
lacY1	Mutante da β-D-galactosidase	Bloqueia o uso de lactose, o que aumenta o controle de promotores induzidos pelo IPTG
lacZ	Codifica para β-D-galactosidase	Sua mutação produz colônias brancas (em vez de azuis) na presença do X-Gal
lacZΔM15	Deleção parcial do gene da β-D-galactosidase	Usado para seleção de recombinantes em azul/branco
lacI	Codifica para o repressor lac que controla a expressão de promotores que carregam o operon lac	Inibe transcrição do operon lac
P3	O plasmídeo P3 contém genes de resistências a canamicina, tetraciclina e ampicilina	Possibilita a seleção de recombinantes
rpsL	Mutação na proteína ribossomal S12	Confere resistência a estreptomicina
Tn10	Transposon	Confere resistência a tetraciclina

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Gene	Descrição do marcador	Função
Clonagem		
dam/dcm	Elimina a metilação endógena na adenina da sequência GATC (dam) ou a na citosina da sequência CCWGG	Usado para propagar DNA a ser clivado por certas enzimas de restrição (como Ava II, Bcl I)
endA	Mutação na enzima Endonuclease I	Elimina atividade de endonuclease específica
F'	Plasmídio auto-replicativo de baixa cópia utilizado para a produção de DNA de fita simples quando infectado com o fago M13	Contém um marcador de resistência para facilitar sua manutenção e carrega os genótipos lacI and lacZΔM15
hsd	Mutações no sistema de metilação e de restrição enzimática	Possibilita <i>E. coli</i> reconhecer DNA exógeno
mcrA, mcrBC, mrr	Mutações em sítios específicos de metilcitosinas	Permite que o DNA metilado não seja reconhecido como exógeno
nupG	Mutação no transporte de nucleosídeos	Aumenta a incorporação de plasmídios
recA	Mutação em gene responsável por recombinação e reparo de DNA em <i>E. coli</i>	Impede a recombinação do DNA introduzido (inserto) com o da hospedeira (<i>E. coli</i>) aumentando a estabilidade do inserto
supE,F	Mutação supressora	Suprime as mutações âmbar (supE) (UAG) e tirosina (supF)
tonA	Mutação em proteína da membrana externa	Confere resistência ao bacteriófago T1, T5 e f80
tsx	Mutação em proteína da membrana externa	Confere resistência ao fago T6
traD, D36	Mutação em fator de transferência	Previne a transferência do epissoma F'
Crescimento em meio de cultura		
ara-14	Bloqueia o catabolismo do açúcar arabinose	Bloqueia a utilização da arabinose
argF	Mutação na ornitina carbamiltransferase	Bloqueia a habilidade de utilizar o aminoácido arginina
galK	Mutação na enzima galactoquinase	Bloqueia o catabolismo da galactose
galU	Mutação na glucose-1-fosfato uridiltransferase	Bloqueia a habilidade de usar galactose
leuB	Mutação na biosíntese de leucina	Requer leucina em meio mínimo para crescimento

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Gene	Descrição do marcador	Função
proAB	Mutação na biosíntese de prolina	Requer prolina para crescimento em meio mínimo de cultura
thi-1	Mutação na biosíntese de tiamina	Requer tiamina para crescimento em meio mínimo
xyl-5	Mutação no metabolismo de xilose	Bloqueia o catabolismo de xilose

Existem várias linhagens de *E. coli* (como XL1-Blue, DH1, DH5- α , JM 101, DH1, BL21, M15 e DB3), disponíveis comercialmente, que abrigam diferentes combinações dos genes citados. O genótipo dessas, e de várias outras linhagens, podem ser encontrados em <http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes>.

Fonte: *E. coli* genotypes (2014).

que são bactérias fixadoras de nitrogênio (KERSTERS; DE LEY, 1984). O gênero *Agrobacterium* (do grego *agros* = campo e *bakterion* = bastonete) está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em plantas distintas. *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa (*crown gall*; Figura 2), *A. rhizogenes* causa a raiz-em-cabeleira (*hairy root*), *A. rubi* induz tumores especificamente em *Rubus* spp. (*cane gall*), *A. vitis* induz tumores preferencialmente em videiras (*Vitis* spp.) e *A. radiobacter* é saprófita (isto é, não patogênica). As diferentes espécies de *Agrobacterium* podem ser subdivididas em três biovars (ou biotipos), baseados em características fisiológicas e bioquímicas que são determinadas pelo cromossomo bacteriano (Tabela 2).

As agrobactérias ocorrem em quase todos os tipos de solos, cultivados ou não. São geralmente encontradas nas galhas ou em estreita associação com raízes ou no solo adjacente às plantas. Mesmo em solos com elevada incidência da galha-da-coroa, os isolados de *A. radiobacter*

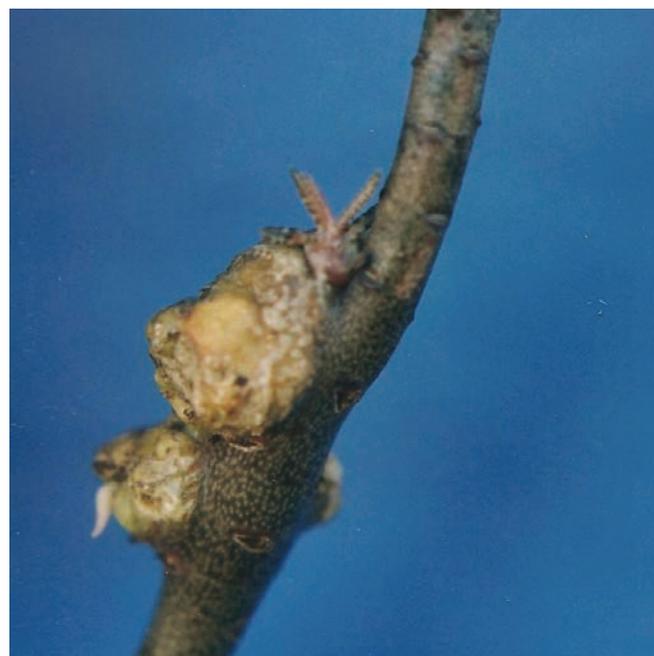


Foto: Cristiano Lacorte

Figura 2. Sintoma típico da galha-da-coroa em planta de kalanchoe (*Kalanchoe tubiflora*), induzidas pela inoculação artificial com linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens*.

(não patogênicos) são de 10 a 100 vezes mais numerosos que os das outras espécies patogênicas. As diferentes espécies do gênero *Agrobacterium* ocorrem em todo o mundo, preferencialmente em regiões de clima temperado devido à sua sensibilidade a temperaturas acima de 34 °C (KRIMI et al., 2002; LIPPINCOTT et al., 1981).

Mais de 600 espécies vegetais são conhecidamente susceptíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, sendo que a maioria pertence às Gymnospermas e Angiospermas dicotiledôneas, sendo mais raras nas Angiospermas monocotiledôneas (CLEENE; LEY, 1976; KARAMI et al., 2009). Embora de baixa incidência, a galha-da-coroa pode tomar proporções devastadoras em certas culturas, conduzindo à perda quase total da produção, principalmente em espécies ornamentais, frutíferas e florestais, que são propagadas

Tabela 2. Características de diferentes biovars do gênero *Agrobacterium*.

Característica	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3
Produção de 3-cetolactose	+	-	-
Temperatura máxima de crescimento	37 °C	29 °C	35 °C
Utilização de eritritol	-	+	-
Utilização de L-tartarato de sódio	-	+	+
Tolerância a NaCl 2%	+	-	+

Fonte: Lippincott et al. (1981) e Matthyse (2006).

vegetativamente. Apesar de a galha-da-coroa não ser uma doença de importância econômica para o Brasil, existem relatos de sérios danos causados por essa doença em várias culturas, como pessegueiro, roseira, videira, ameixeira, chuchuzeiro, alface, mandioca, entre outras, em vários estados do País (BARROS et al., 2004; BERIAM et al., 1996; GOMES et al., 1998; ROMEIRO, 1995).

Estudos realizados a partir da década de 1980 concluíram que o surgimento da galha-da-coroa é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes presentes em *Agrobacterium* spp. para a célula vegetal (Figura 3) (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2010; GELVIN, 2009; PĂCURAR et al., 2011). Nos momentos iniciais do processo de infecção, moléculas-sinais exsudadas pela célula vegetal, em resposta a um ferimento, vão ativar genes localizados na região de virulência (região vir) de um plasmídio de alto peso molecular, denominado Ti, presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium*. As diversas proteínas codificadas pelos genes presentes na região *vir* vão promover a transferência da bactéria para a célula vegetal de outra região do plasmídio Ti, a região T-DNA. Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado, de forma estável, no genoma vegetal. Os genes presentes no T-DNA de *A. tumefaciens*, conhecidos como oncogenes, são então transcritos no sistema eucarioto vegetal, codificando enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas; Capítulo 3). Como consequência desse desequilíbrio hormonal, as células transformadas

proliferam-se desordenadamente, levando à formação da galha-da-coroa. Em *A. rhizogenes*, a expressão dos oncogenes induz a produção de raízes no local do ferimento, devido, provavelmente, a um aumento da sensibilidade à auxina nas células transformadas, formando a raiz-em-cabeleira. O T-DNA também possui genes que codificam

enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são aminoácidos ou carboidratos modificados. As opinas produzidas pelas células transformadas são utilizadas exclusivamente pela *Agrobacterium* infectante, como fonte de energia, carbono e nitrogênio, sendo, portanto, as intermediárias químicas do parasitismo.

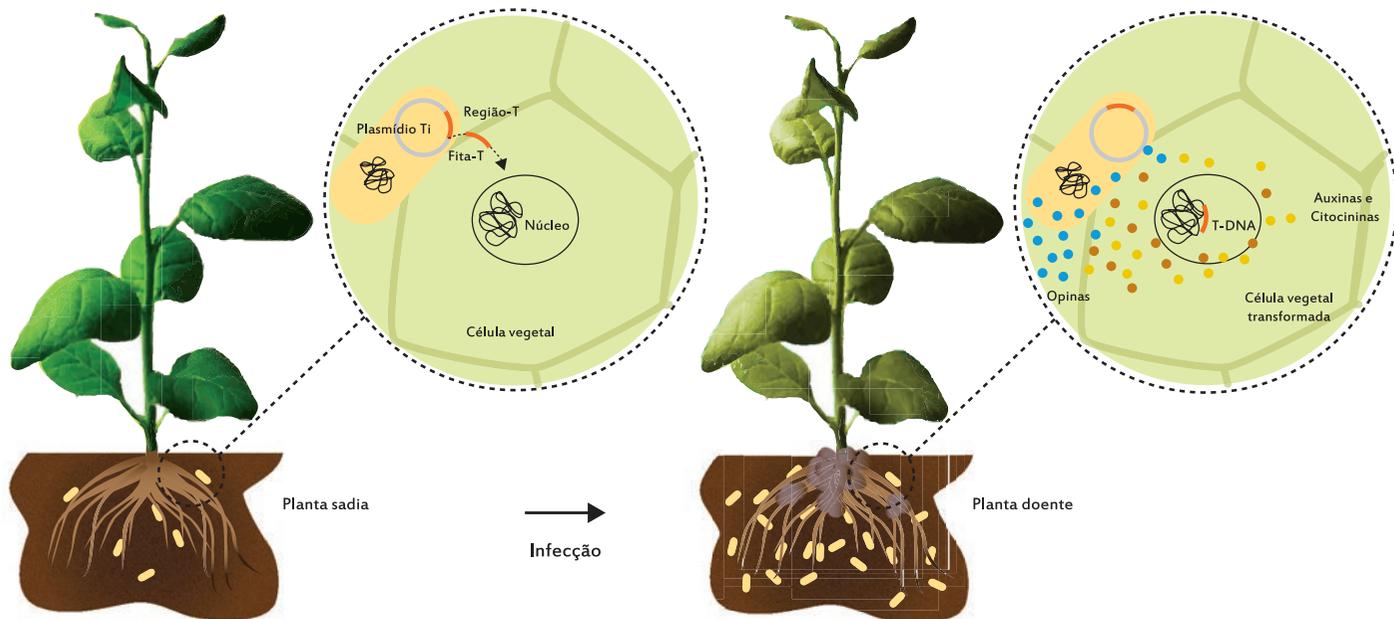


Figura 3. Esquema do processo natural de infecção de uma planta por *Agrobacterium tumefaciens*. As bactérias presentes no solo são atraídas por moléculas-sinal, liberadas pela planta em resposta a um ferimento. Após a indução dos genes de virulência do plasmídeo Ti, o T-DNA é transferido da bactéria para o genoma da planta em forma de fita simples (fita-T). Os genes presentes no T-DNA serão então expressos, sintetizando opinas e hormônios vegetais (citocininas e auxinas). A formação da galha é o resultado do desequilíbrio hormonal provocado pela síntese desses hormônios nas células transformadas.

Fonte: adaptado de Brasileiro e Lacorte (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

Os conhecimentos gerados, desde então, culminaram com um entendimento bastante aprofundado do parasitismo *Agrobacterium*/planta, sendo considerado atualmente um sistema modelo para os estudos das interações patógeno/hospedeiro, do transporte intercelular de macromoléculas e do direcionamento de proteínas para o núcleo. Nos últimos anos, o sofisticado e fascinante mecanismo de transferência de informação genética dessas bactérias para as plantas tem propiciado o uso de *Agrobacterium* como vetor natural de transferência de genes, permitindo a obtenção de um grande número de plantas geneticamente modificadas (Capítulo 6). Além de plantas, *Agrobacterium* pode transformar, em condições de laboratório, uma vasta gama de organismos eucarióticos, incluindo desde fungos filamentosos, levedura, cogumelos cultivados a ouriço-do-mar e células humanas (BULGAKOV et al., 2006; LACROIX et al., 2006). Essas descobertas possibilitaram a utilização de *Agrobacterium* como um vetor universal de transformação genética de todos os organismos eucarióticos.

Conservação de linhagens bacterianas (*Escherichia coli* ou *Agrobacterium* spp.)

A correta conservação de uma coleção de linhagens de bactérias deve obedecer aos seguintes critérios (ASMA, 1995; WISE et al., 2006):

- Culturas introduzidas devem ser comprovadamente puras (origem clonal).

- Subculturas frequentes devem ser evitadas, pois podem aumentar os riscos de contaminação, de erros de etiquetagem ou de ocorrência de mutações somáticas.
- A perda de viabilidade das células durante a preparação, o armazenamento e o restabelecimento das culturas deve ser a menor possível.
- Culturas devem manter-se geneticamente estáveis durante todo o período de armazenamento.

Os níveis de estabilidade genética e viabilidade de uma cultura durante seu armazenamento podem ser mantidos pela redução da atividade metabólica da célula bacteriana, por meio de diferentes estratégias, que podem ser aplicadas simultaneamente ou não: ausência de oxigênio, armazenamento em meio mínimo, redução da temperatura, remoção quase total de água, entre outras (GHERNA, 1981). A escolha do método de conservação deve levar em conta a demanda e a disponibilidade de equipamentos (congelador a -80 °C, liofilizador, etc.). De qualquer modo, métodos diferentes podem ser adotados de forma a disponibilizar culturas para as mais diversas finalidades (DIETZ; CHURCHILL, 1985; KIRSOP; DOYLE, 1991).

Neste capítulo, serão descritos métodos básicos para o cultivo de linhagens de *E. coli* e *Agrobacterium* spp. nos meios de cultura semissólido e líquido para sua conservação a médio e longo prazos.

2 Cultivo da bactéria

2.1 Material

- Agitador do tipo orbital com controle de temperatura.
- Alça de platina.
- Bico de Bunsen.
- Erlenmeyer de 25 mL.
- Incubadora com controle de temperatura.
- Meios de cultura para crescimento de bactérias LB (para linhagens de *E. coli*; Apêndice 1) e LB, MYA ou YMB (para linhagens de *Agrobacterium* spp.; Apêndice 1), contendo os antibióticos apropriados.
- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).

2.2 Procedimento

1. Em uma capela de fluxo laminar, aquecer uma alça de platina na chama de um bico de Bunsen até que ela se torne incandescente. Afastar a alça da chama e aguardar até que ela esfrie.
2. Transferir, com a alça, uma colônia circular e isolada (clone) da cultura, recém-crescida em meio de cultura contendo 0,6% (p/v) de ágar, para 5 mL do meio de cultura líquido em um Erlenmeyer de 25 mL.

Para uma perfeita aeração durante o crescimento da cultura, recomenda-se que a capacidade do frasco (tubo ou Erlenmeyer) seja, no mínimo, quatro vezes superior ao volume de meio utilizado.

É importante que a cultura seja iniciada a partir de uma colônia isolada para garantir sua pureza, isto é, que cada colônia isolada represente um clone de uma única bactéria.

3. Cultivar as bactérias em um agitador do tipo orbital, a uma frequência de agitação de 100 rpm a 150 rpm e a uma temperatura de 37 °C para *E. coli* e entre 25 °C e 28 °C para *Agrobacterium* spp. Nessas condições, culturas de *E. coli* atingirão sua fase exponencial de crescimento entre 12 e 18 horas ($A_{600} = 1,0$) enquanto culturas de *Agrobacterium* spp. necessitarão de 20 a 48 horas (A_{600} entre 0,5 e 1,0).

Durante o crescimento da cultura de *Agrobacterium* em meio líquido, pode ocorrer a formação de agregados de células em forma de roseta ou de estrela (KERSTERS; DE LEY, 1984). Algumas linhagens de *Agrobacterium* spp. (como LBA4404) são mais propícias à formação desses agregados (HOOD et al., 1993). Entretanto, essa característica não parece interferir no seu crescimento ou na sua eficiência de transformação de plantas.

4. Mergulhar na suspensão bacteriana uma alça de platina previamente esterilizada (item 1) e estriar a superfície do meio de cultura contendo 0,6% (p/v) de ágar para a obtenção de colônias isoladas, como indicado na Figura 4A.
5. Etiquetar o fundo da placa com o nome da linhagem e selar a placa com filme de PVC.
6. Incubar a placa em posição invertida, durante 20 a 48 horas, em incubadora à temperatura de 37 °C para *E. coli* e entre 25 °C e 28 °C para *Agrobacterium* spp.

Após esse período, colônias isoladas poderão ser observadas (Figura 4B). Cada colônia é a progênie de uma única célula bacteriana (clone) e, por isso, é geneticamente pura.

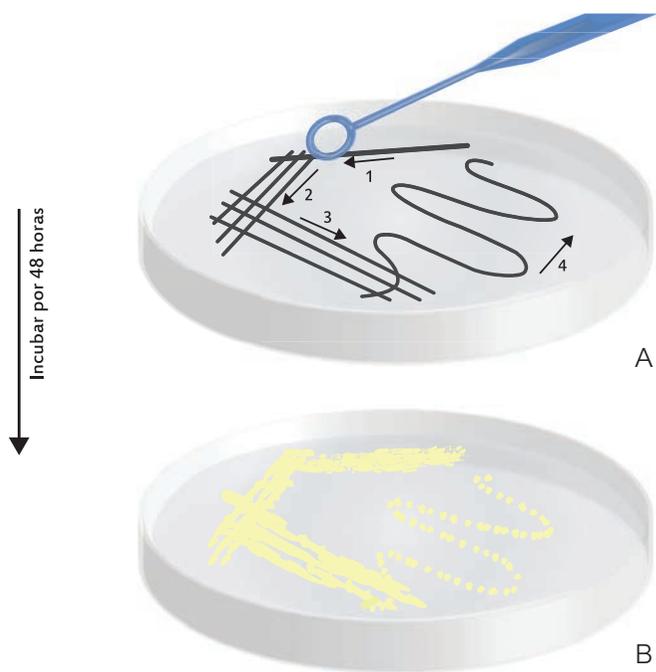


Figura 4. Estriamento de uma cultura de bactéria em placa de Petri com meio de cultura contendo 0,6% (p/v) de ágar, conhecido como “método de estrias por esgotamento”. (A) Estriar o meio com uma alça de platina contendo a cultura bacteriana, seguindo as indicações de 1 a 4. Flambar a alça somente entre a primeira e a segunda série de estrias. (B) Após o período de incubação (48 horas), colônias bem isoladas são visualizadas no local onde foram feitas as últimas estrias.

Fonte: adaptado de Brasileiro (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

2.3 Observações

Para evitar contaminações, não é aconselhável manipular bactérias na mesma capela de fluxo laminar onde se manipula material vegetal *in vitro* ou outros microrganismos. Assim, se possível, reservar uma capela do tipo vertical para manipulação exclusiva de bactérias.

De uma maneira geral, linhagens de *Agrobacterium* spp. crescem em meios de cultura contendo extrato de levedura e uma fonte de carbono adequada, como glicose, sacarose ou manitol. Linhagens pertencentes à biovar 1 crescem bem em meios ricos, comumente usados para *E. coli*, como o meio LB. Já linhagens pertencentes à biovar 2 e 3 preferem meios mais específicos, como o MYA e o YMB, nos quais linhagens da biovar 1 também podem crescer (HOOYKAAS; MOZO, 1994; LEBOWITZ; SANDERFOOT, 1991; LIN, 1994).

Linhagens de *E. coli* (Tabela 1) e de *Agrobacterium* spp. (Capítulo 3) geneticamente modificadas possuem marcadores de seleção específicos, geralmente resistência a antibióticos, que podem estar no cromossomo e/ou em elementos extracromossomais (plasmídios). Nesse caso, a pressão de seleção exercida pelo marcador deverá ser mantida durante o cultivo e a conservação dessas culturas, como precaução adicional contra contaminações com outras bactérias, mutações ou perdas de plasmídios.

Linhagens de *Agrobacterium* spp. pertencentes à biovar 1 ou 3 crescem bem em temperaturas moderadas

entre 28 °C e 29 °C. Linhagens pertencentes à biovar 2 são mais sensíveis à temperatura e devem crescer a uma temperatura entre 25 °C e 27 °C. Temperaturas superiores a 30 °C podem induzir a perda do plasmídeo Ti na maioria das linhagens de *Agrobacterium* spp. (HAMILTON; FALL, 1971; WATSON et al., 1975).

A velocidade de crescimento de uma determinada linhagem bacteriana depende do genótipo da linhagem, do meio de cultura, da temperatura e da aeração. Depois de uma fase de latência (lag) ou de adaptação, a cultura inicia uma fase exponencial ou logarítmica de crescimento, quando a multiplicação das células ocorre com velocidade máxima, isto é, o número de células da população duplica a cada geração. Para *E. coli*, a fase exponencial pode durar de 12 a 18 horas, durante a qual o tempo de geração fica em torno de 20 minutos (HOLT et al., 1994). Para *Agrobacterium* spp., a fase exponencial pode durar de 4 a 8 horas, durante a qual o tempo de geração varia de 70 a 90 minutos (LIPPINCOTT et al., 1981). Em seguida, a cultura entra em uma fase estacionária ou platô, quando a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular. Finalmente, a cultura entra na fase de declínio, que corresponde à morte celular.

O crescimento de uma cultura pode ser monitorado pela leitura da absorbância (A) em um espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 560 nm a 660 nm, em intervalos de tempo constantes. Portanto, pode-se considerar que, para *E. coli*, $A_{600} = 1,0$ equivale a 3×10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL,

enquanto para *Agrobacterium* spp., $A_{600} = 1,0$ equivale a 5×10^8 UFC/mL (HOLT et al., 1994; LIN et al., 1994). Entretanto, para saber a relação exata de cada linhagem, é necessário fazer, para cada uma delas, uma curva de crescimento que correlacione a absorbância da suspensão com o número de células viáveis, que é estimado pela contagem de UFC após diluições seriadas.

Culturas em meio contendo 0,6% de ágar (p/v) podem ser conservadas a curto prazo (até 2 meses), se mantidas no escuro e em geladeira a 4 °C. Deve-se conservar as placas em posição invertida, para evitar que a água da condensação nas tampas escorra sobre as colônias.

3 Conservação de culturas a médio prazo (método *stab*)

3.1 Material

- Mesmos materiais que o do item 2.1.
- Tubos de criopreservação de 2 mL, com tampa de rosca, esterilizados.

3.2 Procedimento

1. Preparar um tubo de criopreservação contendo 1,8 mL de meio de cultura contendo 0,6% (p/v) de ágar.

2. Transferir para o tubo, com auxílio de uma alça de platina esterilizada, uma colônia isolada de bactéria recém-crescida em meio contendo 0,6% (p/v) de ágar. Introduzir a alça de platina no meio de cultura até o fundo do tubo.
3. Incubar os tubos à temperatura de 37 °C para *E. coli* e entre 25 °C e 28 °C para *Agrobacterium spp.*, e aguardar o crescimento da cultura por 20 a 48 horas. Durante esse período, manter a tampa do tubo apenas levemente apertada.
4. Fechar completamente a tampa, etiquetar os tubos com os nomes das linhagens e selar com filme de PVC, para prevenir o ressecamento do meio.
5. Conservar os tubos no escuro, à temperatura ambiente, ou em geladeira a 4 °C. Utilizando-se esse método, conhecido como *stab* (“perfurar”), as culturas podem ser mantidas por um período de até 2 anos, sem perda de viabilidade.

3.3 Observação

A vantagem de conservar linhagens de bactérias em *stab* está na simplicidade do método. Se forem depositadas profundamente no meio de cultura, as bactérias tornam-se anaeróbicas, bloqueando qualquer atividade metabólica que não seja essencial para a sua sobrevivência naquelas condições.

4 Conservação de culturas a longo prazo (congelamento a -80 °C)

4.1 Material

- Mesmos materiais que o do item 3.1.
- Agitador de tubos.
- Nitrogênio líquido.
- Solução de glicerol 40% (v/v), esterilizado por autoclavagem a 120 °C, durante 20 minutos.

4.2 Procedimento

1. Cultivar as bactérias em meio líquido até atingir a fase exponencial de crescimento, como descrito no item 2.2 Procedimento.
2. Transferir 750 µL dessa suspensão bacteriana para um tubo de criopreservação, contendo 750 µL de glicerol 40% estéril. Fechar o tubo e homogeneizar suspensão e glicerol em um agitador de tubos, obtendo, assim, uma concentração final de glicerol 20% (v/v).

O dimetil sulfoxido (DMSO) também pode ser usado como crioprotetor para substituir o glicerol. Nesse caso, a concentração final de DMSO deve ser de 5% (v/v), obtida pela homogeneização de 750 µL da suspensão bacteriana com 750 µL de uma solução de DMSO 10% (v/v).

3. Etiquetar o tubo com o nome da linhagem e selar com filme de PVC. Congelar a mistura rapidamente, mergulhando, com auxílio de uma pinça, o tubo diretamente no nitrogênio líquido durante alguns segundos.

De preferência, deve-se usar o congelamento rápido em nitrogênio, pois ele diminui a formação de cristais de gelo e aumenta a viabilidade das células. Entretanto, quando não houver disponibilidade de nitrogênio líquido, os tubos podem ser diretamente congelados em um congelador a -80 °C.

4. Transferir imediatamente o tubo congelado para um congelador a -80 °C. Nessas condições, a cultura se manterá viável por até 10 anos.
5. Para recuperar uma cultura mantida a -80 °C, basta raspar com uma alça de platina a superfície da cultura ainda congelada e inocular em 5 mL de meio de cultura líquido. Proceder ao cultivo das bactérias em meio líquido, como descrito no item 2.2. Durante toda a manipulação, a cultura deve permanecer congelada, mantendo o tubo em gelo seco ou em nitrogênio líquido. Terminada a transferência, levar imediatamente a cultura para o congelador a -80 °C, evitando perda de viabilidade.

4.3 Observações

Culturas de *E. coli* ou *Agrobacterium* spp. também podem ser conservadas em vapor de nitrogênio (-156 °C) ou na fase líquida do nitrogênio (-196 °C). Nesses casos, o procedimento de preparação das culturas é igual ao descrito para o congelamento a -80 °C.

Outro método muito utilizado de conservação a longo prazo de linhagens de bactérias é baseado na liofilização das células. Para mais detalhes, consultar Asma (1995) e Clement (1961).

Para prevenir a perda da coleção de linhagens por um problema de queda de tensão do congelador a -80 °C, conservar uma segunda cópia da coleção (*backup*) em outro congelador.

Além da conservação das culturas, é importante manter uma coleção dos vetores, contendo as construções finais (vetores para transformação direta e vetores binários) que serão utilizados para transformação de plantas, assim como os vetores utilizados para sua obtenção (vetores intermediários de clonagem). Essa coleção de vetores é obtida pelo isolamento de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* ou *Agrobacterium* (Capítulos 2 e 3) e sua conservação em solução TE (Apêndice 4) a -20 °C. Nessas condições, o DNA plasmidial pode ser conservado a longo prazo e, quando necessário, reintroduzido em linhagens de *E. coli* ou *Agrobacterium* spp. por diferentes metodologias de transformação (Capítulos 2 e 3).

É muito importante que a manutenção da virulência das linhagens selvagens de *Agrobacterium* armazenadas durante longos períodos seja monitorada. Para tanto, testes de virulência podem ser realizados periodicamente com essas linhagens, principalmente com aquelas que não possuem marcadores de seleção. Watson et al. (1975) demonstraram que a frequência de perda do plasmídeo Ti, em condições normais de crescimento, está em torno

de 10^{-4} . Por isso, cada uma das linhagens selvagens e patogênicas da coleção deve ser inoculada, no mínimo, periodicamente, em plantas conhecidamente susceptíveis à *Agrobacterium* spp., como fumo, kalanchoe (Figura 2), cenoura etc., (BRASILEIRO; LACORTE, 1998) observando-se o aparecimento de sintomas.

Linhagens de *E. coli* (Tabela 1) e de *Agrobacterium* spp. (Capítulo 3) geneticamente modificadas são consideradas organismos geneticamente modificados (OGMs) pertencentes ao Grupo I de classificação de risco conforme estabelecido no Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005, que regulamenta a Lei Nacional de Biossegurança (Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005). Dessa forma, as medidas apropriadas de contenção e descarte das linhagens, e do material que tiver contato com essas linhagens, devem ser seguidas de acordo com as normas da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Entre outras medidas, a manipulação das linhagens nas atividades de pesquisa deve ser feita em regime de contenção, e as culturas propriamente ditas, ou qualquer outro material contaminado, devem ser esterilizados por autoclavagem antes do descarte.

5 Referências

ASMA, F. M. van. Growth and storage of *Agrobacterium*. In: GARTLAND, K. M. A.; DAVEY, M. R. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 1-7.

BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as agrobactérias. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 32, p. 15-27, 2004.

BERIAM, L. O. S.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; ROBBES, C. F. Considerações sobre o gênero *Agrobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 51-74, 1996.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, Washington, DC, v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, Sept. 1997.

BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 65-74.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 75-92.

BRASILEIRO, A.; ARAGÃO, F. O sistema *Agrobacterium*: do solo para o laboratório. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 275-303.

BULGAKOV, V. P.; KISELEV, K. V.; YAKOVLEV, K. V.; ZHURAVLEV, Y. N.; GONTCHAROV, A. A.; ODINTSOVA, N. A. *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 4, p. 454-461, 2006.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 1102-1107, 2012.

CLEENE, M. de; LEY, J. de. The host range of crown gall. **Botanical Review**, Bronx, v. 42, p. 389-464, 1976.

CLEMENT, M. T. Effects of freezing, freeze-drying, and storage in the freeze-dried and frozen state on viability of *Escherichia coli* cells. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 7, n. 1, p. 99-106, 1961.

DIETZ, A.; CHURCHILL, B. W. Culture preservation and stability. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 37-49.

E. COLI GENOTYPES. **OpenWetWare**, 21 July 2014. Disponível em: <http://openwetware.org/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=802989>. Acesso em: 13 ago. 2014.

- ELSAS, J. D. V.; SEMENOV, A. V.; COSTA, R.; TREVORS, J. T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **ISME Journal**, London, v. 5, n. 2, p. 173-183, 2011.
- FARRAND, S. K.; BERKUM, P. B. van; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 5, p. 1681-1687, Sept. 2003.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium* in the genomics age. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 4, p. 1665-1676, Aug. 2009.
- GHERNA, R. L. Preservation. In: GERHARDT, P.; COSTILOW, R. N. (Ed.). **Manual of methods for general bacteriology**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1981. p. 208-217.
- GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. O gênero *Agrobacterium* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, n. 3/4, p. 197-203, 1998.
- HAMILTON, R. H.; FALL, M. Z. The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. **Experientia**, Alexandria, v. 27, p. 229-230, 1971.
- HOLT, J.; NOEL, K.; PETER, S.; JAMES, S.; STANLEY W. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 2, p. 208-218, 1993.
- HOOYKAAS, P. J. J.; MOZO, T. *Agrobacterium* molecular genetics. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. Section B3, p. 1-9.
- KARAMI, O.; ESNA-ASHARI, M.; KURDISTANI, G. K.; AGHAVAISI, B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 53, n. 2, p. 201-212, 2009.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. Genus III: *Agrobacterium* Conn 1942. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 244-254.
- KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods**. London: Academic Press, 1991. 308 p.
- KRIMI, Z.; PETIT, A.; MOUGEL, C.; DESSAUX, Y.; NESME, X. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 7, p. 3358-3365, 2002.
- LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKEY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 29-37, 2006.
- LEBOWITZ, R. J.; SANDERFOOT, A. A. An instructional unit on the use of *Agrobacterium* for plant genetic transformation. **Biotechnology Education**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 115-121, 1991.
- LIN, J. J. A new expression medium for *Agrobacterium tumefaciens* following electroporation. **Focus**, Gaithersburg, v. 16, p. 18-19, 1994.
- LIN, J. J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Focus**, Gaithersburg, v. 16, p. 72-77, 1994.
- LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J. P. W. International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, n. 12, p. 3089-3093, Dec. 2011.
- LIPPINCOTT, J. A.; LIPPINCOTT, B. B.; STARR, M. P. The genus *Agrobacterium*. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRÜPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G. (Ed.). **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v. 1, p. 842-855.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.
- MATTHYSSE, A. The genus *Agrobacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer, 2006. v. 5, p. 91-114.
- MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7- revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 175-182, 2006.
- MORIGUCHI, K.; MAEDA, Y.; SATOU, M.; HARDAYANI, N. S.; KATAOKA, M.; TANAKA, N.; YOSHIDA, K. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 307, n. 3, p. 771-784, 2001.
- PĂCURAR, D. I.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; PĂCURAR, M. L.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI, C. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown

gall tumors to genetic transformation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 76, n. 2, p. 76-81, 2011.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Imprensa Universitária-Universidade Federal de Viçosa, 1995. 283 p.

SLATER, S. C.; GOLDMAN, B. S.; GOODNER, B.; SETUBAL, J. C.; FARRAND, S. K.; NESTER, E. W.; BURR, T. J.; BANTA, L.; DICKERMAN, A. W.; PAULSEN, I.; OTTEN, L.; SUEN, G.; WELCH, R.; ALMEIDA, N. F.; ARNOLD, F.; BURTON, O. T.; DU, Z.; EWING, A.; GODSY, E.; HEISEL, S.; HOUMIEL, K. L.; JHAVERI, J.; LU, J.; MILLER, N. M.; NORTON, S.; CHEN, Q.; PHOOLCHAROEN, W.; OHLIN, V.; ONDRUSEK, D.; PRIDE, N.; STRICKLIN, S. L.; SUN, J.; WHEELER, C.; WILSON, L.; ZHU, H.; WOOD, D. W. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 191, n. 8, p. 2501-2511, Apr. 2009.

SLATER, S.; SETUBAL, J. C.; GOODNER, B.; HOUMIEL, K.; SUN, J.; KAUL, R.; GOLDMAN, B. S.; FARRAND, S. K.; ALMEIDA, N. J.; BURR, T.; NESTER, E.; RHOADS, D. M.; KADOI, R.; OSTHEIMER, T.; PRIDE, N.; SABO, A.; HENRY, E.; TELEPAK, E.; CROMES, L.; HARKLEROAD, A.; OLIPHANT, L.; PRATT-SZEGILA, P.; WELCH, R.; WOOD, D. Reconciliation of sequence data and updated annotation of the genome of *Agrobacterium tumefaciens* C58, and distribution of a linear chromosome in the genus *Agrobacterium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 79, n. 4, p. 1414-1417, 2013.

WATSON, B.; CURRIER, T. C.; GORDON, M. P.; CHILTON, M.-D.; NESTER, E. W. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 123, p. 255-264, 1975.

WEAVER, R.; HEDRICK, P. **Genetics**. Dubuque: W.M.C. Brown, 1989.

WILLIAMS, D. C.; FRANK, R. M. van; MUTH, W. L.; BURNETT, J. P. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. **Science**, Washington, DC, v. 215, n. 4533, p. 687-689, 1982.

WISE, A. A.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 343, p. 3-14, 2006.

YOUNG, J. M.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus II: *Agrobacterium*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2005. v. 2, p. 340-345.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 1, p. 89-103, Jan. 2001.

Capítulo 2

Isolamento de vetores para transformação direta

Francisco José Lima Aragão
Elíbio Leopoldo Rech

1 Introdução

Os vetores utilizados para transformação de plantas, por meio de métodos diretos, são plasmídios bacterianos, nos quais foram clonados os genes a serem introduzidos no genoma vegetal. Esses vetores variam de tamanho (2 kb a 50 kb), entretanto, tamanhos menores (2 kb a 15 kb) são mais indicados. Diversos plasmídios poderiam ser utilizados como vetores para transformação, incluindo aqueles que foram largamente utilizados nas últimas décadas, tais como os derivados de pBR322 (BOLIVAR et al., 1977) e pACYC (SAMBROOK et al., 1989).

Entretanto, os sistemas de transformação direta utilizam quantidades relativamente altas de DNA. Assim, deve-se, absolutamente, dar preferência aos plasmídios de gerações mais recentes, que se replicam em número alto de cópias (Tabela 1). Os mais adequados são aqueles derivados da série pUC (VIEIRA; MESSING, 1982), em que os mais comumente utilizados são o pUC18 e pUC19 (GeneBank X02514). Esses vetores possuem a mesma origem de replicação pMB1 (ou ColE1). A única diferença entre os dois é a inversão da região de múltiplos sítios de clonagem. Outros plasmídios derivados de pUC são utilizados, tais como os das séries pSP (MELTON et al., 1984), pGEM e pBS. Esse último contém a origem de replicação do bacteriófago M13, inserido em orientação oposta, em um vetor derivado da série pUC. Tais plasmídios são utilizados para clonagem de genes marcadores e de genes de interesse.

Tabela 1. Número de cópias de diferentes plasmídios por célula bacteriana.

Plasmídio	Replicon	Número de cópias
pUC (série)	pMB1	500 a 700
pBS (BlueScript)	pMB1	300 a 500
pBR322 e derivados	pMB1	15 a 20
pACYC e derivados	p15A	10 a 12
pSC101 e derivados	pSC101	5
ColE1	ColE1	15 a 20

Fonte: Sambrook et al. (1989).

Tecnologias mais novas, envolvendo recombinação, permitem realizar clonagem contornando as limitações existentes nos métodos tradicionais que utilizam enzimas de restrição. Da mesma forma, pode-se usar clonagem por *Gene Splicing by Overlap Extension* (gene *SOEing*), que permite a recombinação de sequências in vitro, usando PCR, sem necessidade de sítios para enzimas de restrição ou uso de ligase (HORTON, 1995). Entretanto, algumas estratégias de clonagem e construção de vetores foram superadas, em razão da possibilidade de realizar a síntese química de sequências de DNA e até mesmo de vetores completos. Embora haja vetores que apresentam síntese dificultada, como aqueles que possuem sequências invertidas ou repetitivas, essa metodologia é a opção preferida em muitos casos. Com o aparecimento de empresas especializadas na construção de vetores customizados, essa opção está se tornando viável, com custo cada vez menor, precisão excelente e tempo reduzido.

Uma vez identificados, os genes e suas respectivas sequências regulatórias são agrupados, formando um cassete de expressão, contendo, basicamente, o promotor seguido de uma sequência codificadora e de um sinal de poliadenilação (terminador). Esses cassetes são agrupados em um vetor adequado, ou seja, um plasmídeo bacteriano. Um vetor contém, basicamente, os genes de interesse a serem introduzidos, os genes marcadores para transformação e seleção, uma origem de replicação e um gene que confere às bactérias resistência a um antibiótico (Figura 1). Embora seja possível utilizar um processo de co-transformação (ARAGÃO et al., 1996; HADI et al., 1996), isto é, introduzir genes contidos em mais de um vetor simultaneamente, é preferível que todos os genes que se queira introduzir estejam posicionados em um único vetor. Em geral, um dos genes presentes no vetor é um gene marcador, sendo o gene *gus* (*uidA*) (JEFFERSON et al., 1987) (Capítulo 8), um dos mais utilizados em razão de sua versatilidade. Sua expressão é muito fácil de ser detectada por métodos enzimáticos, colorimétricos e fluorimétricos.

Genes para seleção das células transformadas são essenciais em alguns métodos de transformação, como eletroporação de protoplastos e alguns sistemas que utilizam o processo biobalístico. Os mais utilizados são os de resistência a antibiótico, como o gene *neo* (*nptII*) que confere resistência à canamicina, geneticina (G418) ou paramomicina, e o gene *hpt*, que confere resistência à higromicina. O gene de resistência a herbicida mais empregado é o *bar*, que codifica a enzima fosfotricina acetiltransferase (PAT), que confere resistência à fosfi-

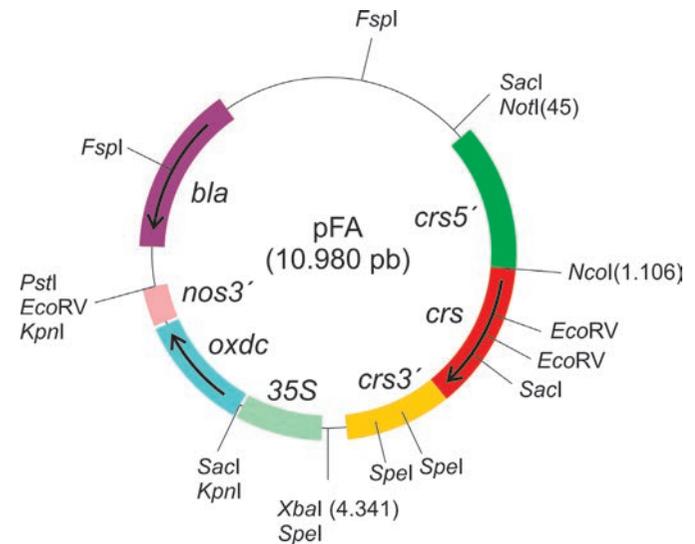


Figura 1. Mapa de restrição do plasmídeo pFA (10.980 pb), que contém os genes da proteína oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes* (*oxdc*) sob o controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (35S) e o gene *crs* que codifica a enzima acetolactase sintase (ALS) mutada e confere resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas. Esses genes foram clonados no vetor pBlueScript que contém ainda como marcador o gene que confere resistência bacteriana ao antibiótico ampicilina (*bla*). A seta indica o sentido da transcrição dos genes. O pFA foi construído por Francisco José Lima Aragão e Elsa O. P. Lago Nogueira (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

notricina (PPT) (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002). Para gerar produtos comerciais, é comum a utilização de vetores linearizados, nos quais os genes que conferem tolerância a antibióticos foram total ou parcialmente removidos.

Esses vetores são digeridos com enzimas de restrição para que esses genes não estejam funcionais nas plantas transgênicas geradas (BONFIM et al., 2007).

Atualmente, existem várias ferramentas para manipulação genética direta do genoma de plantas. Uma dessas tecnologias é chamada de EXZACT™. É baseada no uso de zinc-finger nucleases (ZFNs). Essas ZFNs são concebidas para ter uma fusão de regiões específicas de reconhecimento no DNA genômico, domínio de reconhecimento de DNA (*DNA recognition domain*, DRD) e um domínio de nuclease (*nuclease domain*, ND). O DRD pode ser criado para se ligar com alta especificidade a novas sequências de DNA. O ND é utilizado para induzir uma quebra no DNA de células vegetais, o que induz o mecanismo natural de reparação do genoma. Nesse processo, o DNA inserido, que contém sequências homólogas ao sítio de clivagem, é usado como molde, possibilitando a criação de inserções de forma dirigida e altamente precisa. As novas moléculas podem conter transgenes, alterar genes nativos, ou uma combinação de sequências que serão inseridas no genoma alvo, gerando modificações específicas. Dessa forma, podem-se fazer mutações com alterações em sequências regulatórias ou codificantes, com modificações nos padrões de expressão, geração de novas proteínas ou silenciamento gênico (PORTEUS, 2009; SHUKLA et al., 2009). Novas versões dessa tecnologia, como a de *context-dependent assembly* (CoDA) foram geradas, sendo usadas para modificar vários genes em *Arabidopsis thaliana* e soja (SANDER et al., 2011, 2012). Essa estratégia vem sendo aprimorada, convertendo-se

em uma tecnologia de difícil aplicação, inicialmente explorada no ano 2000 em uma ferramenta realmente útil para modificação genética de plantas (ISALAN, 2012).

Outra estratégia para fazer engenharia de genomas emprega o uso de *Transcription Activator-Like Effectors* (TALENs). TALENs foram descobertos recentemente como uma classe de proteínas que se ligam ao DNA (*DNA-binding proteins*), encontradas em *Xanthomonas* sp. (MOSCOU; BOGDANOVE, 2009; ZHANG et al., 2014). Os domínios de reconhecimento em TALENs consistem em módulos de 34 aminoácidos repetidos e concatenados que podem ser rearranjados de acordo com o DNA-alvo. TALENs “fabricadas” podem ser usadas para uma gama de aplicações envolvendo engenharia de genomas, incluindo modulações transcricionais e edição do genoma (SANJANA et al., 2012). Outras endonucleases foram propostas para modificação de genomas de bactérias e animais, e, eventualmente, poderão ser usadas em plantas, como a Cas9, que pode ser redirecionada para diferentes sítios alvos, simplesmente modificando a sequência de um único RNA sintético guia (sgRNA) complexado com a enzima. Essa tecnologia já foi validada com plasmídios *in vitro* e foi empregada recentemente para modificação de genomas (MUSSOLINO; CATHOMEN, 2013).

Com relação aos promotores, o 35S do *Cauliflower mosaic virus* (35SCaMV) é amplamente empregado. Algumas vezes, este promotor é duplicado e, além disso, uma sequência *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV) também pode ser acrescentada (DATLA et al.,

1993), levando a uma expressão forte e constitutiva em dicotiledôneas, e, apesar de algumas limitações, em monocotiledôneas (CHRISTENSEN et al., 1992). Embora o promotor 35SCaMV promova níveis altos de expressão em milho, trigo e arroz (SOUTHGATE et al., 1995), em monocotiledôneas preferem-se promotores mais específicos como os do álcool desidrogenase do milho (*Adh1*), actina do arroz (*Act1*) e ubiquitina do milho (*Ubi1*) (SOUTHGATE et al., 1995; TAYLOR; VASIL, 1991).

Vários vetores para silenciamento gênico (siRNA) em plantas foram gerados (Figura 2). Alguns deles são comerciais (KARIMI et al., 2007), enquanto outros podem ser construídos com métodos convencionais (WESLEY et al., 2001). A utilização de vetores e estratégias comerciais de clonagem é muito útil quando o objetivo é o silenciamento de uma grande quantidade de genes. No entanto, quando se quer silenciar alguns poucos genes e fazer algumas poucas construções para isso, vetores próprios são mais interessantes por razões de propriedade intelectual – para uma revisão sobre propriedade intelectual da utilização das estratégias de siRNA, ver Chi-Ham et al. (2010). Esses vetores são muito eficientes para silenciar genes endógenos, bem como aqueles de patógenos intracelulares, ou mesmo para gerar silenciamento *in trans* em organismos que interagem com a célula vegetal (BONFIM et al., 2007; NUNES et al., 2006; TINOCO et al., 2010). Em geral, o tamanho dos fragmentos gênicos utilizados nessas construções está entre 180 pb e 500 pb. Com esses vetores, é possível silenciar vários genes simultaneamente e até obter plantas resistentes a até quatro

espécies de vírus (BUCHER et al., 2006). Mais recentemente, tem-se observado que sequências longas podem levar ao silenciamento inespecífico (efeito *off-target*). Embora isso ainda não seja uma preocupação generalizada, uma vez que muitas plantas com silenciamento específico foram geradas sem que se observassem fenótipos indesejáveis, outras estratégias são usadas. Uma delas se baseia no uso de sequências específicas pequenas (21 pb). Em arroz, usa-se o vetor pNW55 que contém o precursor de um microRNA natural (osa-MIR528 de arroz), no qual pode-se colocar a sequência de um microRNA artificial (desenhado para o gene de interesse a ser silenciado) mediante uma série de PCR (WARTHMAN et al., 2008). Estratégias como essa podem ser muito úteis para silenciar genes endógenos de plantas cujo genoma seja bem conhecido. No entanto, para o silenciamento de genes de patógenos (vírus, fungos, nematoides), quer *in cis*, quer *in trans*, a especificidade gera o inconveniente de dificultar a obtenção de resistência ampla e duradoura.

Vetores virais também são usados para realizar silenciamento em plantas de diferentes espécies, sem a necessidade de gerar plantas transgênicas estáveis, em uma estratégia chamada de *virus-induced gene silencing* (VIGS, Capítulo 7).

Existem diferentes métodos para o isolamento de plasmídios bacterianos. Todos esses métodos seguem três etapas básicas: a) crescimento da bactéria e amplificação do plasmídio; b) concentração e lise das células bacterianas; c) purificação do plasmídio. O DNA utilizado

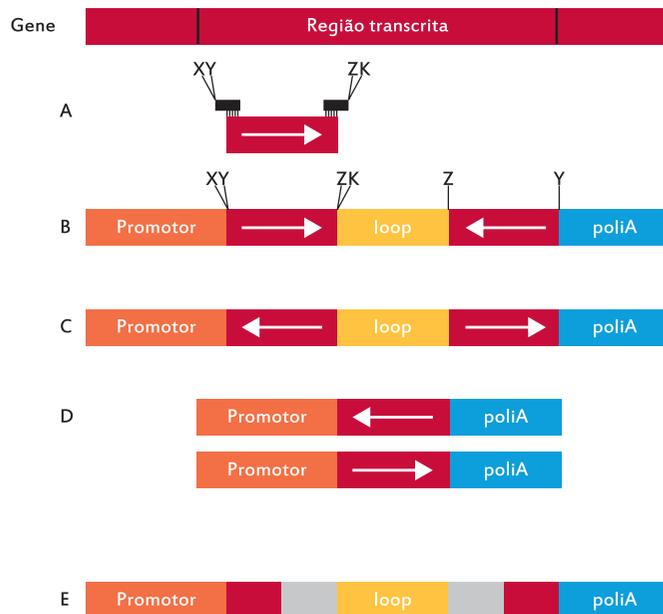


Figura 2. Vetores para silenciamento gênico são, em geral, construídos para que se forme uma estrutura de grampo (*loop*) após a transcrição (RNA de dupla fita ou dsRNA). Nesta figura, uma sequência da região transcrita de um gene é amplificada, por exemplo, com iniciadores (*primers*) com extensão contendo sítios para enzimas de restrição hipotéticas (X e Y; Z e K). A sequência amplificada (A) é então clonada no vetor na orientação direta (→) e reversa (←), utilizando-se inicialmente as enzimas Y e Z e posteriormente as enzimas X e K (B e C). Também é possível utilizar-se da estratégia de ter dois cassetes de expressão com o fragmento gênico clonado em orientação direta e reversa (D). Existem distintos tipos de construções que permitem silenciar vários genes simultaneamente. Para o silenciamento de genes virais demonstrou-se que construções com pequenos *loops* (E) são mais eficientes do que com um *loop* grande de sequências invertidas.

Fonte: Zhang et al. (2011).

nos processos de transformação direta deve ter um alto grau de pureza. No processo biobalístico, por exemplo, a contaminação com proteínas pode levar a uma aglomeração das micropartículas (Capítulo 5), acarretando menor eficiência de transformação (SANFORD et al., 1993). Na transformação de células vegetais por eletroporação, a pureza do DNA é igualmente importante, principalmente tratando-se de análises quantitativas de expressão de genes (CARNEIRO et al., 1993; SÁ et al., 1994).

O método de isolamento de DNA plasmidial por lise alcalina, empregado com sucesso para o isolamento de diferentes plasmídios em linhagens de bactérias, é baseado no método inicialmente descrito por Birnboim e Doly (1979). Esse método requer que o DNA plasmidial seja separado do DNA cromossomal bacteriano, bem como de outras macromoléculas. Em geral, o isolamento de plasmídios menores tem melhor rendimento, pois quanto maior o plasmídio, mais suas propriedades aproximam-se das do DNA cromossomal bacteriano, tornando mais difícil seu isolamento. A lise alcalina explora a natureza circular dos plasmídios e o alto peso molecular do DNA cromossomal. Quando o extrato celular é exposto a um pH alcalino (cerca de 12), o DNA linear (cromossomal) é desnaturado, enquanto o DNA circular (plasmidial) permanece intacto. Em seguida, o extrato é neutralizado com adição de acetato de sódio, que, em presença de alta concentração salina, faz com que o DNA cromossomal precipite, juntamente com as proteínas que tenham antes se complexado com um detergente aniônico, como o SDS. O DNA então é precipitado com álcool em presença de sal.

Embora existam kits comerciais de várias marcas e estratégias para isolamento de plasmídios, neste capítulo apresenta-se um método simples e de alto rendimento que é utilizado com sucesso para isolamento de plasmídios que são, em seguida, usados para transformação de plantas pelo processo de eletroporação de protoplastos e biobalística (ARAGÃO et al., 1996, 2000; RECH et al., 2008; ZHANG et al., 1988) (Capítulos 4 e 5).

2 Preparação de células competentes de *Escherichia coli* e transformação por choque térmico

2.1 Material

- Alça de platina.
- CaCl_2 0,1 M: dissolver 1,47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou 1,11 g de CaCl_2 anidro em 90 mL de água destilada. Completar o volume até 100 mL. Esterilizar por autoclavagem.
- DNA plasmidial.
- Espectrofotômetro.
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital.
- Incubadora com controle de temperatura (37 °C).

- Linhagem de *E. coli* (por exemplo, DH1, DH5- α ou XL1, descritas no Capítulo 1).
- Meio de crescimento de bactérias LB e SOC (Apêndice 1).
- Placas de Petri com meio LB semissólido, contendo o antibiótico seletivo adequado (Apêndice 3).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Termobloco ou banho-maria com regulação de temperatura para 37 °C e 42 °C.
- Minicentrífuga.

2.2 Procedimento

Preparação das células

1. Com auxílio de uma alça de platina, estriar uma suspensão bacteriana de *E. coli* em uma placa contendo meio LB semissólido. Incubar durante 16 horas, a 37 °C.
2. Transferir duas a quatro colônias para 5 mL de meio LB líquido. Agitar suavemente para dispersar as colônias no meio de cultura e incubar durante 16 horas, a 37 °C, sob agitação (300 rpm).

As colônias de *E. coli* devem ter de 1 mm a 2 mm de diâmetro. Os 5 mL de meio LB devem estar em um frasco de 10 mL a 15 mL de capacidade.

3. Transferir 1 mL da suspensão bacteriana para 50 mL de meio LB. Incubar a 37 °C durante 3 horas, sob agitação (300 rpm). Após esse período, determinar a absor-

bância da suspensão bacteriana em um espectrofotômetro. O número de células não deve ultrapassar 10^8 células/mL (A_{600} entre 0,3 e 0,4).

Os 50 mL de meio LB devem estar em um frasco de 200 mL de capacidade. O tempo deve ser o mais exato possível, podendo exceder no máximo em meia hora.

Nas etapas seguintes, as células devem permanecer no gelo e as centrifugações devem ser feitas a 4 °C.

4. Centrifugar durante 5 minutos, a 3.000 *g*, a 4 °C. Descartar o sobrenadante e inverter o tubo durante 20 segundos para eliminar traços de meio.

Todas as etapas seguintes devem ser conduzidas em condições assépticas.

5. Lavar cuidadosamente as células com 12 mL a 15 mL da solução de CaCl_2 0,1 M.
6. Centrifugar durante 5 minutos, a 3.000 *g*, a 4 °C. Ressuspender, cuidadosamente, as células em 2 mL da solução de CaCl_2 0,1 M, previamente resfriada.
7. Usar em seguida para transformação por tratamento com choque térmico.

Alternativamente podem-se distribuir alíquotas de 250 μL por microtubos esterilizados e previamente esfriados e congelar imediatamente a -70 °C.

Choque térmico

8. Transferir 100 μL da suspensão bacteriana para um tubo de microcentrifuga. Deixar durante 10 minutos no gelo. Ao usar bactérias congeladas, descongelar uma alíquo-

ta de células competentes em gelo e colocar 100 μL em um microtubo previamente resfriado no gelo.

9. Adicionar o DNA plasmidial (cerca de 20 ng) às células, misturar cuidadosamente e incubar no gelo durante 30 minutos.

O volume de DNA não deve exceder 1/10 do volume das células e deve conter cerca de 1 ng a 20 ng de plasmídeo. Quantidades maiores de DNA podem ser empregadas; porém, podem saturar o sistema.

10. Transferir os tubos para um banho a 42 °C durante exatamente 90 segundos. Não agitar.
11. Rapidamente colocar os tubos no gelo e deixar durante 1 a 2 minutos.
12. Adicionar 800 μL de meio SOC ou LB a cada tubo e misturar suavemente. Transferir os tubos para um banho a 37 °C, durante 45 minutos.

Uma agitação suave (inversões do tubo) durante esse período pode aumentar a eficiência do processo.

13. Concentrar as células por meio de centrifugação a 14.000 rpm em minicentrífuga por 30 segundos. Eliminar 800 μL do meio, ressuspender as células e plaquear os 100 μL restantes em meio LB contendo o antibiótico apropriado.

Como controle da eficiência do antibiótico, devem-se também plaquear células que tenham passado pelo mesmo processo de transformação, porém, sem o plasmídeo.

14. Incubar as placas invertidas a 37 °C. Observar as colônias após 12 a 16 horas.

2.3 Observação

Células competentes de diferentes linhagens de *E. coli* estão disponíveis no mercado e podem ser adquiridas em diferentes empresas.

3 Preparação de células competentes de *Escherichia coli* e transformação por eletroporação

3.1 Material

- Alça de platina.
- Cubetas de eletroporação.
- DNA plasmidial.
- Eletroporador.
- Espectrofotômetro.
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital.
- Glicerol 10% (v/v): misturar 10 mL de glicerol puro a 90 mL de água destilada e autoclavar.
- Linhagem de *E. coli* (por exemplo, DH1, DH5- α ou XL1, de acordo com o Capítulo 1).

- Meio de crescimento de bactérias LB e SOC (Apêndice 1).
- Nitrogênio líquido.
- Placas com meio LB sólido, contendo o antibiótico adequado (Apêndice 3).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

3.2 Procedimento

Preparação das células

1. Crescer a linhagem bacteriana em meio líquido conforme descrito nas etapas 1 e 2 do item 2.2 Procedimento.
2. Transferir 1 mL da suspensão bacteriana para 500 mL de meio LB.
3. Crescer as células a 37 °C, sob agitação vigorosa (300 rpm). Monitorar a cultura a cada 30 minutos, por meio da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro, até atingir o ponto ideal (A_{600} entre 0,5 e 0,8).

No caso da linhagem XL1, o ideal está próximo a $A_{600} = 0,5$.

4. Colocar o frasco contendo a cultura no gelo durante 15 a 30 minutos.
5. Centrifugar a 3.000 *g* durante 15 minutos, a 4 °C.

Todas as etapas seguintes devem ser conduzidas em condições assépticas e no gelo.

6. Remover o sobrenadante. Ressuspender delicadamente as células em 500 mL de água estéril a 4 °C.

A maior quantidade possível do sobrenadante (meio de cultura) deve ser eliminada, mesmo que se sacrifique uma parte do sedimento.

Durante a ressuspensão, deve-se ter cuidado para não romper as células.

7. Centrifugar como na etapa 5 deste item.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender delicadamente o sedimento em 250 mL de água estéril a 4 °C.
9. Centrifugar como na etapa 5 deste item.
10. Descartar o sobrenadante e ressuspender delicadamente o sedimento em 10 mL de glicerol 10% a 4 °C. Centrifugar como na etapa 5 deste item.
11. Ressuspender delicadamente o sedimento bacteriano em um volume final de 2 mL de glicerol 10% a 4 °C.
12. Distribuir em alíquotas de 40 µL em tubos de microcentrífuga, transferir os tubos para o nitrogênio líquido e manter a -70 °C, até que as células sejam usadas na transformação por eletroporação.

Em tais condições de armazenamento, as células podem ser guardadas por, pelo menos, 6 meses.

Eletroporação

13. Para a eletroporação, adicionar 1 µL a 2 µL de DNA (1 ng a 10 ng) a 40 µL do estoque de células competentes de *E. coli* (etapa 12 deste item). Misturar delicadamente e deixar no gelo durante aproximadamente 1 minuto.

O DNA deve estar dissolvido em água estéril destilada ou em baixa concentração salina (por exemplo, TE 0,1X).

14. Colocar a mistura em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo.
15. Eletroporar as células com o equipamento ajustado para as seguintes condições: resistência de 200 W; capacitância de 25 µF. A voltagem deve estar ajustada conforme a distância dos eletrodos da cubeta: 2,5 kV (para cubetas com distância entre os eletrodos de 0,2 cm) ou 1,5 kV a 1,8 kV (para cubetas com distância entre os eletrodos de 0,1 cm). Aplicar um pulso.

O tempo ideal de descarga (*time constant*) pode ser lido no equipamento após a eletroporação e deve estar entre 4 ms e 5 ms para obtenção da eficiência máxima. Esse tempo é dependente dos parâmetros físicos previamente ajustados no equipamento, e da condutividade do meio de eletroporação. A condutividade do meio varia segundo a concentração de sais nele presente. Se o valor for superior a 5 ms, o experimento deve ser refeito. Se o tempo for muito inferior (< 1 ms), pode ser em razão da alta concentração de sais no meio. O DNA deve ser então diluído ou dialisado contra água (Capítulo 9).

16. Imediatamente após a eletroporação, adicionar 1 mL de meio SOC e ressuspender as células cuidadosamente. Transferir para um tubo de microcentrífuga.
17. Incubar a 37 °C, durante 1 hora.

Uma agitação suave (inversões do tubo) durante esse período pode aumentar a eficiência do processo.

18. Plaquear 100 µL em meio seletivo em várias diluições, desde 1/10 em SOC até a cultura pura.

19. Incubar as placas a 37 °C durante 12 a 16 horas e observar o aparecimento das colônias.

4 Isolamento de plasmídeo

4.1 Material

- Acetato de sódio 3 M, pH 4,8 (Apêndice 4).
- EDTA 500 mM (Apêndice 4).
- Espectrofotômetro.
- Isopropanol.
- Lisozima em pó.
- Meio de crescimento de bactérias LB (Apêndice 1).
- NaOH 2 N (Apêndice 4).
- SDS 10% (Apêndice 4).
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução I (1 L):

Componente	Quantidade	Concentração final
Glicose	9 g	50 mM
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	25 mL	25 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	20 mL	10 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Esterilizar por autoclavagem, por 20 minutos, a 121 °C.

- Solução II (1 L):

Componente	Quantidade	Concentração final
NaOH 2N	10 mL	0,2 N
SDS 10%	10 mL	1%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

A solução deve ser preparada a partir das soluções-estoque imediatamente antes do uso.

- STE (Apêndice 4).
- TE pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1 M pH 8,0 (Apêndice 4).

4.2 Procedimento

1. Colocar uma colônia de bactéria em 30 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. Incubar a 37 °C sob agitação (300 rpm) até que a suspensão bacteriana atinja o final da fase exponencial de crescimento (A_{600} de aproximadamente 0,6).
2. Retirar 15 mL da cultura, e adicionar a 500 mL de LB (em um frasco de 2 L de capacidade). Incubar durante aproximadamente 16 horas, com agitação vigorosa (300 rpm) até que a cultura atinja uma A_{600} de 0,4 a 0,5.

É importante que a absorbância (A_{600}) não seja superior a 0,5, sob pena de redução na eficiência de isolamento.
3. Coletar as células por centrifugação a 1.700 g durante 10 minutos a 4 °C. Descartar o sobrenadante.

4. Lavar as células em 100 mL de STE previamente resfriado, a 4 °C.
5. Coletar as células por centrifugação a 1.700 g durante 10 minutos, a 4 °C. Descartar o sobrenadante.
6. Ressuspender o sedimento em 10 mL da solução I, contendo 2 mg/mL de lisozima.

Em virtude de a lisozima ser instável quando em solução, ela deve ser adicionada em forma de pó, imediatamente antes do uso.

7. Deixar à temperatura ambiente, durante 15 minutos.
8. Adicionar 18 mL da solução II. Fechar o tubo de centrífuga com filme de PVC, e agitar suavemente durante 5 minutos, à temperatura ambiente. A solução deve tornar-se viscosa, indicando que houve lise das células.

A solução II deve ser preparada imediatamente antes do uso.

9. Adicionar 12 mL da solução de acetato de sódio 3 M. Fechar o tubo com filme de PVC e agitar suavemente. Deixar no gelo de 30 minutos a 1 hora.

Deve-se observar a formação de um precipitado branco, decorrente da precipitação da maior parte do DNA cromossomal e proteínas.

10. Centrifugar a 2.600 g durante 20 minutos. O sedimento deve ficar bem aderido ao fundo do tubo.
11. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 0,6 volume de isopropanol. Agitar com três

a quatro inversões do tubo e deixar à temperatura ambiente durante 15 minutos.

No caso de o sedimento não ficar completamente aderido ao tubo, deve-se filtrar o sobrenadante em gaze.

12. Centrifugar a 11.000 g durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Centrifugações feitas a 4 °C podem precipitar os sais.

13. Descartar o sobrenadante e lavar o sedimento de DNA com 70% de etanol, à temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 11.000 g durante 5 minutos.
15. Descartar o sobrenadante e secar o sedimento.

Pode-se secar o sedimento com ar, com o tubo virado sobre um papel-toalha, ou pode-se usar um secador com ar não aquecido.

16. Dissolver o sedimento de DNA em 4 mL de TE.

4.3 Observação

Após a etapa 2, podem-se adicionar 2,5 mL de uma solução de cloranfenicol (34 mg/mL em etanol) ao meio de cultura e incubar durante mais 12 a 16 horas, a 37 °C, com vigorosa agitação (300 rpm). A adição de cloranfenicol inibe a divisão bacteriana, reduzindo a quantidade de células e a viscosidade após a lise bacteriana, ao mesmo tempo em que aumenta a quantidade de plasmídeo por célula, o que simplifica a purificação do plasmídeo. Entretanto, com o uso de plasmídios da série pUC e pBS,

torna-se desnecessário, uma vez que aumenta o tempo de isolamento e exige o uso de mais um antibiótico.

5 Verificação do perfil de restrição do DNA plasmidial

5.1 Material

- DNA plasmidial isolado.
- Enzima de restrição e tampão apropriado 10X.
- Fonte e cuba de eletroforese.
- Gel de agarose 1% (p/v) em TBE, com brometo de etídio (Apêndice 4).



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Tampão TBE (Apêndice 4).
- Tampão de amostra para eletroforese 10X (Apêndice 4).
- Termobloco ou banho-maria com regulação de temperatura para 37 °C.
- Transiluminador (fonte ultravioleta).



A exposição à **radiação ultravioleta** pode causar danos à retina e à pele. Sua manipulação deve ser feita com óculos de proteção específicos para luz UV. Procurar não expor a pele, usando jaleco de mangas longas e luvas.

5.2 Procedimento

1. Transferir 500 ng do DNA plasmidial isolado para um tubo de microcentrífuga.
2. Adicionar 2 µL do tampão adequado para a enzima.
3. Adicionar 1 U da enzima de restrição.
4. Completar o volume até 20 µL com água destilada e incubar a 37 °C, por uma hora.
5. Adicionar 3 µL do tampão de amostra para eletroforese. Aplicar a amostra em um gel de agarose 1% em TBE 1 X. Fazer a eletroforese a 100 V.

No mesmo gel, deve ser aplicado um marcador de peso molecular, como padrão, e 500 ng de DNA plasmidial não digerido, diluído em 20 µL de água, para verificação da integridade do DNA e possíveis contaminações com RNA.

6. Observar o gel sob luz ultravioleta e verificar o perfil de restrição.

Como exemplo, o vetor pFA (Figura 1) digerido com a enzima de restrição *Xba*I e *Not*I deverá apresentar no gel duas bandas, uma de 6.684 pares de bases (pb) e outra de 4.296 pb.

5.3 Observação

Os tampões apropriados para cada tipo de enzima estão, geralmente, concentrados 10X e são fornecidos juntamente com a respectiva enzima.

6 Referências

- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 142-150, 1996.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant cell selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 14, p. 1-10, 2002.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 1-6, 2000.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.
- BOLIVAR, F.; RODRIGUES, R. L.; GREENE, P. J.; BETLACH, M. C.; HEYNEKER, H. L.; BOYER, H. W.; CROSA, J. H.; FALKOW, S. Construction and characterization of new clones vehicles: II. A multipurpose cloning system. **Gene**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 95-113, 1977.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E.; MENDES, E.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, p. 717-726, 2007.
- BUCHER, E.; LOHUIS, D.; POPPEL, P. M. J. A. van; GEERTS-DIMITRIADOU, C.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. **The Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 3697-3701, 2006.
- CARNEIRO, V. T. C.; PELLETIER, G.; SMALL, I. Transfer RNA-mediated suppression of stop codons in protoplasts and transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 681-690, 1993.
- CHI-HAM, C. L.; CLARK, K. L.; BENNETT, A. B. The intellectual property landscape for gene suppression technologies in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, p. 32-36, 2010.
- CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 675-689, 1992.
- DATLA, R. S. S.; BEKKAOUI, F.; HAMMERLINDL, J. K.; PILATE, G.; DUNSTAN, D. I.; CROSBY, W. L. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. **Plant Science**, Shannon, v. 94, n. 1/2, p. 139-149, 1993.
- HADI, M. Z.; MCMULLEN, M. D.; FINNER, J. J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 7, p. 500-505, 1996.
- HORTON, R. M. PCR-mediated recombination and mutagenesis: SOEing together tailor-made genes. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 3, n. 2, p. 93-99, 1995.
- ISALAN, M. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 32-34, 2012.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, London, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.
- KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. Recombinational cloning with plant gateway vectors. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 4, p. 1144-1154, 2007.
- MELTON, D. A.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 18, p. 7035-7056, 1984.
- MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. **Science**, Washington, DC, v. 326, n. 5959, p. 1501, 2009.
- MUSSOLINO, C.; CATHOMEN, T. RNA guides genome engineering. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 208-209, 2013.
- NUNES, A. C. S.; VIANNA, G. R.; CUNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CAPDEVILLE, G.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 125-132, 2006.
- PORTEUS, M. H. Plant biotechnology: Zinc fingers on target. **Nature**, London, v. 459, p. 337-338, 2009.
- RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.
- SÁ, M. F. G. de; WEINBERG, D. F.; RECH, E. L.; BARROS, L. M. G.; ARAGÃO, F. J. L.; HOLMSTROEM, K. O.; GANDER, E. S. Functional studies on a seed-specific promoter from a Brazil nut 2S gene. **Plant Science**, Shannon, v. 103, n. 2, p. 189-198, 1994.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- SANDER, J. D.; DAHLBORG, E. J.; GOODWIN, M. J.; CADE, L.; ZHANG, F.; CIFUENTES, D.; CURTIN, S. J.; BLACKBURN, J. S.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; QI, Y.; PIERICK, C. J.; HOFFMAN, E.; MAEDER, M. L.; KHAYTER, C.; REYON, D.; DOBBS, D.; LANGENAU, D. M.; STUPAR, R. M.; GIRALDEZ, A. J.; VOYTAS, D. F.; PETERSON, R. T.; YEH, J. J.; JOUNG, J. K. Selection-free zinc-finger nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). **Nature Methods**, New York, v. 8, n. 1, p. 67-69, 2011.
- SANDER, J. D.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K. Engineering designer nucleases with customized cleavage specificities. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Pub. Associates, 2012. DOI: 10.1002/0471142727.mb1213s96.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology**, New York, v. 217, p. 483-510, 1993.
- SANJANA, N. E.; CONG, L.; ZHOU, Y.; CUNNIFF, M. M.; FENG, G.; ZHANG, F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. **Nature Protocols**, London, v. 7, n. 1, p. 171-192, 2012.
- SHUKLA, V. K.; DOYON, Y.; MILLER, J. C.; DEKELVER, R. C.; MOEHLE, E. A.; WORDEN, S. E.; MITCHELL, J. C.; ARNOLD, N. L.; GOPALAN, S.; MENG, X.; CHOI, V. M.; ROCK, J. M.; WU, Y. Y.; KATIBAH, G. E.; ZHIFANG, G.; MCCASKILL, D.; SIMPSON, M. A.; BLAKESLEE, B.; GREENWALT, S. A.; BUTLER, H. J.; HINKLEY, S. J.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, London, v. 459, p. 437-441, 2009.
- SOUTHGATE, E. M.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; MARCHANT, R. Factors affecting the genetic engineering of plants microprojectile bombardment. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 631-651, 1995.
- TAYLOR, M. G.; VASIL, I. K. Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 3, p. 120-125, 1991.
- TINOCO, M. L. P.; DIAS, B. B. A.; DALL'ASTTA, R. C.; PAMPHILE, J. Á.; ARAGÃO, F. J. L. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**, London, v. 8, n. 27, 2010.
- VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 259-268, 1982.
- WARTHMAN, N.; CHEN, H.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; HERVÉ, P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 3, p. e1829, 2008.
- WESLEY, S.; HELLIWELL, C.; SMITH, N.; WANG, M.; ROUSE, D.; LIU, Q.; GOODING, P.; SINGH, S.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P.; ROBINSON, S.; GLEAVE, A.; GREEN, A.; WATERHOUSE, P. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 581-590, 2001.
- ZHANG, H. M.; YANG, H.; RECH, E. L.; GOLDS, T. J.; DAVIS, A. S.; MULLIGAN, B. J.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, n. 6, p. 379-384, 1988.
- ZHANG, M.; WANG, F.; LI, S.; WANG, Y.; BAI, Y.; XU, X. TALE: a tale of genome editing. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 25-32, 2014.
- ZHANG, X.; SATO, S.; YE, X.; DORRANCE, A. E.; MORRIS, T. J.; CLEMENTE, T. E.; QU, F. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 11, p. 1264-1269, 2011.

Capítulo 3

Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp.

Cristiano Lacorte
Eduardo Romano

1 Introdução

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria capaz de infectar células vegetais, causando a doença conhecida como galha-da-coroa (*crown gall*), que é caracterizada pelo desenvolvimento de um tumor no local da infecção. A patogenicidade de *A. tumefaciens* está associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (> 200 kb), denominado Ti (*Tumour inducing*). Durante o processo de infecção, uma sequência específica desse plasmídeo, o T-DNA, é transferida para a célula vegetal (Capítulo 1). A expressão, na célula vegetal, de genes presentes no T-DNA, chamados oncogenes, interfere na biossíntese de fito-hormônios. Em células infectadas por *A. tumefaciens*, a expressão dos oncogenes leva à formação da galha-da-coroa e em *A. rhizogenes* ao desenvolvimento de raízes-em-cabeleira (*hairy root*) (OTTEN et al., 2008).

As únicas regiões do T-DNA essenciais para sua transferência são as sequências de cerca de 25 pb localizadas nas extremidades do T-DNA, conhecidas como extremidades direita e esquerda. Além das extremidades do T-DNA, a região *vir* do plasmídeo Ti também é essencial para a transferência. A região *vir* contém genes cujos produtos vão promover a transferência do T-DNA (DAFNYYELIN et al., 2008; GELVIN, 2010; TZFIRA et al., 2004).

A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium* sp. para ser utilizada como vetor de transformação de plantas inclui três etapas distintas: a) obtenção de uma linhagem “desarmada”, isto é, uma linhagem na qual o

T-DNA original, com os oncogenes, é deletado para evitar alterações na biossíntese de fito-hormônios; b) obtenção de vetores contendo os genes de interesse entre as extremidades do T-DNA; c) transferência dos vetores obtidos para a linhagem desarmada a ser utilizada.

A deleção do T-DNA original para a obtenção de uma linhagem desarmada é realizada por meio de dupla recombinação (Figura 1), um processo trabalhoso e demorado. Entretanto, existem disponíveis, comercialmente ou em coleções de institutos de pesquisa e universidades, algumas linhagens desarmadas obtidas a partir de cepas selvagens de *Agrobacterium* spp. de diferentes origens. A escolha da linhagem deve levar em conta tanto a susceptibilidade do genótipo da planta, como a virulência da linhagem de *Agrobacterium* sp. Também é fundamental observar a resistência a antibióticos própria de cada linhagem, para que seja diferente da resistência do vetor de transformação utilizado. Uma relação das principais linhagens desarmadas utilizadas para transformação de plantas e algumas de suas características é apresentada na Tabela 1.

A preparação de um vetor para a transformação de plantas implica a clonagem dos genes de interesse entre as extremidades do T-DNA. Entretanto, em razão de seu tamanho (> 200 kb), o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Dessa forma, são utilizados plasmídios menores (vetores), do tipo binário ou cointegrado, que contêm as extremidades do T-DNA, entre as quais os genes de interesse são clonados (Figura 2) (BEVAN, 1984; HELLENS et al., 2000b; HOOD et al., 1993; ZAMBRYSKI

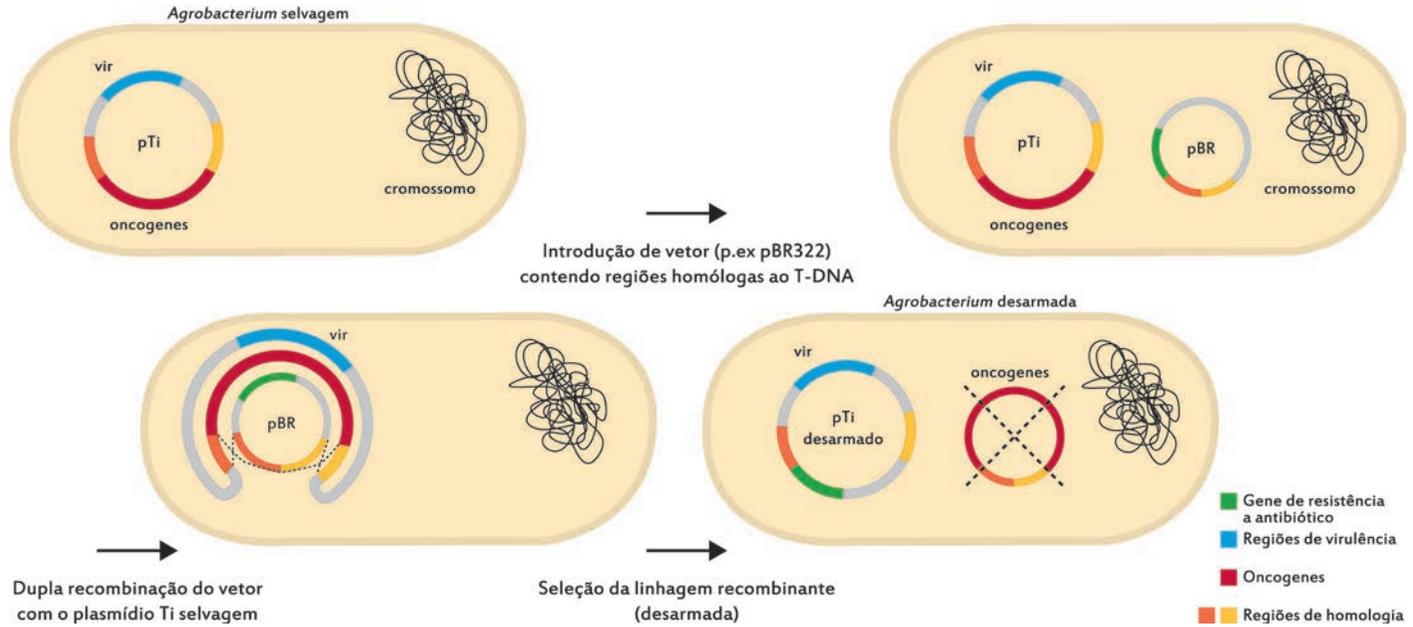


Figura 1. Obtenção de um plasmídeo Ti desarmado. Um vetor contendo regiões homólogas ao T-DNA, por exemplo, o pBR322, é introduzido em uma linhagem selvagem de *Agrobacterium* sp. Por meio de uma dupla recombinação, o vetor introduzido se integra ao plasmídeo Ti selvagem, causando a deleção dos oncogenes contidos entre as regiões homólogas. O vetor introduzido não se replica em *Agrobacterium* spp. e apenas os recombinantes são selecionados pela resistência ao antibiótico.

Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

et al., 1983). Em princípio, a eficiência de transferência do T-DNA para as células vegetais é a mesma com dois tipos de plasmídios. No entanto, o sistema de vetores binários é mais utilizado, já que a obtenção das linhagens recombinantes de *Agrobacterium* spp. é mais simples e mais eficiente do que para os vetores cointegrados. Além disso, os vetores binários podem ser utilizados em

qualquer linhagem de *Agrobacterium* spp., desarmada ou selvagem (HELLENS et al., 2000b; KOMORI et al., 2007).

Os vetores cointegrados são originados de vetores intermediários, que geralmente possuem origem de replicação do tipo ColE1, e não se replicam em *Agrobacterium* spp. Uma vez introduzidos na linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., os vetores intermediários integram-se

Tabela 1. Linhagens desarmadas de *Agrobacterium* spp.

Linhagem	pTi/pRi desarmado	Agente seletivo ⁽¹⁾	Linhagem selvagem original	pTi/pRi original	Cromossoma ⁽²⁾	Referências
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>						
A136 ⁽³⁾	-	-	C58C1	-	C58	Watson et al. (1975)
GV3850 ⁽⁴⁾	pGV3850	Ap	C58	pTiC58	C58	Zambryski et al. (1983)
GV2260 ⁽⁴⁾	pGV2260	Cb	C58	pTiB6S3	C58	Deblaere et al. (1985)
GV3101 ⁽⁴⁾	pPM6001	Ap	C58	pTiC58	C58	Tinland et al. (1990)
GV3111 ⁽⁴⁾	pTiB6-SE	Kn	C58	pTiB6S3	C58	Fraley et al. (1985)
C58Z707 ⁽⁴⁾	pTIC58Z707	Kn	C58	pTiC58	C58	Hepburn et al. (1985)
A208-SE ⁽⁴⁾	pTiT37-SE	Kn	A208	pTiT37	C58	Hinchee et al. (1988)
LBA4404	pAL4404	Sm	Ach5	pTiAch5	Ach5	Ooms et al. (1982)
GV3101	pMP90	Gt	C58	pTiC58	C58	Koncz e Schell (1986)
EHA101	pEHA101	Kn	A281	pTiBo542	C58	Hood et al. (1986)
EHA105	pEHA105	-	A281	pTiBo542	C58	Hood et al. (1993)
MOG101	pMOG101	Sp	C58	pTiB6	C58	Hood et al. (1993)
MOG301	pMOG301	Sp	C58	pTiC58	C58	Hood et al. (1993)
AGL0	pTiBo542ΔT	-	A281	pTiBo542	C58	Lazo et al. (1991)
AGL1	pTiBo542ΔT	-	A281	pTiBo542	C58 Rec ⁻	Lazo et al. (1991)
NTL4	pKPSF2	Em	Chry5	pTiChry5	C58	Palanichelvam et al. (2000)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>						
A4	pRiB278b	Kn	A4	pRiA4	A4	Vilaine e Casse-Delbart (1987)

⁽¹⁾ Resistências dos plasmídios Ti desarmados: Ap – ampicilina (50 mg/L); Cb – carbenicilina (100 mg/L); Em – eritromicina (150 mg/L); Gt – gentamicina (50 mg/L); Kn – canamicina (100 mg/L); Sm – estreptomicina (300 mg/L); Sp – espectinomomicina (50 mg/L) (Apêndice 3). ⁽²⁾ Todas as linhagens desarmadas derivadas de *A. tumefaciens* listadas apresentam resistência cromossômica à rifampicina – Rf (50 mg/L). As linhagens AGL1 e NTL4 também apresentam resistência cromossômica à carbenicilina. ⁽³⁾ Linhagem avirulenta, resistente ao ácido nalidíxico – Nal (50 mg/L). ⁽⁴⁾ Linhagens compatíveis com o sistema de vetores cointegrados.

Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

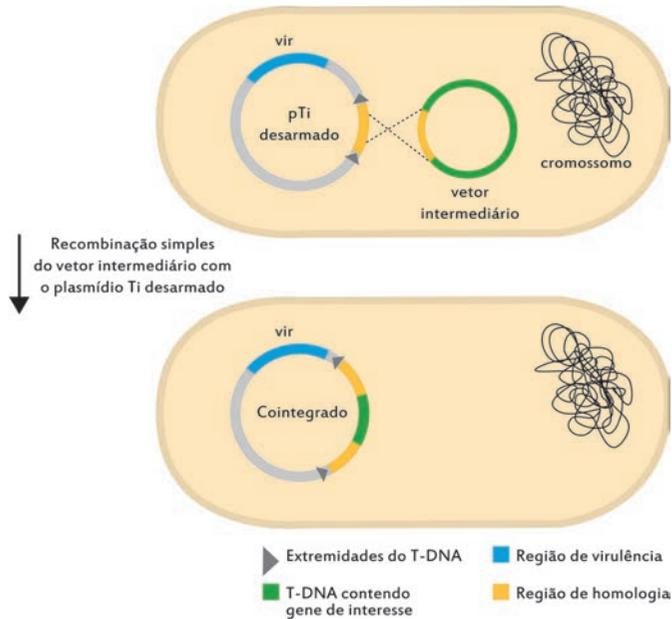


Figura 2. Sistema cointegrado para a transformação em *Agrobacterium* spp.: o vetor intermediário se integra ao plasmídeo Ti desarmado por um processo de recombinação simples. O vetor intermediário não se replica em *Agrobacterium* spp. e apenas os recombinantes (contendo o vetor cointegrado) são selecionados.

Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

ao plasmídeo Ti por recombinação simples, a partir de uma região de homologia com o T-DNA da linhagem desarmada, formando o vetor cointegrado, onde o T-DNA está *in cis* em relação aos genes *vir* do plasmídeo Ti (Figura 2).

Os vetores binários, contendo os genes de interesse clonados entre as sequências correspondentes às extremidades do T-DNA, são capazes de replicar-se

tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium* spp. (MURAI, 2013). Esses plasmídios se mantêm de forma independente do plasmídeo Ti, cujos genes *vir* vão funcionar *in trans* (Figura 3) (BEVAN, 1984; HOEKEMA et al., 1983). Além de uma origem de replicação apropriada para *E. coli* e *Agrobacterium* spp., de um gene para seleção e, geralmente, de resistência a um antibiótico (Tabela 1), os vetores binários contêm uma região de múltiplos sítios de clonagem (*polylinker*) entre as extremidades do T-DNA, para a inserção das sequências gênicas desejadas (KOMORI et al., 2007; MURAI, 2013). Também podem conter a região de transferência (*ori T*) e sítio de ativação (*mob*), para conjugação (BEVAN, 1984; HELLENS et al., 2000b). Os vetores binários que apresentam todos esses elementos são relativamente grandes (entre 10.000 pb e

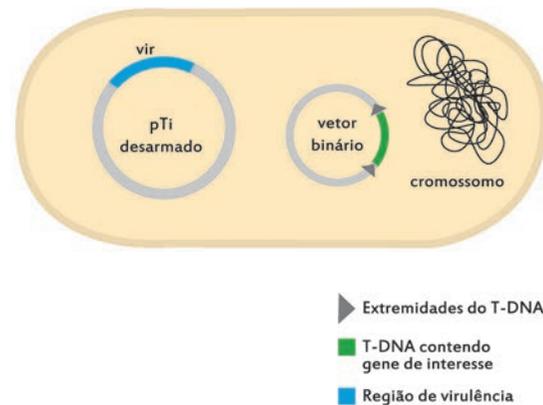


Figura 3. Sistema binário para a transformação em *Agrobacterium* spp.: o vetor binário se mantém em *Agrobacterium* spp. de forma independente do plasmídeo Ti.

Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

15.000 pb), o que pode dificultar a manipulação e a clonagem dos genes de interesse. Uma alternativa para reduzir o tamanho dos vetores de transformação é por meio da separação das funções de replicação (*RepA*), que podem ser fornecidas *in trans*, por outro plasmídeo. Como resultado, esses vetores são bem menores (aproximadamente 3.000 pb) e mais fáceis de serem manipulados (HELLENS et al., 2000a; THOLE et al., 2007). Nesse caso, a linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. conterá dois plasmídios adicionais, além do plasmídeo Ti (um como o gene de interesse e outro contendo a função *Rep in trans*).

A terceira etapa para a obtenção de uma linhagem de *Agrobacterium* sp. para ser utilizada como vetor para a transformação de plantas é a transferência do plasmídeo, binário ou cointegrado. Para tanto, três métodos de transformação bacteriana podem ser utilizados: conjugação (método indireto), eletroporação ou choque térmico (métodos indiretos). Como todos são eficientes, a escolha do método a ser empregado depende basicamente dos equipamentos disponíveis em cada laboratório (WISE et al., 2006).

Neste capítulo, são apresentados métodos para a transferência de vetores de transformação para *Agrobacterium* spp. por meio da conjugação, eletroporação e choque térmico. São descritos também protocolos para extração de DNA plasmidial de *Agrobacterium* spp. e para a análise das células transformadas por PCR.

Conjugação triparental

A conjugação é um método simples e eficiente para a transferência de plasmídios de *E. coli* para

Agrobacterium spp. Na conjugação triparental (Figura 4), duas linhagens de *E. coli* (*helper* e doadora) e uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. (receptora) são cultivadas juntamente. A linhagem *helper* de *E. coli* desempenha as funções de mobilização (*mob*) e transferência (*tra*) de plasmídios entre bactérias compatíveis (DITTA et al., 1980; LAREBEKE et al., 1977). A linhagem doadora de *E. coli* contém o vetor binário ou intermediário que deverá ser transferido para a linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora. Durante a conjugação, o plasmídeo *helper* é introduzido na linhagem doadora, e, a seguir, é transferido junto com o vetor de transformação, para a *Agrobacterium* sp. O plasmídeo *helper* não se replica em *Agrobacterium* spp. e, portanto, é eliminado (DITTA et al., 1980; HOUTE et al., 1983). Após a transferência, apenas as linhagens recombinantes de *Agrobacterium* spp. são selecionadas com os antibióticos apropriados.

A principal desvantagem da conjugação triparental é que o procedimento total leva até 4 dias, sendo mais demorado do que os métodos de transformação direta. Por outro lado, esse método não requer equipamentos específicos e dispensa a preparação de DNA plasmidial a partir de *E. coli*.

Eletroporação

A eletroporação consiste em submeter células competentes da linhagem receptora de *Agrobacterium* sp. a um pulso de alta voltagem gerado por um capacitor, na presença do vetor de transformação (binário ou intermediário). Como consequência do campo elétrico gerado, a membrana plasmática é desestabilizada, produzindo poros transitórios e permitindo a passagem de macromoléculas.

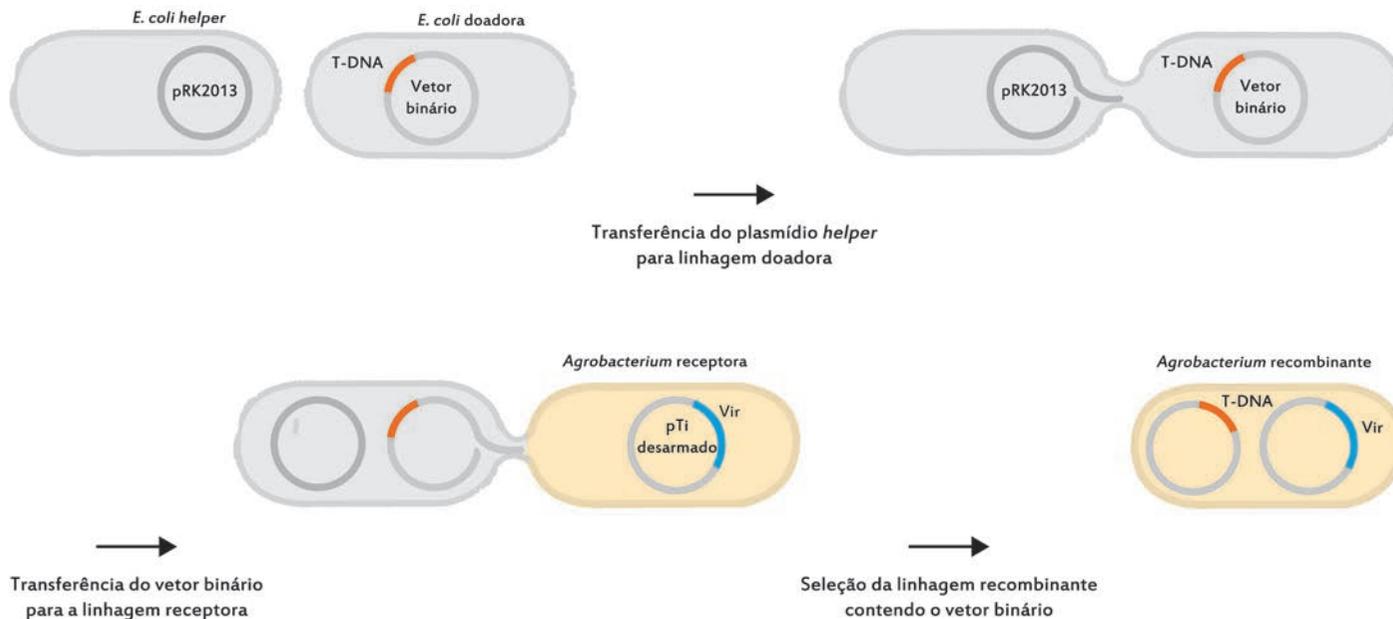


Figura 4. Transferência de um vetor binário para *Agrobacterium* spp. por conjugação triparental. O plasmídio *helper* (por exemplo, pRK2013) passa da linhagem de *E. coli helper* para a linhagem de *E. coli doadora* e, a seguir, para uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. (receptora), promovendo também a transferência do vetor binário. O plasmídio *helper* não se replica em *Agrobacterium* spp. e é eliminado. O vetor binário se mantém de forma independente do plasmídio Ti desarmado.

Fonte: adaptado de Lacorte e Romano (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

A transformação por eletroporação é um método muito eficiente (aproximadamente 10^6 células transformadas/ μg de DNA), rápido e relativamente simples, mas requer um eletroporador (WISE et al., 2006).

Choque térmico (*freeze-thaw*)

O princípio deste método é a permeabilização da membrana da linhagem receptora de *Agrobacterium* sp.

sob condições extremas de temperatura (de -186°C a 37°C), permitindo a passagem do vetor, binário ou intermediário, para a linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora. A eficiência de transformação é 10^2 – 10^3 transformantes por μg de DNA, que é consideravelmente mais baixa do que a transformação por eletroporação (WISE et al., 2006). Por outro lado, é um método simples e que não requer equipamentos específicos, embora seja necessária uma

quantidade maior de DNA do vetor, comparativamente ao método de transformação por eletroporação, além da disponibilidade de nitrogênio líquido.

Nos métodos diretos de transformação (eletroporação e choque térmico), a preparação das células competentes de *Agrobacterium* spp. é relativamente demorada. No entanto, as células podem ser mantidas a -80 °C por vários anos (Capítulo 1), para serem utilizadas em outros experimentos.

2 Conjugação triparental

2.1 Material

- Alça de platina.
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. (receptora).
- Linhagem de *E. coli* doadora (por exemplo, XL1, DH5 α , ou MC1061, contendo o vetor a ser transferido).
- Linhagem *helper* de *E. coli* pRK2013 (resistente a canamicina 50 mg/L).
- Meio LB para cultura de bactérias (Apêndice 1).
- MgSO₄ 0,8% (p/v).
- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).

- Tubos de ensaio de 15 mL esterilizados em autoclave.
- Tubos de microcentrífuga esterilizados em autoclave.

2.2 Procedimento

1. Com uma alça de platina, coletar uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora e transferir para tubo de ensaio de 15 mL, contendo 3 mL de meio LB com os antibióticos apropriados. Incubar a 28 °C, com agitação (150 rpm a 200 rpm), por 12 a 16 horas.
2. Inocular separadamente as linhagens de *E. coli*, *helper* e doadora, a partir de colônias isoladas, em 3 mL de meio LB contendo os antibióticos apropriados. Incubar a 37 °C, com agitação (150 rpm a 200 rpm), por 12 a 16 horas.

Uma relação das concentrações de antibióticos apropriadas para a seleção de *Agrobacterium* spp. e *E. coli* é apresentada na Tabela 1 e no Apêndice 3.

3. Misturar 50 μ L de cada uma das três culturas bacterianas em um tubo de microcentrífuga. Centrifugar a 9.000 rpm (6.000 *g*) por 30 segundos. Ressuspender em 50 μ L de MgSO₄ 0,8% e transferir as células para uma placa de Petri com meio LB contendo 1,2% (p/v) de ágar. Não espalhar as células. Como controle, centrifugar, separadamente, 50 μ L das culturas de *Agrobacterium* spp. e *E. coli*. Ressuspender as células

em 50 μL de MgSO_4 0,8% e transferir para placas de Petri com meio LB contendo 1,2% (p/v) de ágar. Incubar a 28 °C por 16 horas.

4. Coletar a mistura da conjugação triparental com uma alça de platina, ressuspender em 100 μL de MgSO_4 0,8% e estriar em uma placa de Petri (Capítulo 1) com meio LB contendo 1,2% (p/v) de ágar com os antibióticos apropriados (por exemplo, Rf e Kn). Incubar a 28 °C e aguardar o crescimento de colônias isoladas (2 a 3 dias).

A placa de seleção deverá conter o antibiótico seletivo da linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora (por exemplo, Rf) (Tabela 1) e o antibiótico seletivo do vetor transferido (por exemplo, Kn).

5. Como controle da eficiência da seleção (controle negativo), coletar com alça de platina as culturas das placas com *E. coli* e *Agrobacterium* spp., ressuspender em 100 μL de MgSO_4 0,8%, e estriar, separadamente, em placas com meio LB contendo 1,2% (p/v) de ágar e os antibióticos apropriados.
6. Coletar algumas colônias transconjugantes e conferir a presença do vetor transferido (itens 5 e 6 deste capítulo).

2.3 Observações

Outros meios de cultura podem ser utilizados na conjugação, como o meio YEB, MYA ou YMB (Apêndice 1).

A maioria das linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* apresenta resistência cromossômica à rifampi-

cina (50 mg/L). Porém, muitas linhagens selvagens de *A. tumefaciens* e de *A. rhizogenes* não apresentam gene marcador para seleção. Nesse caso, a seleção dos transconjugantes pode ser feita em meio mínimo (por exemplo, Min A), no qual as linhagens de *E. coli* não se desenvolvem.

Alguns vetores binários como, por exemplo, os vetores da série pGreen, são pequenos (aproximadamente 3 kpb) e fáceis de manipular. No entanto, não possuem as regiões *mob* e *tra*, e, portanto, não podem ser transferidos por conjugação (HELLENS et al., 2000a).

3 Eletroporação

3.1 Material

- Água destilada (2 L) esterilizada em autoclave e mantida a 4 °C.
- Cubetas compatíveis com o sistema de eletroporação.
- DNA plasmidial (10 ng/ μL a 100 ng/ μL , em água ou TE) (Capítulo 2).
- Eletroporador.
- Glicerol 10% (v/v) esterilizado por filtração e mantido a 4 °C.
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. (receptora).

- Meio LB cultura de bactérias (Apêndice 1).
- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL esterilizados em autoclave.

3.2 Procedimento

Preparação das células competentes

1. Para o pré-inóculo, coletar uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora com uma alça de platina e transferi-la para um tubo de ensaio de 15 mL, contendo 5 mL de meio LB acrescido dos antibióticos apropriados. Incubar a 28 °C, sob agitação (150 rpm a 200 rpm), por 12 a 16 horas.
2. Transferir o volume total do pré-inóculo para 500 mL de meio LB, em um Erlenmeyer de 2 L. Incubar a 28 °C, sob agitação (150 rpm a 200 rpm), até uma A_{600} de 0,6 a 0,8 (12 a 18 horas de cultura).
3. Transferir a cultura para dois tubos de 250 mL e centrifugar por 15 minutos a 4.000 rpm (3.200 g).
4. Descartar o sobrenadante e adicionar cerca de 50 mL de água esterilizada (mantida a 4 °C). Ressuspender as células, sob agitação suave.
5. Juntar o conteúdo dos tubos em apenas um tubo, completar o volume para 250 mL com água esterilizada e centrifugar por 15 minutos a 4.000 rpm (3.200 g).
6. Repetir a etapa 4 deste item. Ajustar o volume para 250 mL com água esterilizada e centrifugar por 15 minutos a 4.000 rpm (3.200 g).
7. Descartar o sobrenadante e adicionar 20 mL de glicerol 10%. Ressuspender as células suavemente e centrifugar por 15 minutos, a 4.000 rpm (3.200 g).
8. Retirar o sobrenadante e adicionar 0,5 mL a 1,0 mL de glicerol 10% (mantido a 4 °C). Ressuspender as células a distribuir em alíquotas de 45 μ L, em tubos de microcentrífuga.
9. Congelar as alíquotas em nitrogênio líquido e estocar a -80 °C.

Transformação por eletroporação

10. Ajustar o eletroporador: voltagem de 1.800 V, capacitância de 40 kV e resistência para 400 Ω (para uma cubeta com 1 mm de distância entre os eletrodos).
11. Descongelar uma alíquota de células no gelo, adicionar 1 μ L de DNA plasmidial (10 ng/ μ L a 100 ng/ μ L) e transferir as células competentes (40 μ L a 45 μ L) para uma cubeta de eletroporação.
12. Posicionar a cubeta no eletroporador e aplicar o pulso.
13. Imediatamente após a eletroporação, adicionar 1 mL de meio LB, transferir as células para um tubo de microcentrífuga e incubar a 28 °C por 2 a 4 horas.

14. Inocular 50 µL a 100 µL da cultura em uma placa de Petri contendo meio LB acrescido dos antibióticos apropriados. Espalhar as células com uma alça de Drigalsky e incubar a 28 °C por 2 a 3 dias.
15. Conferir a presença do vetor nas colônias crescidas sob seleção, por PCR (item 6 deste capítulo). Alternativamente, inocular as colônias em meio LB, com os antibióticos apropriados, e incubar a 28 °C sob agitação (150 rpm a 200 rpm) por 12 a 16 horas. Utilizar as culturas para extração de DNA plasmidial (item 5 deste capítulo).

3.3 Observações

As condições de eletroporação variam conforme o aparelho utilizado, e o tipo de cubeta. No modelo "Micropulser" as condições para eletroporação de *Agrobacterium* spp., utilizando uma cubeta de 0,1 cm, já estão pré-ajustadas no aparelho, bastando seguir as instruções do fabricante. No caso do modelo "Gene Pulser", utilizando uma cubeta de 0,1 cm (distância entre os eletrodos), ajustar a capacitância para 25 µF, a carga para 1,8 kV e o "Pulse Controller" para resistência de 400 W. Para a cubeta de 0,2 cm, o "Gene-Pulser" deve estar ajustado também para 2,5 kV de carga. Após a eletroporação, o "Gene-Pulser" mostra o tempo relativo à duração do pulso, que é um índice da eficiência do processo. Para *Agrobacterium* spp., nas transformações que apresentam maior eficiência, esse tempo é de 7 a 9 milissegundos.

A eficiência de transformação é expressa pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) por µg de DNA plasmidial utilizado, sendo calculada por meio da seguinte fórmula:

$$UFC/\mu\text{g} = \frac{UFC}{\text{pg do plasmídeo usado na transformação}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \text{fator(es) de diluição}$$

Por exemplo:

Uma alíquota de células competentes de *Agrobacterium* spp. foi transformada com 50 pg de DNA plasmidial. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura e, após incubação a 28 °C por 2 a 4 horas, a cultura foi diluída 10 vezes e dessa diluição foram inoculados 200 µL. Após incubar a placas por 2 dias a 28 °C, foram contadas 60 UFC. Desta forma:

$$UFC/\mu\text{g} = \frac{60 \text{ UFC}}{50 \text{ pg}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0,2 \text{ mL inoculado na placa}} \times 10 = 6 \times 10^7$$

4 Choque térmico

4.1 Material

- CaCl_2 20 mM (10 mL) em glicerol 10%: diluir 500 mL a partir de uma solução de CaCl_2 1 M em 5 mL de água destilada, adicionar 2,5 mL de uma solução de glicerol 40% e completar o volume para 10 mL com água destilada. Esterilizar por filtração. Para preparar a solução-estoque de CaCl_2 1 M (100 mL), pesar 11,1 g e dissolver em 80 mL de água destilada, completar o volume para 100 mL e esterilizar em autoclave.
- DNA plasmidial (1 μg a 2 μg , em água ou TE) (Capítulo 2).
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. (receptora).
- Meio LB para cultura de bactérias (Apêndice 1).
- Nitrogênio líquido.
- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL esterilizados em autoclave.

4.2 Procedimento

Preparação das células competentes

1. Para preparar o pré-inóculo, coletar uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora

com uma alça de platina e transferi-la para tubo de ensaio com 3 mL de meio LB com os antibióticos apropriados. Incubar a 28 °C sob agitação (150 rpm a 200 rpm) por 12 a 16 horas.

2. Transferir 2,5 mL de pré-inóculo da cultura para 500 mL de meio LB, em um Erlenmeyer de 2 L. Incubar a 28 °C com agitação (150 rpm a 200 rpm) por 12 a 16 horas (A_{600} de 0,7 a 1,0).
3. Incubar a cultura no gelo por aproximadamente 15 minutos.
4. Centrifugar as células a 4.000 rpm (3.200 *g*) por 15 minutos a 4 °C. Descartar o sobrenadante e ressuspender delicadamente as células em 1 mL de CaCl_2 20 mM em glicerol 10% (mantido a 4 °C).
5. Distribuir a suspensão de células em alíquotas de 100 mL em tubos de microcentrífuga. Congelar as alíquotas em nitrogênio líquido e estocar a -80 °C.
6. Retirar um tubo com células competentes do freezer a -80 °C e manter no gelo até descongelar. Adicionar aproximadamente 1 μg de DNA plasmidial e misturar delicadamente. Incubar no gelo por 30 minutos.
7. Incubar as células em nitrogênio líquido por 1 a 2 minutos.

Como alternativa, o choque térmico pode ser feito em um banho de gelo seco/etanol. No entanto, a eficiência de transformação é menor.

8. Incubar por 5 minutos a 37 °C.
9. Adicionar 1 mL de meio LB, homogeneizar e incubar por 2 horas a 28 °C.

10. Espalhar, com uma alça de Drigalsky, 100 mL da suspensão de células em meio LB contendo 1,2% (p/v) de ágar e os antibióticos apropriados. Incubar a 28 °C e aguardar o crescimento de colônias isoladas (2 a 3 dias). Coletar algumas colônias e conferir a presença do vetor transferido pela extração e análise de DNA plasmidial ou por PCR (itens 5 e 6).

5 Miniextração de DNA plasmidial de *Agrobacterium* spp.

5.1 Material

- Acetato de potássio 5 M pH 4,8 (Apêndice 4).
- Clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1).



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Etanol absoluto ou isopropanol.
- Etanol 70% (v/v).
- Fenol saturado em Tris-HCl pH 8,0 ou clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1) (Apêndice 4).



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Linhagem de *Agrobacterium* sp. desarmada, contendo um vetor binário.
- Lisozima 10 mg/mL (10 mL): dissolver 10 mg de lisozima em 8 mL de Tris-HCl (pH 8,0) e completar o volume para 10 mL.
- Meio LB para cultura de bactérias (Apêndice 1).
- Microcentrífuga.
- Solução I (NaOH 0,2 M, SDS 1% – 1 mL): adicionar 20 µL de NaOH 10 M (Apêndice 4) e 100 µL de SDS 10% (Apêndice 4) a 880 µL de água destilada esterilizada por autoclavagem.
- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).
- Tampão I (NaCl 0,2 M em tampão TE, RNase A 0,1 mg/mL; 25 mL): adicionar 1 mL de NaCl 5 M a 24 mL de tampão TE pH 8,0 (Apêndice 4), adicionar 2,5 mg de RNase A.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL esterilizados por autoclavagem.

5.2 Procedimento

1. Coletar uma colônia isolada da linhagem de *Agrobacterium* sp. receptora com uma alça de platina e transferi-la para um tubo de ensaio contendo 3 mL a 4 mL de meio LB com os antibióticos apropriados.

Incubar a 28 °C com agitação (150 rpm a 200 rpm) por 12 a 16 horas.

Utilizar, preferencialmente, culturas em fase exponencial de crescimento (A_{600} entre 0,7 e 1,0), pois culturas em fase estacionária apresentam excesso de mucopolissacarídeos que prejudicam a eficiência da extração.

2. Transferir 1,5 mL da cultura para tubo de microcentrífuga e centrifugar a 9.000 rpm, (6.000 g) por 1 minuto.
3. Descartar o sobrenadante, transferir mais 1,5 mL da cultura para o mesmo tubo e centrifugar a 9.000 rpm (6.000 g) por 1 minuto.
4. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 200 μ L de Tampão I.
5. Adicionar de 10 μ L a 100 μ L de lisozima 10 mg/mL, homogeneizar e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente.

A adição de lisozima não é essencial, mas aumenta o rendimento da extração de DNA, uma vez que as células de *Agrobacterium* spp. são parcialmente resistentes à lise química pelo SDS presente na Solução I.

6. Adicionar 200 μ L da Solução I. Misturar por inversão quatro a seis vezes e incubar no gelo por 15 minutos.
7. Adicionar 150 μ L de acetato de potássio 5 M previamente resfriado. Misturar por inversão quatro vezes. Incubar no gelo por 5 a 10 minutos.
8. Centrifugar a 12.000 rpm (10.500 g) por 5 minutos.
9. Retirar o sobrenadante cuidadosamente e transferir para outro tubo.

10. Acrescentar um volume de fenol ou clorofane (aproximadamente 500 μ L), agitar por 1 a 2 minutos, em um agitador de tubos, e centrifugar a 12.000 rpm (10.500 g) por 5 minutos, para separar as fases. Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo.
11. Acrescentar 1 volume (aproximadamente 500 μ L) de clorofil, agitar por 1 a 2 minutos em um agitador de tubos e centrifugar a 12.000 rpm (10.500 g) por 5 minutos, para separar as fases. Transferir a fase aquosa (fase superior) para um novo tubo.
12. Precipitar o DNA pela adição de um volume de isopropanol ou dois volumes de etanol (mantido a -20 °C). Misturar por inversão e incubar por pelo menos 1 hora a -20 °C.
13. Centrifugar a 12.000 rpm (10.500 g) por 30 minutos.
14. Descartar o sobrenadante e lavar o sedimento pela adição de aproximadamente 500 μ L de etanol 70%. Retirar o etanol e deixar o precipitado secar à temperatura ambiente. Ressuspender o DNA em 20 μ L de água destilada.
15. Estimar a concentração de DNA em espectrofotômetro (Capítulo 12). Utilizar o DNA para análises de PCR.

5.3 Observação

O DNA plasmidial extraído por este método pode ser analisado pelo padrão de restrição em gel de agarose. No entanto, dependendo do tipo de plasmídio (por exem-

plo, com baixo número de cópias), o rendimento da extração pode não ser suficiente para permitir a visualização em gel de agarose. Nesse caso, o DNA plasmidial extraído de *Agrobacterium* spp. pode ser transferido para *E. coli*, novamente extraído e, então, analisado. Alternativamente, as colônias ou o DNA plasmidial de *Agrobacterium* spp. podem ser analisados por PCR (seção 6).

6 Detecção de plasmídios em *Agrobacterium* spp. por PCR

6.1 Material

- Água destilada esterilizada por autoclavagem.
- dNTPs (2 mM).
- MgCl₂ (50 mM).
- Mistura de reação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão de reação (10X)	2,5 µL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,0 µL	2,0 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µL	0,2 mM
Primer F (10 pmol/µL)	0,5 µL	0,2 pmol/µL
Primer R (10 pmol/µL)	0,5 µL	0,2 pmol/µL
H ₂ O	9,75 µL	-

- Oligonucleotídeos iniciadores (primers) (10 pmol/µL).
- Palitos esterilizados por autoclavagem.
- Placa de Petri com colônias isoladas de *Agrobacterium* sp. transformadas (seções 2 a 4 deste capítulo) ou DNA plasmidial de *Agrobacterium* sp. (seção 5 deste capítulo).
- Tampão de reação (10X) (apropriado para a *Taq* polimerase utilizada).
- *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (0,25 µL por reação).
- Termociclador.
- Tubos de microcentrífuga de 0,2 mL autoclavados.

6.2 Procedimento

1. Utilizando palitos ou uma alça de platina, coletar uma amostra de colônias isoladas de *Agrobacterium* sp. e transferir, individualmente, para tubos de 0,2 mL contendo 10 µL de água.

Para análise de células em cultura líquida, transferir 2 µL para o tubo de 0,2 mL contendo 8 µL de água.

2. Fechar a tampa dos tubos e incubar por 2 minutos a 100 °C no termociclador.
3. Adicionar a *Taq* polimerase à mistura de reação e homogeneizar suavemente.
4. Retirar os tubos do termociclador e adicionar 15 µL da mistura de reação.

Se o termociclador não apresentar tampa aquecida, acrescentar uma gota de óleo mineral.

- Retornar os tubos ao termociclador e iniciar o programa da PCR.
- Analisar o produto da reação por eletroforese em gel de agarose 1%.

6.3 Observação

As condições ótimas para amplificação variam conforme os iniciadores (*primers*) e o tipo de enzima utilizada, entre outros fatores (Capítulo 10). Como sugestão, o seguinte programa básico pode ser utilizado: 1 ciclo de 95 °C por 1 minuto, 35 ciclos [30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C (para a amplificação de um fragmento de 1 Kb)], e um ciclo de 72 °C por 7 minutos.

7 Referências

- BEVAN, M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 22, p. 8711-8721, 1984.
- DAFNAY-YELIN, M.; LEVY, A.; TZFIRA, T. The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, n. 3, p. 102-105, 2008.
- DEBLAERE, R.; BYTEBIER, B.; DE GREVE, H.; DEBOECK, F.; SCHELL, J.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, n. 13, p. 4777-4788, 1985.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKI, D. R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 77, n. 12, p. 7347-7351, 1980.
- FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; HORSCH, R. H.; EICHHOLTZ, D. A.; FLICK, J. S.; FINK, C. L.; HOFFMANN, N. L.; SANDERS, P. R. The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. **Nature Biotechnology**, New York, v. 3, p. 629-635, 1985.
- GELVIN, S. B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 45-68, 2010.
- HELLENS, R. P.; EDWARDS, E. A.; LEYLAND, N. R.; BEAN, S.; MULLINEAUX, P. M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 819-832, 2000a.
- HELLENS, R.; MULLINEAUX, P.; KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 10, p. 446-451, 2000b.
- HEPBURN, A. G.; WHITE, J.; PEARSON, L.; MAUNDERS, M. J.; CLARKE, L. E.; PRESCOTT, A. G.; BLUNDY, K. S. The use of pNJ5000 as an intermediate vector for the genetic manipulation of *Agrobacterium* Ti-plasmids. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, n. 11, p. 2961-2969, 1985.
- HINCHEE, M. A. W.; CONNER-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 915-922, 1988.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROOT, R. A. A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOOD, E. E.; CHILTON, W. S.; CHILTON, M. D.; FRALEY, R. T. T-DNA and opine synthetic loci in tumors incited by *Agrobacterium tumefaciens* A281 on soybean and alfalfa plants. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 168, n. 3, p. 1283-1290, 1986.
- HOOD, E. E.; GELVIN, S. B.; MELCHERS, L. S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer into plants. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 2, p. 208-218, 1993.
- KOMORI, T.; IMAYAMA, T.; KATO, N.; ISHIDA, Y.; UEKI, J.; KOMARI, T. Current status of binary vectors and superbinary vectors. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, n. 4, p. 1155-1160, 2007.

KONCZ, C.; SCHELL, J. The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 204, p. 383-396, 1986.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CENARGEN, 1998. p. 93-109.

LAZO, G. R.; STEIN, P. A.; LUDWIG, R. A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. **Biotechnology**, New York, v. 9, n. 10, p. 963-967, 1991.

MURAI, N. Review: plant binary vectors of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a broad host-range replicon of pRK2, pRi, pSa or pVS1. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 4, n. 4, p. 932-939, 2013.

OOMS, G.; HOOYKAAS, P. J.; VAN VEEN, R. J.; VAN BEELEN, P.; REGENSBURG-TUINK, T. J.; SCHILPEROORT, R. A. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. **Plasmid**, New York, v. 7, n. 1, p. 15-29, 1982.

OTTEN, L.; BURR, T.; SZEGEDI, E. *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. (Ed.). **Agrobacterium: from biology to biotechnology**. New York: Springer, 2008. p. 1-46.

PALANICHELAM, K.; OGER, P.; CLOUGH, S. J.; CHA, C.; ANDREW, F.; BENT, A. F.; FARRAND, S. K. A second T-region of the soybean-supervirulent chrysope-type Ti plasmid pTiChry5, and construction of a fully disarmed vir helper plasmid. **Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI**, St. Paul, v. 13, n. 10, p. 1081-1091, 2000.

THOLE, V.; WORLAND, B.; SNAPE, J. W.; VAIN, P. The pCLEAN dual binary vector system for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, n. 4, p. 1211-1219, 2007.

TINLAND, B.; ROHFRIETSCH, O.; MICHLER, P.; OTTEN, L. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b stimulates rol-induced root formation, permits growth at high auxin concentrations and increases root size. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 223, n. 1, p. 1-10, 1990.

TZFIRA, T.; LI, J.; LACROIX, B.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 375-383, 2004.

VAN HOUTE, E.; JOOS, H.; MAES, M.; WARREN, G.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 411-417, 1983.

VAN LAREBEKE, N.; GENETELLO, C.; HERNALSTEENS, J. P.; DE PICKER, A.; ZAENEN, I.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Transfer of Ti plasmid between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 152, n. 2, p. 119-124, 1977.

VILAINE, F.; CASSE-DELBART, F. A new vector derived from *Agrobacterium rhizogenes* plasmids: a micro-Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid. **Gene**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 105-114, 1987.

WATSON, B.; CURRIER, T. C.; GORDON, M. P.; CHILTON, M. D.; NESTER, E. W. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 123, n. 1, p. 255-264, 1975.

WISE, A. A.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. In: WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. Totowa: Humana Press, 2006. p. 43-53.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 2143-2150, 1983.

Capítulo 4

Eletroporação de protoplastos

Leila Maria Gomes Barros
Vera Tavares de Campos Carneiro

1 Introdução

Eletroporação é uma técnica que utiliza pulsos elétricos para promover a formação de poros reversíveis em membranas celulares e, assim, possibilitar a introdução de íons e macromoléculas em células (DIMITROV; SOWERS, 1990; MEHRLE et al., 1985). A eletroporação foi usada pela primeira vez por Neumann et al. (1982) para introduzir DNA em células de camundongo e, desde então, a técnica tem sido utilizada para transformar bactérias (HANAHAN et al., 1991), fungos (FENG et al., 2008), células animais (DELGADO-CANEDO et al., 2006) e células vegetais sem parede celular (protoplastos) ou mesmo tecidos intactos (ADESOYE et al., 2008; HASSANEIN et al., 2009). Essa técnica é utilizada, também, para introduzir RNA, oligonucleotídeos, proteínas, partículas virais e substâncias químicas em geral (KOCHEVENKO; WILLMITZER, 2003; MACCARRONE et al., 1992; NISHIGUCHI et al., 1987; OBERMEYER; WEISENSEEL, 1995).

Protoplastos são células desprovidas de paredes celulares utilizadas na transformação de plantas, via eletroporação, agentes químicos, como polietilenoglicol (PEG), microinjeção e, inclusive, *Agrobacterium tumefaciens*, de modo transiente ou estável (CROSSWAY et al., 1986; FROMM et al., 1986; HASSANEIN et al., 2009; LOCATELLI et al., 2003; WANG et al., 2005). Teoricamente, os protoplastos podem ser isolados a partir de qualquer célula ou tecido vegetal com o uso de enzimas pectocelulolíticas. Após a eletroporação, em condições bem estabelecidas de cultura in vitro, os protoplastos recons-

tituem suas paredes, dividem-se, formam colônias, calos, e regeneram plantas, por embriogênese somática ou organogênese (BOURGIN et al., 1979; GRAMBOW et al., 1972; HASSANEIN et al., 2009; PANIS et al., 1993).

Para a obtenção de protoplasto, é feita a incubação do tecido vegetal em meio de digestão, contendo os principais nutrientes do meio de cultivo e uma mistura de enzimas pectocelulolíticas que digerem a celulose, hemicelulose e pectina (principais componentes da parede celular). A osmolaridade do meio de digestão deve ser adequada para evitar que os protoplastos recém-isolados sofram plasmólise (perda de água para o meio e murcha da célula) ou citólise (ganho de água do meio para a célula, fazendo com que estoure). O pH deve favorecer a atividade enzimática sem comprometer a viabilidade celular. A composição do meio de digestão, a combinação de enzimas pectocelulolíticas, a concentração do agente osmótico e o tempo de permanência do explante nesse meio devem ser determinados para cada tecido e genótipo utilizado. O bom estado fisiológico da planta doadora também é essencial à obtenção de protoplastos íntegros e capazes de dividir-se e formar colônias, sendo os tecidos jovens mais apropriados. Após a digestão da parede celular, os protoplastos devem ser purificados, e o número de protoplastos intactos determinado, utilizando, para isso, um hematocítmetro. Para auxiliar na determinação da viabilidade dos protoplastos recém-isolados, utilizam-se testes com o azul de metileno (HOOLEY; MCCARTHY, 1980) ou diacetato de fluoresceína (FDA) (SAUNDERS et al., 1995). Para revisão

sobre protoplastos vegetais, ver Carneiro et al. (1998) e Davey et al. (2005).

A eletroporação de protoplastos é realizada imediatamente após a purificação. Adiciona-se à suspensão de protoplastos o plasmídeo onde estão clonados o gene de interesse, o marcador de seleção e o repórter (Capítulo 8). Pode-se também adicionar DNA carreador (DNA fragmentado de timo de boi ou de esperma de salmão), com a finalidade de aumentar a eficiência de transformação. O DNA carreador tem a função de sequestrar as DNAses que poderiam degradar os plasmídios (GUERCHE et al., 1987a). No entanto, a utilização de DNA carreador deve ser restrita, pois ele também pode ser integrado ao DNA da célula a ser transformada (PEERBOLTE et al., 1985), gerando questões de biossegurança.

Uma das vantagens da eletroporação de protoplastos é a presença de um grande número de células individualizadas, homogêneas e sincronizadas disponíveis para transformação, o que favorece a obtenção de transformantes independentes e facilita a seleção. A seleção é feita a partir das fases iniciais da cultura, quando a maioria das células, derivadas dos protoplastos, está na segunda divisão. Essa seleção precoce é bastante eficiente, pois evita o aparecimento de falsos-transformantes e/ou quimeras, que representa um problema em outras técnicas de transformação, nas quais a seleção é realizada em tecidos ou órgãos intactos.

Na eletroporação, são empregados equipamentos para a aplicação de pulsos elétricos a sistemas celulares,

os eletroporadores, os quais utilizam descargas de capacitores para produzir pulsos de alta voltagem (RECH et al., 1989). A intensidade do pulso é determinada pela voltagem aplicada e a condutividade do meio. Quando os parâmetros para a eletroporação de protoplastos de novas espécies não são conhecidos, é necessário otimizar: a intensidade da voltagem e a capacitância, a duração do pulso, a condutividade do meio, a concentração dos protoplastos e a quantidade de DNA (plasmídeo e/ou carreador), entre outros (GUERCHE et al., 1987a; QUECINI et al., 2002). O grau de permeabilidade da membrana dependerá da intensidade do campo elétrico aplicado e do tipo celular. Altos níveis de permeabilização facilitam a entrada do DNA, entretanto, podem levar à formação de poros irreversíveis, diminuindo a viabilidade da célula. Portanto, é necessário estabelecer uma curva de viabilidade celular em função dos parâmetros aplicados. O campo elétrico ótimo para uma expressão transiente máxima varia com a espécie e, geralmente, corresponde a uma viabilidade dos protoplastos inferior a 50% (HAUPTMANN et al., 1987; OARD et al., 1989; QUECINI et al., 2002).

A eficiência de transformação de protoplastos por eletroporação, por tratamento químico ou ambos, pode ser determinada medindo: a) frequência absoluta de transformação (FAT), que representa o número de colônias transformadas dividido pelo número inicial de protoplastos por mililitro da cultura; b) frequência relativa de transformação (FRT) dada em porcentagem, que representa o número de colônias transformadas dividido pelo número total de colônias obtidas sem seleção por

mililitro de cultura, multiplicado por 100 (BENEDIKTSSON et al., 1995). Os trabalhos de transformação estável de protoplastos por eletroporação relatam FAT variando de 10^{-5} a 10^{-3} (HASSANEIN et al., 2009; SHILLITO et al., 1985), entretanto, com a adição de PEG e/ou microesferas de alginato, a FAT pode aumentar consideravelmente (MURAKAWA et al., 2008; NEGRUTIU et al., 1987).

A quantidade de DNA utilizada na eletroporação é variável. Guerche et al. (1987a) demonstraram que a eficiência de transformação aumentou quase 10 vezes quando a quantidade de plasmídeo utilizada aumentou de 10 μ g para 30 μ g, e que a adição de 50 μ g de DNA carreador aumentou até 14 vezes a eficiência de transformação. Como regra geral, o uso de 5 μ g a 20 μ g de plasmídeo, com ou sem a utilização do DNA carreador, resulta em uma boa eficiência de transformação (HASSANEIN et al., 2009; QI et al., 2004; QUECINI et al., 2002), entretanto, tanto a quantidade de DNA, quanto os parâmetros físicos da eletroporação variam entre as espécies vegetais ou mesmo entre genótipos de uma mesma espécie, sendo necessário otimizá-los por meio de expressão transiente (GUERCHE et al., 1987a; SAGI et al., 1994).

A expressão transiente, ou transitória, é resultado da tradução do gene introduzido sem necessária integração no genoma da planta hospedeira, dentro de 12 a 48 horas após a eletroporação. A expressão transiente é particularmente útil em estudos de funcionalidade de construções gênicas, promotores e outros fatores envolvidos no controle da expressão gênica, pois não ocorre

a interferência dos genes da vizinhança do transgene, observados na transformação estável (AKASHI et al., 2004; CARNEIRO et al., 1993; EBERT et al., 1987; ENDO et al., 2008; OARD et al., 1989). Além disso, a expressão transiente é muito mais elevada do que a expressão estável, visto que nem todo DNA que chega ao núcleo é integrado ao genoma hospedeiro e nem toda célula na qual o transgene está integrado ao genoma é viável.

Quanto à interferência da forma do plasmídeo (linear, circular, ou *supercoiled*) na transformação por eletroporação, alguns trabalhos demonstraram que a linearização favorece a transformação (NEGRUTIU et al., 1987; QUECINI et al., 2002; SHILLITO et al., 1985). Entretanto, frequências altas de transformação são obtidas utilizando plasmídios circulares (FROMM et al., 1985; HASSANEIN et al., 2009). A transformação com dois plasmídios distintos (cotransformação) é viável e de interesse quando os genes a serem transferidos estão clonados em vetores diferentes. Lyznik et al. (1989) demonstraram, em experimentos que 47% dos transformantes obtidos continham os dois plasmídios, enquanto Potrykus et al. (1985) obtiveram 72% de cotransformação. A cotransformação é utilizada para avaliar a interação entre proteínas codificadas por dois ou mais genes.

Por meio da eletroporação de protoplastos, inúmeros genes foram incorporados ao genoma de diversas plantas, conferindo a elas novas características (ALMEIDA et al., 2007; GOLOVKIN et al., 1993; GUERCHE et al., 1987b). Os genes exógenos geralmente se mantêm de forma estável, segregando-se, na progênie, de acordo com as leis

de Mendel. Atualmente, a eletroporação de protoplastos é utilizada em mutagênese sítio-dirigida. Oligonucleotídeos para o gene-alvo são introduzidos por eletroporação, produzindo mutantes pontuais em posições predeterminadas, induzindo alterações fenotípicas e bioquímicas (KOCHEVENKO; WILLMITZER, 2003).

Este capítulo descreve a metodologia de transformação de protoplastos de *Nicotiana tabacum* por eletroporação utilizada no laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (GUERCHE et al., 1987a, 1987b). O procedimento para obtenção de plantas transgênicas aqui descrito pode ser adaptado a outras culturas quando necessário.

2 Isolamento e eletroporação de protoplastos de fumo

2.1 Material

- Acetato de sódio 3 M (100 mL) (Apêndice 4).
- Centrifuga de baixa rotação.
- Cloreto de potássio 1 M: pesar 7,4 g de KCl, dissolver em 100 mL de H₂O deionizada e levar à autoclave durante 20 minutos a 121 °C e pressão de 1 atm.
- DNA carreador (DNA de timo de boi) sonicado na concentração de 1 µg/µL: pesar 10 mg de DNA de timo de boi desidratado e adicionar 10 mL de água deionizada. Depois de ter dissolvido todo o DNA, sonicar, utilizando cinco pulsos de 1 minuto cada um. Verificar o tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O tamanho médio dos fragmentos deverá estar em torno de 1 kb. Dividir a solução em dois tubos de centrifuga de 30 mL e adicionar a cada tubo 0,5 mL de acetato de sódio 3 M e 15 mL de etanol absoluto. Incubar a -20 °C durante 12 a 16 horas. Centrifugar a 20.000 g durante 40 minutos. Sob condições assépticas, dissolver cada precipitado em 5 mL de solução MKCl. Estocar em tubos de microcentrifuga a -20 °C.
- DNA plasmidial isolado, purificado e dissolvido em solução MKCl estéril na concentração de 1 µg/µL.
- Etanol 50% (v/v) (500 mL).
- Hipoclorito de sódio 1% (v/v) (1 L).
- Hidróxido de potássio 1 N: pesar 5,6 g de KOH e dissolver em 100 mL de H₂O deionizada.
- Meio TBA: meio de cultura T0 (Apêndice 2) contendo 1 mg/L de ácido naftaleno acético (ANA) e 1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP).
- Microscópio invertido.
- Papel de filtro esterilizado, folhas de 30 cm x 40 cm.
- Peneiras de malha de 40 µm a 100 µm, estéreis.
- Pipetador automático.
- Pipetas de 10 mL estéreis.

- Placas de Petri de vidro de 100 mm x 15 mm, estéreis.
- Plantas de fumo (*N. tabacum*), crescidas em casa de vegetação sombreada, aproximadamente três meses após a sementeira.
- Ponteiras com capacidade para até 1.000 μL , aparadas na ponta.
- Tubos de centrifuga de vidro de 30 mL, com tampa e adaptadores, estéreis.
- Solução enzimática (10X) (50 mL) (CHUPEAU et al., 1974):

Componentes	Quantidade	Concentração
Driselase	250 mg	0,5%
Celulase	500 mg	1,0%
Macerozima	100 mg	0,2%
H ₂ O	q.s.p. 50 mL	

Centrifugar a 5.000 g para remover o material em suspensão e esterilizar por passagem em filtro de 0,45 μm . Estocar a -20 °C.

- Solução KClCaCl_2 (1 L):

Componentes	Quantidade	Concentração final
KCl	25 g	335 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 g	13 mM
MES	585 mg	3 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e levar à autoclave por 20 minutos, a 121 °C e pressão de 1 atm.

- Solução MKCl (1 L) (GUERCHE et al., 1987b):

Componentes	Quantidade	Concentração final
Manitol	91 g	500 mM
KCl	373 mg	5 mM
MOPS	42 mg	200 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 7,2 com KOH, levar à autoclave por 20 minutos, a 121 °C e pressão de 1 atm.

2.2 Procedimento

1. Coletar de quatro a seis folhas de plantas de fumo crescidas em casa de vegetação. Coletar entre a terceira e sexta folhas, a partir da mais jovem. Colocar imediatamente em um béquer com água e levar para o laboratório.
2. Na capela de fluxo laminar, lavar as folhas, uma de cada vez, imergindo-as em um béquer contendo 500 mL de etanol 50%, durante 10 segundos. Transferir as folhas para a solução de hipoclorito de sódio 1%. Manter as folhas submersas durante 20 minutos.

A partir da desinfecção, toda manipulação deverá ser feita em condições estéreis.

Não machucar as folhas durante a manipulação; folhas danificadas diminuem o rendimento de protoplastos na preparação.

Para desinfestar folhas de outras espécies, determinar o tempo de imersão em hipoclorito de sódio empiricamente, ou seja, aumentar o tempo de imersão se a folha for muito pilosa ou reduzir o tempo se murcharem ou perderem clorofila.

Folhas de plantas cultivadas *in vitro* poderão também ser utilizadas, e a desinfestação é desnecessária. Nesse caso, as concentrações

enzimáticas utilizadas durante o isolamento dos protoplastos poderão sofrer modificações.

3. Descartar a solução de hipoclorito de sódio e adicionar água esterilizada, trocar a água quatro vezes, e, por fim, manter as folhas na última água de enxágue.
4. Preparar quatro placas de Petri de vidro, com 9 mL de meio TBA e adicionar 1 mL de solução enzimática (10X).

Se não estiverem disponíveis placas de vidro ou plástico pré-tratadas para cultura de tecidos, acrescentar 1 mL/L de polisorbato 80 ao meio TBA adicionado às placas de plástico sem tratamento. O polisorbato 80 evita a aderência dos protoplastos ao plástico e, conseqüentemente, o seu rompimento.

5. Com uma pinça, colocar as folhas cuidadosamente sobre o papel-filtro, com a epiderme inferior (abaxial) voltada para cima. Retirar a nervura principal e fazer ranhuras na epiderme abaxial, com um bisturi. Dessa etapa em diante, todo o procedimento está ilustrado na Figura 1.

A manipulação deverá ser rápida para evitar a desidratação do tecido.

As ranhuras feitas na epiderme abaxial ajudam a penetração das enzimas no parênquima da folha.

6. Colocar, cuidadosamente, as folhas nas placas de Petri, flutuando na solução enzimática, com a superfície cortada em contato com o meio. Incubar a 26 °C, no escuro, durante 16 horas.
7. Preparar quatro tubos de vidro de 30 mL para centrifuga, com funil de vidro e uma peneira de 40 µm a 100 µm, ajustada dentro do funil. Verter o conteúdo

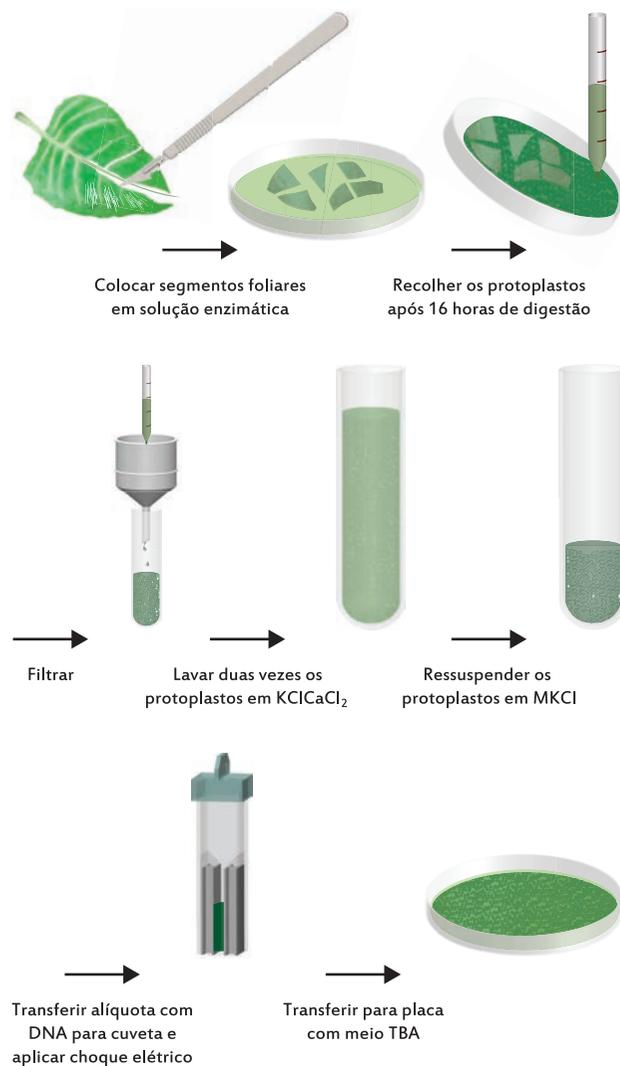


Figura 1. Representação esquemática do isolamento, purificação e eletroporação de protoplastos de *Nicotiana tabacum*.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

de cada placa (10 mL) através da peneira, e completar o volume coletado até 25 mL com KClCaCl_2 .

8. Centrifugar a 60 g, durante 7 minutos.
9. Descartar o sobrenadante, com uma pipeta. Ressuspender os protoplastos sedimentados em 1 mL de KClCaCl_2 , agitando os tubos delicadamente. Após ressuspender os protoplastos, acrescentar 25 mL da solução anterior à mistura.
10. Centrifugar a 60 g, durante 7 minutos.
11. Repetir as etapas 9 e 10.
12. Ressuspender o sedimento de cada tubo em 1 mL da solução MKCl para eletroporação e juntar o conteúdo dos quatro tubos em um único tubo. Manter o tubo com os protoplastos no gelo.
13. Retirar uma alíquota de 50 μL da suspensão de protoplastos, utilizando uma ponteira de 1.000 μL , aparada na ponta. Contar o número de protoplastos em hemacitômetro, utilizando microscópio óptico invertido. Estimar o número de protoplastos por mL da suspensão.

Quando se deseja retirar amostras de protoplastos, devem-se utilizar ponteiras de 1.000 μL , aparadas na ponta, para evitar a ruptura dos protoplastos.

Para estimar o número de protoplastos por mL de cultura, é necessário contar os protoplastos, utilizando hemacitômetro. Nos hemacitômetros comuns, cada quadrado tem uma área de 1 mm^2 , e a profundidade da câmara é de 0,1 mm; assim, cada quadrado representa um volume de 0,1 mm^3 ou 10^{-4}cm^3 . Como 1 cm^3 equivale a 1 mL, a concentração de protoplastos por mL será igual à média de protoplas-

tos por quadrado contado $\times 10^4$. Normalmente, são contadas células de cinco a dez quadrados para a obtenção da média por quadrado.

14. A concentração de protoplastos deverá ser ajustada para 2×10^6 protoplastos/mL com solução MKCl.

Geralmente, a concentração da amostra estará acima do desejado. Se estiver abaixo, reprecipitar os protoplastos por centrifugação e ressuspender em um volume menor de meio.

15. Retirar uma alíquota de 1 mL da suspensão de protoplastos e colocar na cubeta de eletroporação.

É ideal manter a condutividade da suspensão de protoplastos entre 1.500 $\mu\text{S/cm}$ e 2.000 $\mu\text{S/cm}$. Para tal, utilizar um medidor de condutividade. Se a condutividade da amostra estiver acima de 2.000 $\mu\text{S/cm}$, proceder a nova lavagem com solução MKCl e ressuspender no mesmo volume, de modo a manter a concentração de 2×10^6 protoplastos/mL. Quando a condutividade estiver abaixo de 1.500 $\mu\text{S/cm}$, ajustá-la, adicionando alguns microlitros de KCl 1 M.

16. Adicionar 20 μL do plasmídeo mais 50 μL do DNA carreador diretamente à suspensão de protoplastos, na cubeta de eletroporação, e misturar cuidadosamente com a ponta da pipeta.

As quantidades de plasmídeo e DNA carreador a serem utilizadas deverão ser otimizadas para cada aplicação, dependendo da origem dos protoplastos e objetivo do experimento.

17. Aplicar três pulsos elétricos de 250 V/cm por meio de descargas de capacitores de 58 μF .

A voltagem e os capacitores utilizados dependerão do eletroporador utilizado e do diâmetro dos protoplastos.

- Retirar cuidadosamente os protoplastos eletroporados da cubeta e colocar em uma placa de Petri. Deixar em repouso durante aproximadamente 10 minutos.

Para estimar o número de protoplastos viáveis após a eletroporação, proceder ao teste de viabilidade (ver o item 2.3 Observações).

A simples observação dos protoplastos após o choque elétrico sob microscópio invertido fornecerá uma indicação da viabilidade da cultura.

- Repetir as etapas 15 a 18 deste item para todas as amostras.
- Após o período de repouso dos protoplastos eletroporados, adicionar 9 mL de meio TBA às placas e agitar delicadamente para misturar as duas soluções.

O tempo de repouso entre a eletroporação e a diluição com o meio TBA aumenta a eficiência de transformação (FROMM et al., 1985; GUERCHE et al., 1987b).

- Para experimentos de expressão transiente, deixar as placas no escuro a 26 °C, durante 12 a 48 horas, e seguir o protocolo descrito na seção 3.
- Quando se desejar recuperar planta transgênicas, após a eletroporação, diluir os protoplastos a 5×10^4 protoplastos/mL e mantê-los a 26 °C durante 36 horas no escuro, seguindo o protocolo descrito na seção 4.

Como a suspensão de protoplastos está a 2×10^6 protoplastos/mL, transferir uma alíquota de 250 µL da solução de protoplastos para 10 mL de meio T0 para alcançar a concentração final de 5×10^4 protoplastos/mL.

2.3 Observações

Para se estimar o número de protoplastos viáveis, colocar uma alíquota de 98 µL da suspensão de protoplastos em um pequeno tubo de ensaio de vidro, e adicionar 2 µL de diacetato de fluoresceína (FDA) 0,5% (p/v), dissolvido em acetona, obtendo-se uma concentração final de 0,01% (LARKIN, 1976). Misturar delicadamente com a ponta da pipeta e conservar, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Adicionar uma gota da suspensão a uma lâmina de microscópio e observar a fluorescência, usando microscópio de fluorescência. Contar o número de protoplastos viáveis pelo número total de protoplastos de cada campo. Os protoplastos que exibem fluorescência verde-amarelada são considerados viáveis. A ausência de fluorescência, ou presença de autofluorescência avermelhada (clorofila), indica protoplastos danificados e, conseqüentemente, inviáveis. Outra alternativa de corante é o azul de metileno (HOOLEY; MCCARTHY, 1980), na concentração final de 0,01%. Nesse caso, os protoplastos são examinados em microscópio de luz. Protoplastos viáveis tornam-se amarelo-brilhantes devido à redução do corante por compostos do metabolismo celular, enquanto os protoplastos inviáveis e fragmentos celulares apresentam-se azul-escuros.

Eletroporadores para protoplastos estão disponíveis comercialmente. Trata-se dos mesmos aparelhos usados para transformação de bactérias, porém, com utilização de cubetas específicas de 0,4 cm de distância entre os eletrodos (KOCHEVENKO; WILLMITZER, 2003; QI et al., 2004).

É possível adquirir DNA carreador já sonicado de fornecedores de produtos para biologia molecular.

Para aumentar a eficiência de obtenção de protoplastos de *Arabidopsis*, Wu et al. (2009) utilizaram fita adesiva para retirar a epiderme inferior do tecido foliar, e, assim, expor o tecido parenquimatoso às enzimas pectocelulolíticas.

3 Análise da expressão transiente de genes repórteres em protoplastos

3.1 Material

- Centrífuga de bancada.
- Funil de vidro.
- Microcentrífuga.
- Microscópio óptico.
- Solução KClCaCl_2 (1 L) (item 2.1 Material).
- Tampão de extração de proteínas para ensaio da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS) (100 mL) (Capítulo 8).
- Tubos para centrífuga, de vidro, com capacidade para 30 mL.

- Ultrassonicador, nitrogênio líquido ou seringa com agulha hipodérmica curvada.

3.2 Procedimento

1. Transferir os 10 mL da cultura dos protoplastos eletroporados das placas de Petri para tubos de centrífuga de vidro. Adicionar 15 mL de KClCaCl_2 a cada tubo e misturar delicadamente. Centrifugar a 100 g durante 10 minutos.
2. Retirar todo o sobrenadante e adicionar ao sedimento 200 μL de tampão de extração apropriado ao ensaio enzimático GUS. Transferir a mistura para tubos de microcentrífuga e manter no gelo.
3. Romper os protoplastos com cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (30 segundos cada ciclo) e imediato descongelamento em banho-maria, a 37 °C por 30 segundos.

Como alternativa, o rompimento dos protoplastos poderá ser feito, utilizando uma das seguintes técnicas: submeter os protoplastos a ultrassom durante 3 minutos, mantendo a preparação sempre no gelo, ou passá-los várias vezes através de agulha hipodérmica. É importante verificar a eficiência do método utilizado, observando uma alíquota sob microscópio; caso uma amostra significativa de protoplastos permaneça intacta, deve-se repetir a operação até a obtenção da lise da maior parte deles.

4. Centrifugar os extratos a 12.000 rpm em microcentrífuga durante 5 minutos, a 4 °C. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.

- Os extratos serão utilizados imediatamente em ensaios enzimáticos para detecção da atividade de genes repórteres (Capítulo 8).
- Armazenar uma alíquota de 50 µL a -20 °C para quantificação da concentração proteica (Capítulo 20).

Essa quantificação será utilizada para calcular a atividade específica da enzima.

4 Cultura e regeneração dos protoplastos eletroporados

4.1 Material

- Meio CBA: meio de cultura CHM (Apêndice 2), contendo 0,1 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA.
 - Meio de cultura B: meio T0 (Apêndice 2) com sacarose 1% (p/v) e sem manitol.
 - Meio R4BA: meio de cultura R4 (Apêndice 2), contendo 0,1 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de ácido indol-acético (AIA).
 - Meio TBA: meio de cultura T0 (Apêndice 2), contendo 1 mg/L de BAP e 1 mg/L de ANA.
 - Pipetas estéreis.
 - Placas de Petri estéreis.
- Solução-estoque do agente de seleção (Apêndice 3).

4.2 Procedimento

- Após a eletroporação, diluir os protoplastos a 5×10^4 protoplastos/mL, isto é, colocar 250 mL da suspensão de protoplastos em uma placa de Petri, adicionar 9,75 mL de meio TBA e misturar delicadamente. Manter no escuro, a 26 °C, durante 3 dias. Após esse período, transferir as placas para fotoperíodo de 16 horas, na mesma temperatura (Figura 2).
- Cinco a sete dias depois da eletroporação, as microcolônias derivadas dos protoplastos terão de duas a oito células (Figura 2). Nesse ponto, diluir novamente cada placa cinco vezes em meio CBA sólido. Retirar cinco alíquotas de 2 mL de cada placa, contendo as microcolônias derivadas dos protoplastos eletroporados e transferir cada alíquota para uma placa estéril. Fundir o meio CBA, resfriar à temperatura de aproximadamente 37 °C e adicionar o agente seletivo ao meio na concentração adequada. Adicionar, então, 8 mL do meio seletivo a cada placa contendo os protoplastos. Manter as placas na sala de cultura a 26 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

O agente seletivo depende do gene marcador presente no plasmídeo empregado para a transformação dos protoplastos; no caso do gene *nptII*, utilizar 100 mg/L de canamicina para células de fumo. Guerche et al. (1987b) recomendam utilizar o antibiótico paromomicina na concentração de 20 mg/L por ser mais eficiente na seleção das células transformadas.

É importante transferir algumas microcolônias para meio sem agente seletivo, para controle da viabilidade. Para verificar a eficiência do antibiótico, realizar o procedimento de cultivo usando protoplastos não eletroporados em meio com o agente seletivo.

3. Após 4 a 6 semanas em meio de seleção (Figura 2), transferir os calos resistentes para meio R4BA sólido com uma pinça. Inocular cerca de dez calos por placa. Manter as culturas em sala de crescimento a 26 °C, com fotoperíodo de 16 horas.

Nesta etapa o uso de agente seletivo não é recomendado. Alguns antibióticos prejudicam a regeneração.

4. Após 1 a 2 meses, transferir as brotações de aproximadamente 0,5 cm de comprimento para tubos de ensaio contendo o meio B acrescido do agente seletivo, para enraizamento. Colocar uma brotação por tubo.

Nesta etapa é recomendável retornar ao uso do agente seletivo para se certificar da eficiência da seleção inicial. No caso do gene nptII, utilizar 100 mg/L de canamicina para fumo. Normalmente, brotações não transformadas (escapes) não se desenvolvem a partir de protoplastos de fumo eletroporados.

5. As brotações transformadas permanecerão nesse meio até o enraizamento (1 a 2 meses). As brotações-escape, não transformadas, necrosarão (Figura 2). As plantas enraizadas poderão ser transferidas para solo, aclimatadas e mantidas em casa de vegetação autorizada para o cultivo de organismos geneticamente modificados. Após aproximadamente 3 meses, as plantas florescem, e as sementes produzidas por autofecundação poderão ser analisadas quanto à segregação do transgene (Figura 2).

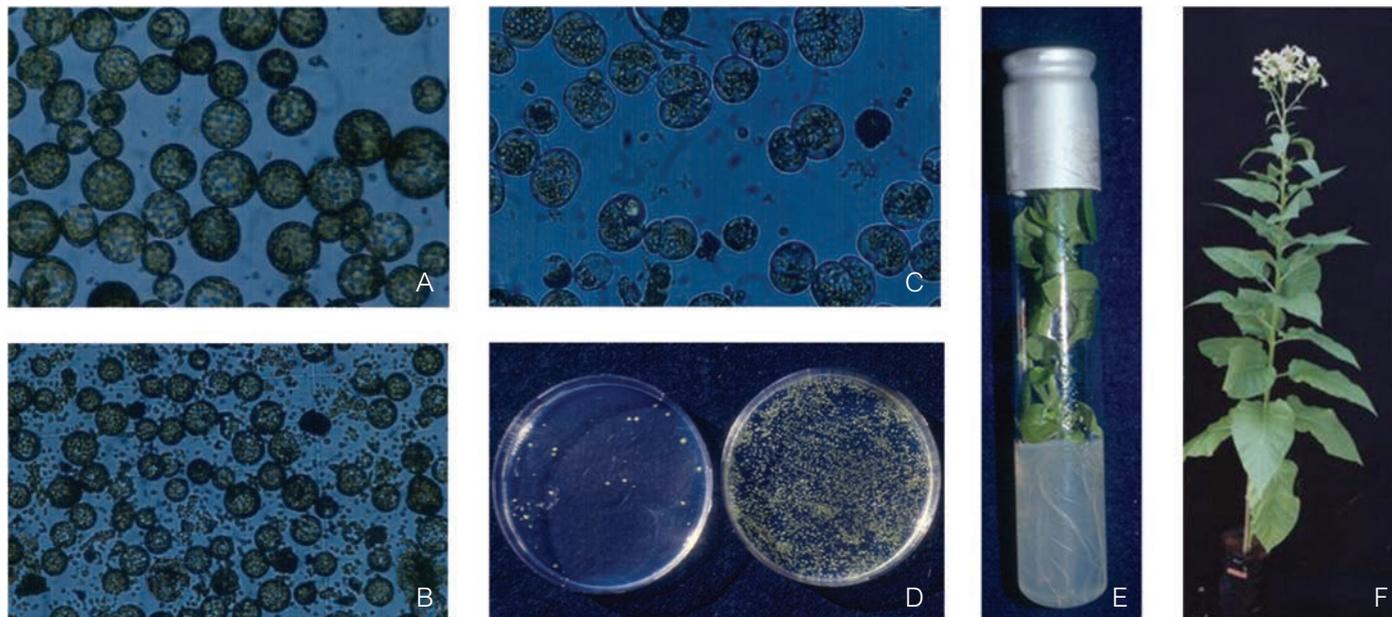
No momento da floração, os ápices das plantas transgênicas deverão ser cobertos com sacos de papel para evitar escapes de pólenes ou fecundação cruzada.

6. Analisar a integração e expressão dos transgenes por técnicas descritas nos capítulos 10, 12, 14 e 15 deste Manual.
7. Para analisar a segregação do transgene, colocar um pouco de semente em um microtubo e proceder à desinfestação em capela de fluxo laminar. Adicionar às sementes 1 mL de etanol 50%, agitar por inversão do microtubo e deixar à temperatura ambiente, em repouso, durante 1 minuto. Em seguida, retirar o etanol com micropipeta e adicionar 1 mL de solução de hipoclorito de sódio 2%, manter à temperatura ambiente durante 40 minutos, agitando a cada 10 minutos. Retirar o hipoclorito e lavar três vezes em água destilada estéril. Inocular as sementes em meio B, contendo o agente seletivo apropriado.

No caso de o agente seletivo ser a canamicina, após, aproximadamente, uma semana de cultivo a 26 °C sob 16 horas de luz, as sementes estarão germinadas e, ao final de duas semanas, observam-se plântulas com as folhas cotiledonares cloróticas, mortas, ou seja, não herdaram o transgene (susceptíveis ao agente seletivo), e plantas com folhas cotiledonares verdes e folhas primárias em desenvolvimento, plantas resistentes à canamicina e, portanto, que herdaram o transgene (Figura 2).

8. Após a germinação, proceder à contagem de plantas sensíveis e resistentes (Figura 2).

O resultado poderá ser analisado por teste estatístico para estimar o número de transgenes no genoma da planta hospedeira. Se ocorrer a inserção de apenas uma cópia do transgene no genoma hospedeiro, a proporção de plântulas resistentes para susceptíveis será de aproximadamente 3 para 1. Quando forem inseridas 2 cópias em loci



Fotos: Vera Tavares de Campos Carneiro (A,B e C);
Leila Maria Gomes Barros (D, E e F)

Figura 2. Cultura e regeneração de protoplastos de *Nicotiana tabacum*: A) protoplastos recém-isolados; B) protoplastos após eletroporação; C) células derivadas de protoplastos em divisão após uma semana em cultura; D) calos em meio de cultura na presença (à esquerda) e ausência do agente seletivo (à direita); E) planta cultivada em meio de seleção; F) planta transgênica em casa de vegetação.

distantes (não ligados) do genoma, observa-se a proporção de 15 resistentes para 1 sensível; para 3 cópias inseridas independentemente, observa-se a proporção de 63 resistentes para 1 sensível; e assim por diante. Portanto, para análise de até 3 cópias do transgene, é necessário semear, no mínimo, 200 sementes, para o teste estatístico ser válido.

5 Referências

ADESOYE, A.; MACHUKA, J.; TOGUN, A. CRY 1AB transgenic cowpea obtained by nodal electroporation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 18, p. 3200-3210, 2008.

AKASHI, H.; MIYAGISHI, M.; TAIRA, K. RNAi expression vectors in plant cells. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 252, p. 533-543, 2004.

ALMEIDA, A. M.; VILLALOBOS, E.; ARAUJO, S. S.; CARDOSO, L. A.; SANTOS, D. M.; SANTOS, M. A.; FEVEREIRO, P. S. TORNE, J. M. Electroporation of maize embryogenic calli with the trehalose-6-phosphatesynthase gene from *Arabidopsis thaliana*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 29, n. 3, p. 273-281, 2007.

BENEDIKTSSON, I.; SPAMPINATO, C. P.; SCHIEDER, O. Studies of the mechanism of transgene integration into plant protoplasts: improvement of the transformation rate. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, p. 53-61, 1995. DOI: 10.1007/BF00023930.

- BOURGIN, J.; CHUPEAU, Y.; MISSONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, n. 2, p. 288-292, 1979.
- CARNEIRO, V. T. C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998. v. 1, p. 413-458.
- CARNEIRO, V. T. C.; PELLETIER, G.; SMALL, I. Transfer RNA-mediated suppression of stop codons in protoplasts and transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 681-690, 1993.
- CHUPEAU, Y.; BOURGIN, J. P.; MISSONIER, C.; DORION, N.; MOREL, G. Préparation et culture de protoplastes de divers *Nicotiana*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 278, p. 1565-1568, 1974.
- CROSSWAY, A.; OAKES, J. V.; IRVINE, J. M.; WARD, B.; KNAUF, V. C.; SHEWMAKER, C. K. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 202, p. 179-185, 1986.
- DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 131-171, 2005.
- DELGADO-CANEDO, A.; SANTOS, D. G. dos; CHIES, J. A. B.; KVITKO, K.; NARDI, N. B. Optimization of an electroporation protocol using the K562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNAses. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 51, n. 3, p. 141-148, 2006.
- DIMITROV, D. S.; SOWERS, A. E. Membrane electroporation - fast molecular exchange by electroosmosis. **Biochimie et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1022, n. 3, p. 381-392, 1990.
- EBERT, P. R.; HA, S. B.; AN, G. Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 84, n. 16, p. 5745-5749, 1987.
- ENDO, S.; PESQUET, E.; TASHIRO, G.; KURIYAMA, H.; GOFFNER, D.; FUKUDA, H.; DEMURA, T. Transient transformation and RNA silencing in *Zinnia* tracheary element differentiating cell cultures. **Plant Journal**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 864-875, 2008.
- FENG, M. Q.; ZHOU, T.; WEI, W. J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Tn5 transposase-assisted high-efficiency transformation of filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 5, p. 937-944, 2008.
- FROMM, M. E.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. **Nature**, London, v. 319, p. 791-793, 1986.
- FROMM, M.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 82, n. 17, p. 5824-5828, 1985.
- GOLOVKIN, M. V.; ABRAHAM, M.; MOROCZ, S.; BOTTKA, S.; FEHER, A.; DUDITS, D. Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. **Plant Science**, Limerick, v. 90, n. 1, p. 41-52, 1993.
- GRAMBOW, H. J.; KAO, K. N.; MILLER, R. A.; GAMBORG, O. L. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. **Planta**, Berlin, v. 103, n. 4, p. 348-355, 1972.
- GUERCHE, P.; BELLINI, C.; LE MOULLEC, J. M.; CABOCHE, M. Use of a transient expression assay for the optimization of direct gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. **Biochimie**, Paris, v. 69, n. 6/7, p. 621-628, 1987a.
- GUERCHE, P.; CHARBONNIER, M.; JOUANIN, L.; TOURNEUR, C.; PASZKOWSKI, J.; PELLETIER, G. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. **Plant Science**, Limerick, v. 52, n. 1/2, p. 111-116, 1987b.
- HANAHAN, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. **Methods in Enzymology**, New York, v. 204, p. 63-113, 1991.
- HASSANEIN, A.; HAMAMA, L.; LORIDON, K.; DORION, N. Direct gene transfer study and transgenic plant regeneration after electroporation into mesophyll protoplasts of *Pelargonium x hortorum*, 'Panaché Sud'. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 10, p. 1521-1530, 2009.
- HAUPTMANN, R. M.; OZIAS-AKINS, P.; VASIL, V.; TABAEIZADEH, Z.; ROGERS, S. G.; HORCH, R. B.; VAZIL, I. K.; FRALEY, R. T. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 265-270, 1987.
- HOOLEY, R.; MCCARTHY, D. Extracts from virus infected hypersensitive tobacco leaves are detrimental to protoplasts survival. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 16, p. 25-38, 1980.
- KOCHEVENKO, A.; WILLMITZER, L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 1, p. 174-184, 2003.
- LARKIN, P. J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 128, n. 3, p. 213-216, 1976.

- LOCATELLI, F.; VANNINI, C.; MAGNANI, E.; CORAGGIO, I.; BRACALE, M. Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 9, p. 865-871, 2003.
- LYZNIK, L. A.; RYAN, R. D.; RITCHIE, S. W.; HODGES, T. K. Stable co-transformation of maize protoplasts with *gusA* and *neo* genes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 151-161, 1989.
- MACCARRONE, M.; VELDINK, G. A.; Vliegenthart, J. F. Inhibition of lipoxygenase activity in lentil protoplasts by monoclonal antibodies introduced into the cells via electroporation. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 995-1001, 1992.
- MEHRLE, W.; ZIMMERMANN, U.; HAMPP, R. Evidence for a symmetrical uptake of fluorescent dyes through electro-permeabilized membranes of *Avena mesophyll* protoplasts. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 185, n. 1, p. 89-94, 1985.
- MURAKAWA, T.; KAJIYAMA, S.; IKEUCHI, T.; KAWAKAMI, S.; FUKUI, K. Improvement of transformation efficiency by bioactive-beads-mediated gene transfer using DNA-lipofectin complex as entrapped genetic material. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 105, n. 1, p. 77-80, 2008.
- NEGRUTIU, I.; SHILLITO, R.; POTRYKUS, I.; BIASINI, G.; SALA, F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 8, p. 363-373, 1987.
- NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDER, M.; WANG, M.; HOFSCHEIDER, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO Journal**, Oxford, v. 1, n. 7, p. 841-845, 1982.
- NISHIGUCHI, M.; SATO, T.; MOTOYOSHI, F. An improved method for electroporation in plant-protoplasts: infection of tobacco protoplasts by mosaic virus particles. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 6, n. 2, p. 90-93, 1987.
- OARD, J. H.; PAIGE, D.; DVORAK, J. Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 156-160, 1989.
- OBERMEYER, G.; WEISENSEELE, M. H. Introduction of impermeable molecules into pollen grains by electroporation. **Protoplasma**, New York, v. 187, n. 1/4, p. 132-137, 1995.
- PANIS, B.; VAN WAUWE, A.; SWENNEN, R. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 7/8, p. 403-407, 1993.
- PEERBOLTE, R.; KRENS, F. A.; MANS, R. M. W.; FLOOR, M.; HOGE, J. H. C.; WULLEMS, G. J. Transformation of plant protoplasts with DNA: cotransformation of non-selected calf thymus carrier DNA and meiotic segregation of transforming DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 4, p. 235-246, 1985.
- POTRYKUS, I.; PASZKOWSKI, J. S.; M. W.; PETRUSKA, J.; SHILLITO, R. D. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 199, n. 2, p. 169-177, 1985.
- QI, Y.; ZHONG, X.; ITAYA, A.; DING, B. Dissecting RNA silencing in protoplasts uncovers novel effects of viral suppressors on the silencing pathway at the cellular level. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 22, p. 1-10, 2004.
- QUECINI, V. M.; OLIVEIRA, C. A. de; ALVES, A. C.; VIEIRA, M. L. C. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 73-80, 2002.
- RECH, E. L.; ALVES, E. S.; DAVEY, M. R. Electroporation: a circuit diagram for assessment of physical parameters on eucaryotic cells. **Technique**, Philadelphia, v. 1, n. 2, p. 125-129, 1989.
- SAGI, L.; REMY, S.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; VOLCKAERT, G. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. "Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, n. 5, p. 262-266, 1994.
- SAUNDERS, J. A.; LIN, C. H.; HOU, B. H.; CHENG, J.; TSENGWA, N.; LIN, J. J.; SMITH, C. R.; MCINTOSH, M. S.; VAN WERT, S. Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 3, n. 3, p. 181-90, 1995.
- SHILLITO, R. D.; SAUL, M. W.; PASZKOWSKI, J.; MUELLER, M.; POTRYKUS, I. High efficiency direct gene transfer to plants. **Bio/Technology**, New York, v. 3, n. 12, p. 1099-1103, 1985.
- WANG, Y. P.; SONNTAG, K.; RUDLOFF, E.; HAN, J. Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. **Plant Breeding**, Oxford, v. 124, n. 1, p. 1-4, 2005.
- WU, F. H.; SHEN, S. C.; LEE, L. Y.; LEE, S. H.; CHAN, M. T.; LIN, C. S. Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. **Plant Methods**, London, v. 5, p. 16, 2009.

Capítulo 5

○ sistema biobalístico

Giovanni Rodrigues Vianna
Francisco José Lima Aragão
Elíbio Leopoldo Rech

1 Introdução

O sistema biobalístico para a introdução de material genético no genoma nuclear de plantas superiores foi inicialmente proposto por Sanford et al. (1987). Desde então, essa tecnologia tem sido eficientemente utilizada para a introdução de genes em diferentes espécies vegetais.

A biobalística utiliza micropartículas em alta velocidade para introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em células e tecidos in vivo. O sistema biobalístico também é denominado método de bombardeamento com micropartículas, *gene gun* (arma de genes), aceleração de partículas, entre outros. Para a utilização desse método, diferentes formas capazes de acelerar micropartículas (de

0,2 μm a 4 μm de diâmetro) cobertas com sequências de ácidos nucleicos a velocidades superiores a 1.500 km/h foram desenvolvidas e construídas. As micropartículas, que podem ser de ouro ou de tungstênio (Figura 1), penetram na parede e na membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, e integrado no genoma do organismo receptor.

O desenvolvimento de sistemas que possibilitam a introdução de genes em alta frequência em plantas, também, é de fundamental importância na avaliação funcional de diferentes características (MCELROY, 2004). Vários estudos foram e são conduzidos a fim de estabelecer sistemas de transformação altamente eficientes

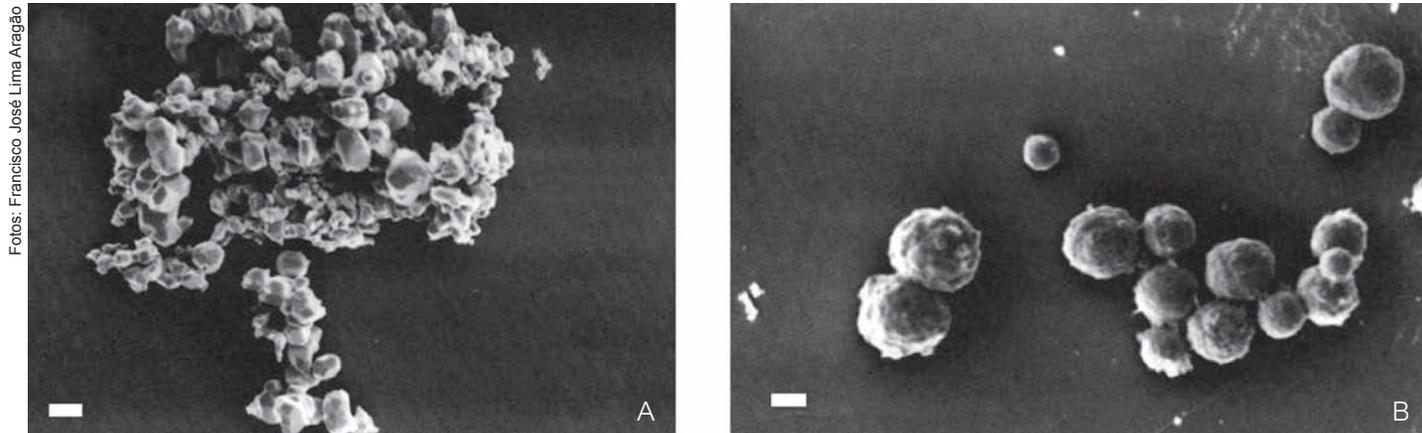


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura das micropartículas cobertas com DNA: A) tungstênio; B) ouro.

que sejam simples de executar, independentes do genótipo e capazes de resolver os problemas associados à especificidade do hospedeiro e do tecido e/ou variação somaclonal, frequentemente relacionada à regeneração da planta *in vitro*.

Atualmente, sistemas de transformação mediados por *Agrobacterium* spp. (Capítulo 6) e biobalística são as duas principais metodologias de transferência de DNA exógeno para diversas culturas de importância econômica, incluindo soja (ARAGÃO et al., 2000; BEHRENS et al., 2007; DANG; WEI, 2007; LIU et al., 2004; NUNES et al., 2006; RECH et al., 2008; VIANNA et al., 2011), feijão comum (ARAGÃO et al., 1996, 2002; LIU et al., 2005; RECH et al., 2008; VIANNA et al., 2004) e algodão (ARAGÃO et al., 2005; LEELAVATHI et al., 2004; RECH et al., 2008). Porém, o maior problema associado a ambos os métodos, para as culturas aqui abordadas, são as baixas frequências de obtenção de transformantes.

Para a otimização do protocolo de transformação por biobalística, foi desenvolvido um novo método para selecionar células meristemáticas transformadas em eixos embrionários de sementes maduras de soja (ARAGÃO et al., 2000), feijão (BONFIM et al., 2007) e algodão (ARAGÃO et al., 2005). Nesse processo, a seleção é baseada no uso do herbicida imazapyr (2-[4,5-dihidro-4-metiletil]-5-oxo-1H-imidazol-2-il] ácido 3-piridinocarboxílico) após a introdução de um gene mutante *ahas* de *Arabidopsis thaliana* (At), sob controle de suas próprias sequências regulatórias. A utilização desse método de se-

leção, combinada com a indução de brotações múltiplas pela citocinina BAP (6-benzilaminopurina), e o sistema biobalístico, resultou em aumento significativo na recuperação de plantas transgênicas férteis resistentes ao herbicida, para essas culturas.

O gene *Atahas* contém uma mutação na posição 653 pb da sequência codificadora (GenBank X51514), resultando em uma substituição de serina para asparagina, conferindo resistência específica aos herbicidas da classe das imidazolinonas (SATHASIVAN et al., 1990), que inclui o imazapic, imazethapir, imazamox, imazaquin e o próprio imazapyr.

O método otimizado foi utilizado com sucesso para gerar uma linhagem de soja com redução de até 94,5% do teor de fitato na semente (NUNES et al., 2006), uma linhagem elite de soja tolerante aos herbicidas da classe das imidazolinonas (VIANNA et al., 2011), além de plantas de feijão resistentes ao vírus do mosaico-dourado (BONFIM et al., 2007).

Esse método, desenvolvido no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pode ser amplamente utilizado para qualquer espécie de planta, em sistemas de transformação que empreguem a seleção de células meristemáticas apicais de eixos embrionários de sementes maduras.

Com o objetivo de servir como guia geral, este capítulo descreve o método biobalístico para a obtenção de plantas transgênicas de feijão, soja e algodão.

2 Preparação do material vegetal de soja e de feijão

2.1 Material

- Água destilada estéril.
- Bisturi (lâmina número 11).
- Capela de fluxo laminar.
- Microscópio estereoscópico.
- Sementes maduras de soja (*Glycine max* L.) ou de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) (Apêndice 4).
- Pinça.
- Placas de Petri estéreis (60 mm x 15 mm).
- Placas de Petri estéreis (150 mm x 15 mm), contendo papel filtro.

2.2 Procedimento

1. Em uma capela de fluxo laminar, colocar cerca de 300 sementes em 300 mL de etanol 70% durante

1 minuto e, em seguida, transferi-las para 300 mL de hipoclorito de sódio 1% durante 20 a 30 minutos.

2. Lavar as sementes cinco vezes em água estéril.
3. Embeber as sementes durante 16 a 18 horas em água destilada, à temperatura ambiente. Colocar uma camada de, pelo menos, 8 cm de água acima das sementes.
4. Pegar de seis a oito sementes desinfestadas por vez, e, com auxílio de uma pinça, transferi-las para uma placa de Petri estéril (150 mm x 15 mm), contendo papel filtro.
5. Segurar individualmente cada semente, abrir os cotilédones e excisar os eixos embrionários utilizando pinça e bisturi.
6. Sob microscópio estereoscópico, cortar as folhas primárias, a fim de expor a região meristemática apical que será bombardeada com micropartículas revestidas de DNA (Figura 2), e transferir o eixo embrionário imediatamente para uma placa de Petri contendo água estéril.

2.3 Observações

As sementes devem ser produzidas em casa de vegetação e colhidas manualmente, a fim de reduzir a contaminação.

A escolha da cultivar de feijoeiro é essencial para a transformação de alta frequência durante o bombardeamento.

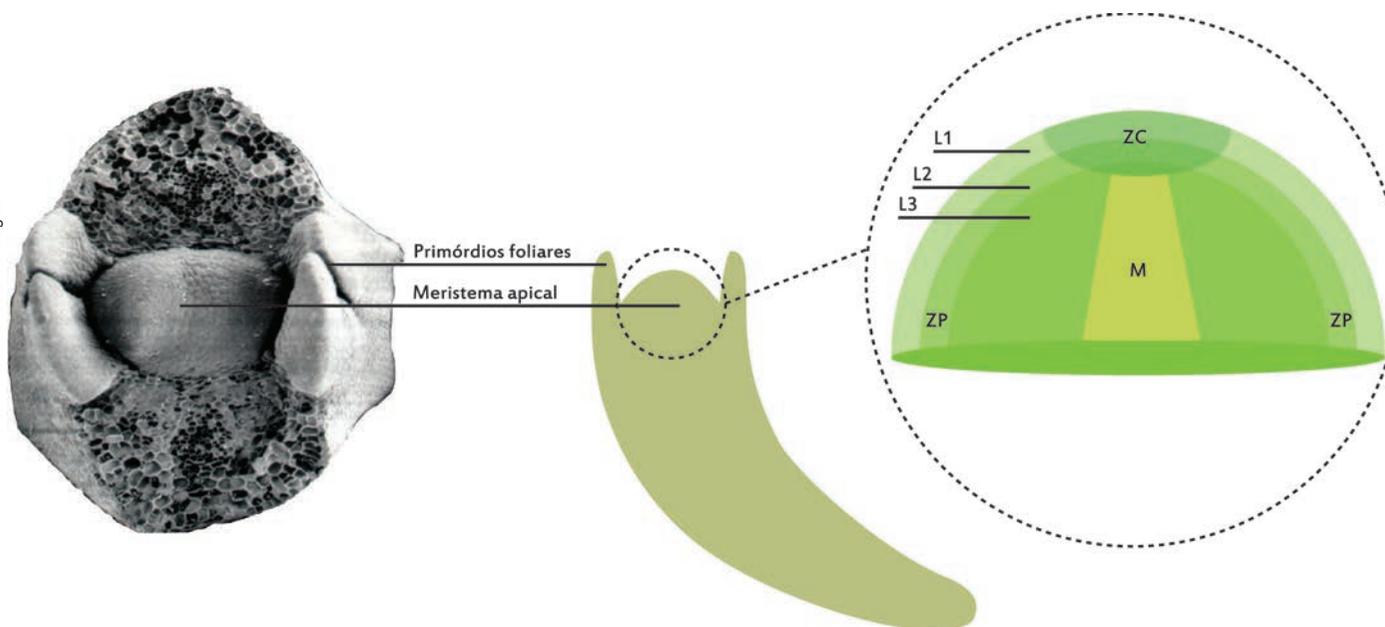


Figura 2. Esquema que representa a região do meristema apical do embrião que deve receber as micropartículas cobertas com DNA. Para mais eficiência na transformação, as micropartículas deverão alcançar a camada L3 da zona central (ZC) do meristema apical (M). L1, L2 e L3: camadas 1, 2 e 3 respectivamente. ZP: zona periférica.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

mento do meristema apical. As cultivares Pontal (Carioca) e Jalo possuem 100% dos eixos embrionários com a região meristemática apical totalmente exposta (ARAGÃO; RECH, 1997). No entanto, devido à variabilidade intrínseca do gênero *Phaseolus* em relação à exposição da região meristemática apical dos eixos embrionários, uma avaliação prévia com estereomicroscópio de outras cultivares desejáveis deve ser realizada para determinar a porcentagem da exposição da região meristemática apical.

As sementes das seguintes cultivares comerciais de soja podem ser utilizadas nesse protocolo: BR-16, BR-91, Celeste, Conquista, Doko RC, Nina, Indiana e Itaipu, fornecidas pela Embrapa Soja.

As sementes das seguintes cultivares comerciais de feijão comum podem ser utilizadas nesse protocolo: Olathe Pinto e Pontal (Carioca), fornecidas pela Embrapa Arroz e Feijão.

3 Preparação do material vegetal de algodão

3.1 Material

- Ácido sulfúrico concentrado.
- Água destilada estéril.
- Bastão de vidro.
- Bisturi (lâmina número 11).
- Capela de fluxo laminar.
- Microscópio estereoscópio.
- Sementes maduras de algodão (*Gossypium hirsutum* L.).
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) (Apêndice 4).
- Pinça.
- Placas de Petri estéreis (60 mm x 15 mm).
- Placas de Petri estéreis (150 mm x 15 mm), contendo papel filtro.

3.2 Procedimento

1. Colocar cerca de 400 sementes de algodão em um béquer de vidro, contendo ácido sulfúrico concentra-

do (3 mL/g de sementes), misturar bem com bastão de vidro durante aproximadamente 1 minuto para retirar as fibras. Transferir imediatamente as sementes para 5 L de água destilada, enxaguar três vezes e secar completamente em papel filtro.

As sementes devem ser colocadas na água. Nunca derramar água sobre as sementes tratadas com ácido.

2. Em uma capela de fluxo laminar, colocar as sementes em 300 mL de etanol 70% durante 10 minutos e, em seguida, transferi-las para 300 mL de hipoclorito de sódio 2,5% durante 30 minutos.
3. Lavar as sementes cinco vezes em água estéril.
4. Embeber as sementes durante 16 a 18 horas em água destilada, à temperatura ambiente. Colocar uma camada de, pelo menos, 8 cm de água acima das sementes.
5. Remover a água, fechar o frasco e deixar as sementes no escuro com temperatura entre 22 °C e 24 °C até que a radícula fique visível.

Este processo poderá levar de 24 a 72 horas, dependendo da cultivar e/ou qualidade das sementes.

6. Utilizar pinça e bisturi para abrir as sementes e excisar os eixos embrionários, expondo os meristemas apicais.
7. Transferir os eixos embrionários imediatamente para uma placa de Petri contendo água estéril.

3.3 Observações

As sementes devem ser produzidas em casa de vegetação e colhidas manualmente, a fim de reduzir a contaminação.

Sementes das seguintes cultivares comerciais de algodão podem ser utilizadas neste protocolo: 7MH, Antares, CD-401 e ITA 94, fornecidas pela Embrapa Algodão.

Uma película líquida na superfície da região meristemática reduz a penetração de micropartículas. Se isso acontecer, deixar as placas abertas por 5 minutos na câmara de fluxo laminar antes do bombardeamento.

4 Esterilização e precipitação de DNA sobre as micropartículas

4.1 Material

- Agitador do tipo Vortex.
- Água destilada estéril.
- CaCl_2 2,5 M (Apêndice 4).
- DNA plasmidial (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), isolado e purificado (Capítulo 2).
- Dessecador com gel de sílica.

- Espermidina 0,1 M: dissolver todo o conteúdo de um frasco (1 g) em 68,8 mL de água destilada. Esterilizar por filtração (em filtro de 0,22 μm). Distribuir alíquotas em tubos de microcentrífuga de 200 μL . Armazenar a -20°C .
- Etanol absoluto.
- Membranas carreadoras.
- Microcentrífuga.
- Micropartículas de tungstênio M10.
- Placas de Petri (150 mm x 15 mm) contendo gel de sílica.
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de glicerol 50% (v/v): misturar partes iguais de glicerol e água destilada. Esterilizar em autoclave e armazenar à temperatura ambiente.
- Suporte para membranas carreadoras.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Ultrassonicador.

4.2 Procedimento

Esterilização e lavagem das micropartículas

1. Pesar 60 mg de micropartículas de tungstênio M10, transferir para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionar 1 mL de etanol 70%. Misturar vigorosamente em agitador durante 15 minutos.

2. Centrifugar a 3.000 g durante 5 minutos.
3. Descartar o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta de 1.000 µL, com cuidado para não agitar o sedimento de micropartículas.
4. Adicionar 1 mL de água destilada estéril, misturar vigorosamente em agitador durante 15 minutos e centrifugar como na etapa 2. Descartar o sobrenadante e repetir a operação de lavagem mais duas vezes.
5. Após a última lavagem, descartar o sobrenadante e ressuspender as micropartículas em 1 mL de glicerol 50%.

Este pode ser um ponto de pausa, uma vez que as micropartículas podem ser armazenadas à temperatura ambiente por até 1 mês.

Precipitação do DNA sobre as micropartículas

6. Submeter a suspensão de micropartículas a ultrassom durante 5 minutos antes de retirar alíquotas.

Este procedimento assegura completa desagregação das micropartículas e homogeneidade adequada da suspensão.

7. Misturar vigorosamente a suspensão de micropartículas no agitador durante 30 segundos e transferir uma alíquota de 50 µL para um tubo de microcentrífuga.
8. Adicionar de 5 µL a 8 µL de DNA plasmidial (1 µg/µL) e homogeneizar o mais rápido possível com o auxílio dos dedos.
9. Imediatamente adicionar 50 µL de CaCl_2 2,5 M e homogeneizar rapidamente com o auxílio dos dedos.

10. Adicionar 20 µL de espermidina 0,1 M e homogeneizar rapidamente com o auxílio dos dedos.
11. Incubar os tubos à temperatura ambiente, sob agitação lenta em agitador, durante 10 minutos.

Para uma completa precipitação, o tempo de incubação não deve ser inferior a 10 minutos, mas, nesta fase, pode-se esperar por até 1 hora sem comprometimento da qualidade do DNA.

12. Centrifugar durante 10 segundos a 3.000 g e descartar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta de 100 µL, sem agitar o sedimento.
13. Adicionar 150 µL de etanol absoluto. Homogeneizar rapidamente. Centrifugar a 3.000 g durante 10 segundos e descartar o sobrenadante cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta de 100 µL, sem agitar o sedimento. Repetir esta etapa (13).
14. Adicionar 24 µL de etanol absoluto. Homogeneizar vigorosamente.
15. Submeter a ultrassom durante 2 a 3 segundos.
16. Distribuir alíquotas de 3,2 µL na região central de cada membrana transportadora, previamente posicionada sobre o suporte da membrana.
17. Transferir imediatamente os discos de membrana transportadora contendo micropartículas revestidas de DNA para placas de Petri contendo gel de sílica e colocar dentro de um dessecador. Aguardar por pelo menos 5 minutos para a secagem total do etanol.

Neste momento, pode-se esperar por até 3 horas à temperatura ambiente antes de usar as micropartículas revestidas de DNA no processo de bombardeamento.

4.3 Observações

O tamanho das micropartículas a serem utilizadas possui uma correlação direta com o tamanho da célula a ser transformada. Por exemplo, para transformar fungos, bactérias e protozoários, utilizam-se micropartículas M5, que possuem um diâmetro médio de 0,2 µm. Para tecidos vegetais, normalmente, utilizam-se micropartículas com diâmetro médio de 0,8 µm a 1,0 µm (M10). Para células animais, utilizam-se micropartículas de ouro com diâmetro entre 1,3 µm e 3,0 µm.

Umidade relativa do ar alta no laboratório, no momento da precipitação das micropartículas e do bombardeamento, é prejudicial à eficiência de transformação. Nesses momentos, a umidade não deve ser superior a 40%, pois poderá gerar agregação de partículas, o que danifica o tecido vegetal, reduzindo a obtenção de plantas transgênicas. Se necessário, utilizar um desumidificador para manter a umidade relativa adequada no laboratório.

Cada precipitação é suficiente para preparar seis tiros. Para 24 tiros, preparar quatro tubos de precipitação. Não modificar os volumes descritos.

A espermidina oxida facilmente. Assim, para minimizar a oxidação, a solução de espermidina deve preencher totalmente o tubo.

O fragmento de 5.718 pb contendo o gene mutado *Atahas* (GenBank AL133315, posição 35.863 a 41.580) foi clonado no sítio *Xba* I do vetor pBS SK+ (Stratagene) para gerar o vetor pAC 321 (Figura 3). Os sítios originais podem ser utilizados para a clonagem de um cassete contendo o gene de interesse. Os sítios para *Bss*HII, *Pvu*II e *Fsp*I podem ser usados para remover total, ou parcialmente, o gene de resistência à ampicilina antes do bombardeamento de partículas.

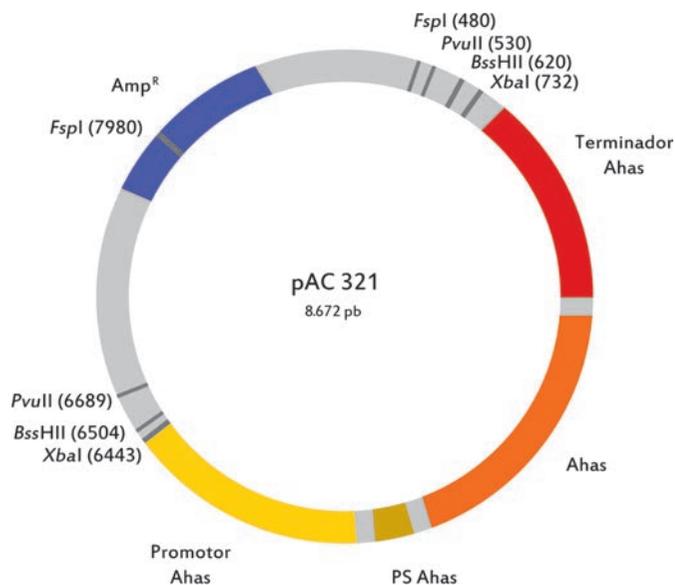


Figura 3. Mapa do vetor pAC 321, de 8.672 pares de base, utilizado na transformação genética de plantas de soja, feijão e algodão, mostrando alguns sítios das enzimas de restrição, o gene para resistência a ampicilina, promotor, sequência codificadora, peptídeo sinal (PS) e terminador do gene marcador de seleção *ahas*.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

5 Bombardeamento

5.1 Material

- Acelerador de micropartículas por hélio a alta pressão (Figura 4).
- Capela de fluxo laminar.
- Meio de bombardeamento para algodão: meio de cultura MS (Apêndice 2) com glicose 3% (p/v) e fitagel 0,8% (p/v), substituindo a sacarose e o ágar, respectivamente.
- Meio de bombardeamento para soja e feijão: meio de cultura MS (Apêndice 2) com fitagel 0,8% (p/v), substituindo o ágar.
- Membranas de ruptura.
- Papel de filtro estéril.
- Telas de retenção (aço inoxidável AISI 304, 16 malha e 18 mm de diâmetro).

5.2 Procedimento

Posicionamento dos eixos embrionários

1. Secar parcialmente os meristemas expostos dos eixos embrionários sobre a superfície de um papel de filtro estéril, imediatamente antes da etapa 2 deste item.

Este procedimento deve ser realizado sob fluxo laminar.

2. Posicionar 10 a 15 eixos embrionários sobre cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo 12 mL de meio de bombardeamento. Dispor os eixos embrionários em círculo, equidistantes de 6 mm a 12 mm do centro da placa e com a região do meristema apical voltada para cima.

O posicionamento dos eixos embrionários nas placas de bombardeamento é um fator importante para tornar os tecidos viáveis para a obtenção de alta frequência de transformação. Eles devem ser posicionados com a região meristemática apical voltada para cima, dentro do raio da distribuição de micropartículas, e fora da “zona de morte” (região central da placa, onde a onda de choque das micropartículas revestidas de DNA é mais intensa, tornando os tecidos inviáveis).

3. Realizar o bombardeamento das micropartículas.

Parâmetros básicos adotados

1. O bombardeamento de micropartículas deve ser realizado de acordo com as instruções do fabricante.
2. Condições básicas de instalação: a) a distância entre a câmara de gás de alta pressão (gerador de ondas de choque) e a membrana carreadora contendo as micropartículas revestidas de DNA deve ser de 8 mm; b) a distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção deve ser de 13 mm; c) a distância entre a tela de retenção e o material a ser bombardeado deve ser de 80 mm; d) a pressão de vácuo deve ser de 27 polegadas de Hg; e) a pressão do gás hélio deve ser de 1.200 psi.
3. Alguns reguladores de gás hélio apresentam medidor de pressão em kgf/cm^2 . Realizar a conversão de acordo com a seguinte relação: $1 \text{ kgf/cm}^2 = 14,22 \text{ psi}$.

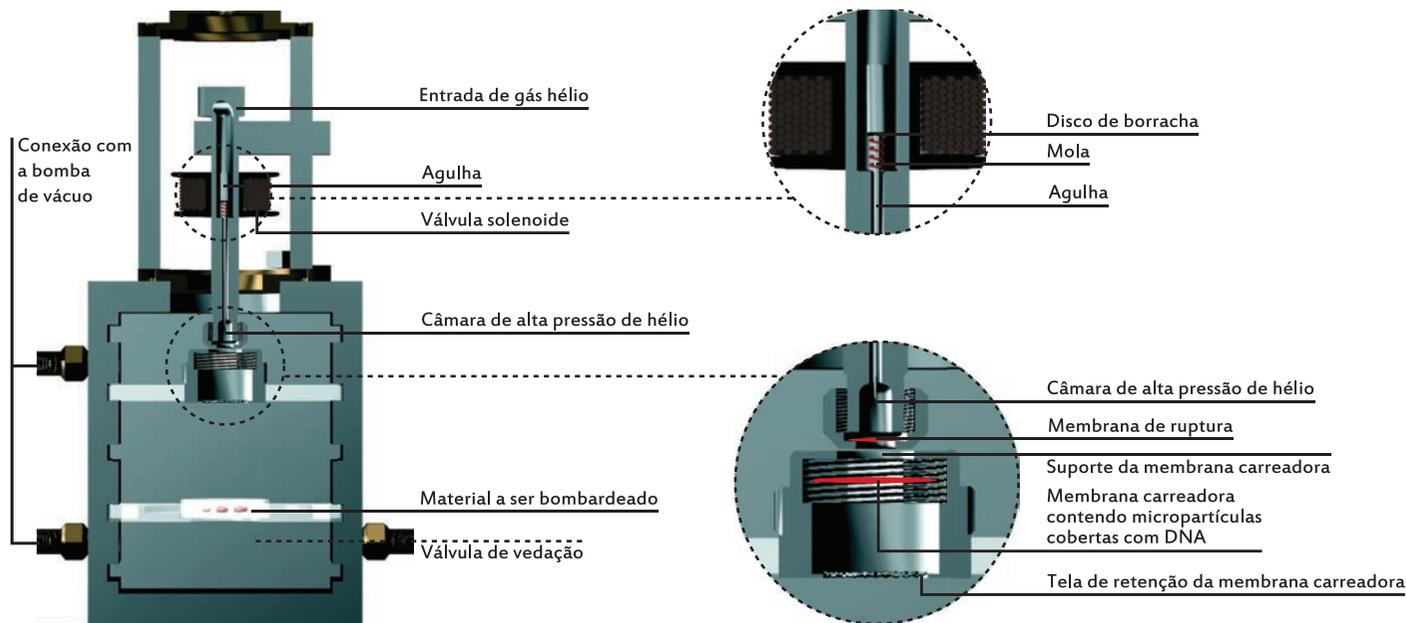


Figura 4. Esquema básico do diagrama de funcionamento do acelerador de micropartículas que utiliza hélio a alta pressão: uma câmara de alta pressão de gás hélio é pressurizada. O regulador de gás é ajustado para a pressão desejada. Para liberar a onda de choque, uma válvula solenoide elétrica é ativada, fazendo com que uma agulha seja energizada e deslocada contra as membranas de ruptura. Uma vez liberada a onda de choque, a agulha, que possui um disco de borracha em sua base, é deslocada, ocorrendo a vedação da câmara de alta pressão, permitindo uma precisa liberação do volume de gás requerido. A membrana carreadora é outra membrana de kapton que deve ser montada no suporte de membrana. A onda de choque expandida carrega a membrana carreadora, contendo as micropartículas cobertas com DNA na direção da tela de retenção. A tela retém a membrana carreadora, permitindo que as micropartículas continuem na direção do material a ser bombardeado. Esse material deve ser colocado sob condições de vácuo parcial, para reduzir a força aerodinâmica exercida sobre as micropartículas durante seu deslocamento, minimizando a desaceleração.

Fonte: adaptado de Rech e Aragão (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

Aceleração das micropartículas cobertas com DNA

1. Abrir a válvula de saída do cilindro de gás hélio e ajustar a pressão do regulador para 1.200 psi.

Ajuste do regulador de alta pressão: a) antes de abrir a válvula do cilindro de gás hélio, a chave do regulador deverá ser girada no sentido anti-horário (até o final da rosca), e a válvula de saída de gás do cilindro deverá estar fechada; b) abrir a válvula do cilindro; c) girar a chave do regulador no sentido horário até que o manômetro de saída atinja a pressão requerida.

2. Separar conjuntos de quatro membranas de ruptura (300 psi/membrana) e mantê-las imersas em isopropanol até o momento de serem utilizadas.

O isopropanol tem a finalidade de melhorar a vedação da câmara de alta pressão de gás hélio.

3. Posicionar o conjunto de membranas de ruptura na extremidade da câmara de alta pressão de gás hélio. Apertar o parafuso de vedação. Inverter a câmara de alta pressão, encaixando-a na câmara de vácuo.
4. Posicionar a placa de Petri contendo o material a ser bombardeado.
5. Posicionar a tela de retenção e o suporte da membrana carreadora, contendo as micropartículas cobertas com DNA, no cilindro de suporte. Cuidadosamente, posicionar o cilindro do suporte e fechar a câmara de vácuo.
6. Abrir a válvula de entrada de vácuo e depois a válvula de entrada do gás hélio para a câmara de alta pressão.



Nunca abrir a válvula de entrada de gás hélio para a câmara de alta pressão quando ela estiver posicionada para cima ou sem vácuo na câmara de vácuo. Em caso de problema, fechar imediatamente a válvula do cilindro de gás hélio e depois abrir a válvula de saída de gás hélio da câmara de alta pressão.

7. Quando a pressão de vácuo atingir 27 polegadas de Hg, fechar a válvula de entrada de vácuo. Aguardar por 2 a 3 segundos e liberar a onda de choque através do disparador que ativa a válvula solenoide.
8. Abrir a válvula de saída do vácuo e depois a válvula de saída do resíduo de gás hélio da câmara de alta pressão.
9. Abrir a câmara de vácuo. Retirar a placa contendo o material bombardeado e fechá-la imediatamente.
10. Descartar as membranas carreadoras, de ruptura e as telas de retenção utilizadas.
11. Repetir o procedimento, a partir da etapa 3 deste item, com as demais amostras.
12. Ao terminar, fechar a válvula de saída do cilindro de hélio e retirar o gás remanescente na mangueira. Desligar a bomba de vácuo e o disparador.
13. Transferir as placas contendo os eixos embrionários bombardeados para a câmara de crescimento (a 28 °C com 14 horas de fotoperíodo).

5.3 Observações

Geralmente, em sistemas vegetais, o nível de vácuo utilizado varia de 26 a 29 polegadas de Hg. Atualmente,

o equipamento de biobalística mais comercializado é baseado no sistema com alta pressão de hélio (SANFORD et al., 1991), com o qual podem ser obtidos resultados similares aos obtidos com o equipamento utilizado para o estabelecimento do protocolo descrito neste capítulo, que foi construído no Laboratório de Transferência de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A membrana carreadora deve possuir uma resistência suficiente para suportar a energia gerada pela onda de choque, mantendo sua integridade durante a aceleração e após a violenta desaceleração. Para isso, são utilizadas membranas de plástico de alta resistência. A membrana carreadora consiste de um disco de kapton de 24 mm (0,945 polegadas) de diâmetro (espessura: 2 mil = 50 μm). A membrana de ruptura consiste em um disco de 13,2 mm (0,52 polegada) do mesmo material.

Existem diferentes parâmetros físicos e biológicos importantes para a obtenção de plantas transgênicas, utilizando-se o sistema biobalístico. Entre os principais parâmetros físicos, podemos incluir: a) tipo e tamanho das micropartículas; b) níveis de vácuo; c) distância entre a onda de choque e a membrana carreadora; d) distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção; e) distância entre a tela de retenção e o material a ser bombardeado; f) pressão de gás hélio. Entre os principais parâmetros biológicos, podemos citar: a) o plasmídeo utilizado; b) o estágio de desenvolvimento celular do material a ser bombardeado. Todos esses parâmetros estão inter-relacionados com os níveis de penetração das

micropartículas nas células e sua sobrevivência, e consequentes níveis de expressão do transgene, devendo ser estabelecidos para cada novo material biológico.

O posicionamento dos eixos embrionários nas placas de bombardeamento é um fator importante para tornar os meristemas acessíveis, para a obtenção de alta frequência de transformação. Utilizar um estereomicroscópio e, imediatamente antes do bombardeamento, verificar o correto posicionamento dos eixos embrionários (que pode mudar depois de algum tempo no meio de cultura de bombardeamento).

6 Desenvolvimento de plantas transgênicas de soja, de feijão e de algodão

6.1 Material

- Imazapyr 1 mM: dissolver 13,17 mg de imazapyr (MW: 261,3; pureza: 99,2%) em 50 mL de água destilada estéril. Esterilizar por filtração utilizando filtro de 0,22 μm . Armazenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em alíquotas de 1 mL a 2 mL.
- Meio de cultura/seleção de soja: meio MS (Apêndice 2) contendo imazapyr 500 nM.
- Meio de cultura/seleção de feijão: meio MS.

- Meio de enraizamento de algodão: meio MS (Apêndice 2) com glicose 3% (p/v) em substituição à sacarose e contendo carvão ativado 0,1% (p/v). (Apêndice 2) BAP 44,3 μM e imazapyr 80 nM.
- Meio de indução de soja: meio MS (Apêndice 2) contendo BAP 22,2 μM .
- Meio de seleção de algodão: meio MS (Apêndice 2) com glicose 3% (p/v) em substituição à sacarose e contendo BAP 13,3 μM , imazapyr 300 nM e carvão ativado 0,1% (p/v).
- Solo adubado.
- Solução estoque de BAP (Apêndice 2).
- Vermiculita.

6.2 Procedimento

1. Somente para soja: imediatamente após o bombardeamento, transferir os eixos embrionários para placas de 10 cm de diâmetro e induzir brotações múltiplas por imersão total em 15 mL do meio de indução de soja durante 16 horas, no escuro, a 26 °C.

Para feijão e algodão, não realizar essa etapa e ir imediatamente para a etapa 2.

2. Transferir os eixos embrionários bombardeados de feijão, soja ou algodão para frascos, contendo 20 mL do meio de seleção respectivo. Manter os frascos em sala de cultura a 28 °C, com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

3. Somente para o algodão: após 30 dias, retirar as radículas necrosadas e transferir os explantes para frascos, contendo 20 mL de meio de enraizamento de algodão. Manter os frascos em sala de cultura a 28 °C, com fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Depois de aproximadamente 4 semanas em cultura, os meristemas apicais de algodão bombardeados produzem brotos alongados e raízes, que devem atingir 3 cm a 4 cm de comprimento.

Para soja e feijão, não realizar essa etapa, ir imediatamente para a etapa 4.

4. Transferir as plântulas enraizadas individualmente para potes de plástico, contendo 0,2 dm^3 de solo adubado:vermiculita (1:1).
5. Cobrir as plântulas com um saco plástico e vedar com um elástico.
6. Manter em estufa a 25 °C com fotoperíodo de 14 horas, umidade relativa do ar acima de 80% e luminosidade de 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.
7. Depois de 1 semana, remover o elástico. Após a segunda semana, também remover o saco plástico.
8. Assim que as plântulas aclimatizadas atingirem cerca de 10 cm de comprimento, transferi-las para um pote contendo 5 dm^3 de solo adubado e permitir que produzam sementes.

Sob condições de casa de vegetação e fotoperíodo de 10 a 14 horas, cada planta de soja produz cerca de 100 sementes. Como a soja é uma planta de dias curtos, é recomendável um aumento do fotoperíodo de 18 a 20 horas para induzir um forte crescimento vegetativo da planta

e, por consequência, atraso da floração. Depois de um período de até 2 meses de crescimento vegetativo com fotoperíodo de 18 a 20 horas, este deve ser ajustado para 10 a 14 horas para induzir a floração. Esse procedimento torna possível produzir até 1.000 sementes por planta.

9. Para detectar a presença dos transgenes, as plantas deverão ser analisadas por PCR (Capítulo 10), *Southern blot* (Capítulo 12) e/ou *Western blot* (Capítulo 19), entre outros métodos.

6.3 Observações

Esse protocolo explora o potencial morfogênico de eixos embrionários oriundos de sementes maduras de soja, algodão e feijão de se regenerarem em plantas férteis, utilizando-se um procedimento simples de cultura de tecidos. O processo físico da introdução de genes exógenos utilizando bombardeamento de micropartículas tem uma larga aplicação em quase todas as células vivas (SANFORD et al., 1991). Contudo, a aplicação desse protocolo é limitada à utilização de uma molécula seletiva (o imazapyr) capaz de se translocar e concentrar-se na região apical meristemática do eixo embrionário, e à disponibilidade de procedimentos de regeneração semelhantes ao descrito. Apesar da ampla e adequada utilização de outras moléculas, como higromicina, canamicina, fosfotricina e glufosinato de amônio como agentes seletivos para as células de cotilédones, calos embriogênicos e suspensão de células, essas moléculas não são adequadas para a seleção efetiva de células transgênicas de eixos embrionários após o bombardeamento de micropartículas, descrita nesse protocolo. Isso se deve ao

fato que as células meristemáticas apicais transgênicas não estão em contato com o agente seletivo no meio de cultura.

Neste protocolo, a região meristemática apical exposta do eixo embrionário, derivado das sementes maduras, é posicionada em meio de cultura adequado e submetida ao bombardeamento de micropartículas, com o vetor portando o gene *ahas* como marcador de seleção e o gene de interesse. Na cultura in vitro, a molécula herbicida imazapyr, utilizada como agente seletivo, é capaz de translocar, sistematicamente, através da radícula dos eixos embrionários de forma não letal e concentrar-se na região meristemática apical. O mecanismo de ação do imazapyr é a inibição da atividade enzimática de acetohidroxiácido sintase (AHAS), que catalisa na região meristemática apical o primeiro passo na biossíntese de três aminoácidos essenciais: isoleucina, leucina e valina (SHANER et al., 1984). Como consequência, após o bombardeamento de micropartículas, as células transgênicas na região apical dos eixos embrionários podem ser efetivamente selecionadas.

O período de indução em BAP é mais curto para a soja (24 horas). Já o algodão não enraíza em presença de BAP, precisando ser transferido para um meio sem BAP para enraizamento.

O imazapyr é foto e termolábil. É necessário certificar-se se a temperatura do meio de cultura é inferior a 55 °C antes de adicioná-lo.

7 Referências

- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C.; RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 93, n. 1, p. 142-150, 1996.
- ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Morphological factors influencing recovery of transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of a Carioca cultivar. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 158, n. 2, p. 157-163, 1997.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, n. 1, p. 1-6, 2000.
- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. D. M. C.; RECH, E. L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 1298-1302, 2002.
- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; RECH, E. L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 5, p. 1227-1233, 2005.
- BEHRENS, M. R.; MUTLU, N.; CHAKRABORTY, S.; DUMITRU, R.; JIANG, W. Z.; LAVALLEE, B. J.; HERMAN, P. L.; CLEMENTE, T. E.; WEEKS, D. P. Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. **Science**, Washington, DC, v. 316, n. 5828, p. 1185-1188, 2007.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, É. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.
- DANG, W.; WEI, Z. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. **Plant Science**, Limerick, v. 173, n. 4, p. 381-389, 2007.
- LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V. G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G. P.; BHATNAGAR, R. K.; REDDY, V. S. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, n. 7, p. 465-470, 2004.
- LIU, H. K.; YANG, C.; WEI, Z. M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 6, p. 1042-1049, 2004.
- LIU, Z.; PARK, B. J.; KANNO, A.; KAMEYA, T. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 189-197, 2005.
- MCELROY, D. Valuing the product development cycle in agricultural biotechnology-what's in a name? **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 7, p. 817-822, 2004.
- NUNES, A. S.; VIANNA, G. R.; CUNEO, F.; AMAYA-FARFÁN, J.; CAPDEVILLE, G. D.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIP1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 125-132, 2006.
- RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 51-64.
- RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.
- SANFORD, J. C.; DEVIT, M. J.; RUSSELL, J. A.; SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; ROY, M. K.; JOHNSTON, S. A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 3-16, 1991.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, Washington, DC, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.
- SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G. W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 8, p. 2888, 1990.
- SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 76, n. 2, p. 534-546, 1984.
- VIANNA, G. R.; ALBINO, M. D. M. C.; DIAS, B. B. A.; SILVA, L. M.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 371-378, 2004.
- VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max* L.). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 382-390, 2011.

Capítulo 6

Transformação de
plantas-modelo via
Agrobacterium spp.

Ana Cristina Miranda Brasileiro
Glaucia Barbosa Cabral
Maria Cristina Mattar da Silva

1 Introdução

O conhecimento das bases moleculares do mecanismo de infecção por *Agrobacterium* spp. juntamente com novas técnicas em biologia celular e molecular vegetal, permitiram o desenvolvimento de metodologias de transferência de genes exógenos para plantas, utilizando essa bactéria como vetor natural de transformação. A transferência de genes para diferentes espécies vegetais foi possível graças ao desenvolvimento de vetores derivados do plasmídeo Ti e sua introdução em linhagens desarmadas de *Agrobacterium* spp., nas quais os oncogenes foram removidos (Capítulo 3). O sistema de transformação via *Agrobacterium* spp. foi utilizado, a partir de então, para transformar grande número de plantas (CHENG et al., 2004; HERRERA-ESTRELLA et al., 2005; VASIL, 2008). A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, assim como a elevada reprodutibilidade dos protocolos de transformação e de seleção são as maiores razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium* spp.

O princípio da transformação com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp. baseia-se na seleção de uma ou mais células transformadas e na sua regeneração em planta transgênica, isto é, as células competentes em regenerar-se devem ser aquelas competentes para transformação. Assim, o método ideal de transformação via *Agrobacterium* spp. deve combinar, ao mesmo tempo, a descontaminação do tecido infectado pela bactéria, a seleção das células que foram transformadas e que expres-

sam o gene marcador e a regeneração dessas células em plantas (CURTIS, 2004, 2010; KOLE et al., 2010; PEÑA, 2005; WANG, 2006). Para tanto, vários métodos já foram descritos, correspondendo, a maioria deles, essencialmente a uma adaptação do método de cocultura de discos foliares de fumo (*Nicotiana tabacum*) (HORSCH et al., 1985).

O protocolo básico de cocultura consiste no cultivo simultâneo de determinado tipo de explante vegetal com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., contendo vetor com o(s) gene(s) a ser(em) introduzido(s) na planta (Figura 1). A escolha do explante mais adequado é decorrente da sua capacidade de regeneração *in vitro*, e poderá ter diversas origens (como discos ou fragmentos foliares, segmentos de caules ou de raízes, pecíolos, cotilédones, hipo ou epicótilos, calos embriogênicos, suspensões celulares ou embriões somáticos). É importante que um ferimento seja feito no explante antes ou durante o contato com a bactéria, pois as células feridas vão liberar moléculas-sinal que, por sua vez, vão induzir os genes de virulência de *Agrobacterium* spp. (MCCULLEN; BINNS, 2006; TZFIRA; CITOVSKY, 2006). Durante a cocultura, ocorrerá a ligação entre a bactéria e a célula vegetal no local do ferimento do explante, a indução dos genes da região *vir* e a transferência do T-DNA para o genoma da planta (Capítulos 1 e 3).

Após a cocultura, o explante é transferido para meio de cultura apropriado para a regeneração, contendo um ou mais antibióticos descontaminantes, os quais vão eliminar as células de *Agrobacterium* spp., que serão,

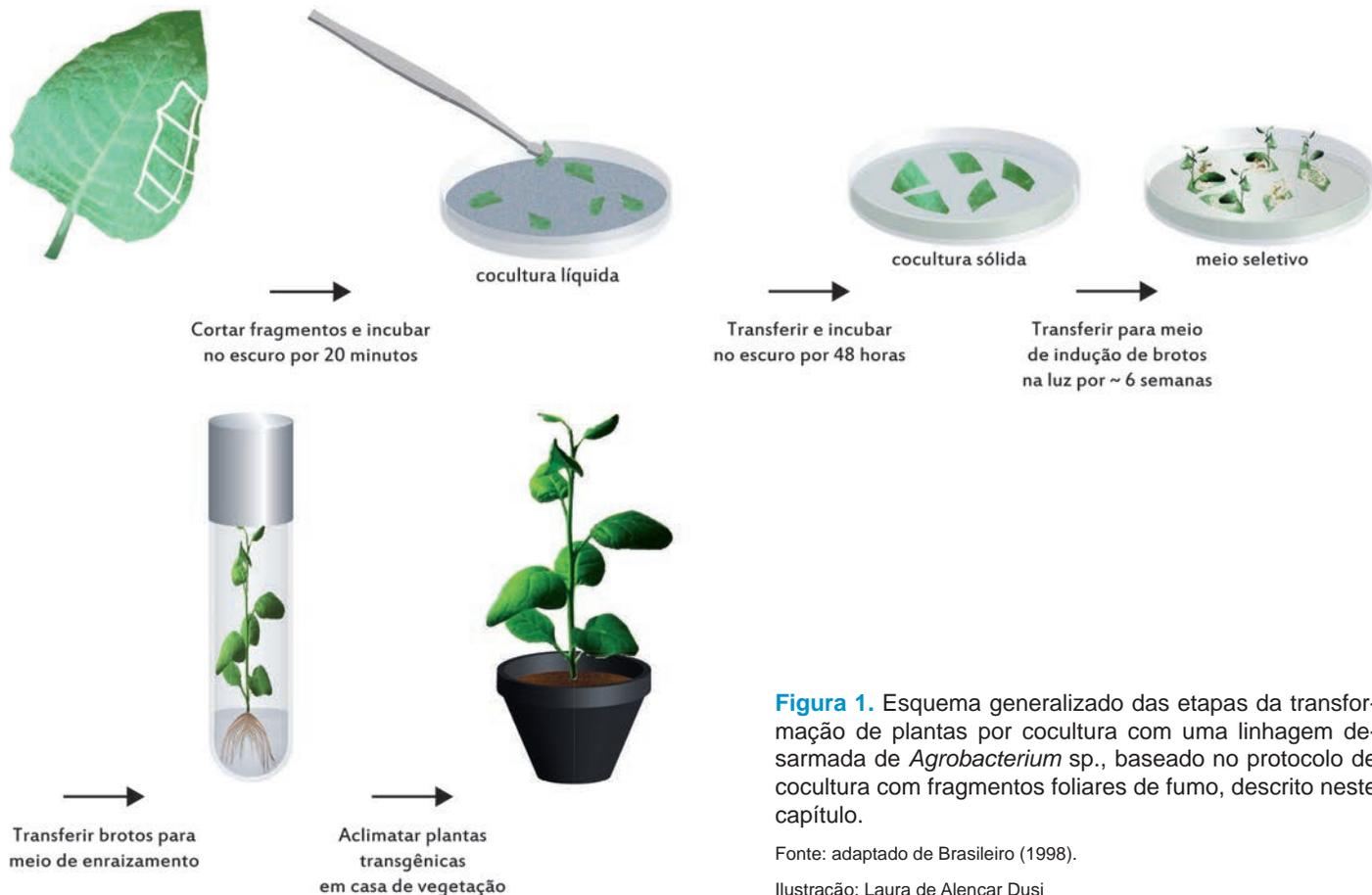


Figura 1. Esquema generalizado das etapas da transformação de plantas por cocultura com uma linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., baseado no protocolo de cocultura com fragmentos foliares de fumo, descrito neste capítulo.

Fonte: adaptado de Brasileiro (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

a partir desse momento, indesejáveis. Normalmente, adiciona-se ao meio de cultura um agente de seleção, que será responsável pela inibição do crescimento das células não transformadas. O efeito nocivo do agente de

seleção será anulado pelo produto da expressão do gene marcador de seleção (geralmente uma enzima) nas células transformadas. Assim, somente essas células serão capazes de multiplicar-se em meio seletivo.

Para evitar o aparecimento de plantas quiméricas, a transferência dos explantes cocultivados para o meio seletivo deve ser realizada o mais breve possível após a cocultura. Uma planta quimérica é formada por células distintas (transformadas e não transformadas), em virtude de uma seleção tardia ou inadequada que permitiu que células distintas dessem origem a diferentes tecidos de um único broto. O ideal é que, durante todos os estádios posteriores à cocultura, a pressão de seleção seja mantida sobre o tecido em regeneração, para que somente células transformadas sejam regeneradas. Entretanto, os sistemas de seleção não são totalmente eficientes e, assim como ocorre com o quimerismo, alguns escapes também podem ocorrer (ARAGÃO; BRASILEIRO, 2002; BRASILEIRO; ARAGÃO, 2001; MIKI; MCHUGH, 2004; SUNDAR; SAKTHIVEL, 2008). Escapes são brotos não transformados que, apesar de não expressarem o gene marcador de seleção, conseguem regenerar-se na presença do agente de seleção.

Os brotos resistentes ao agente de seleção são posteriormente isolados à medida que se regeneram, e transferidos para meio de cultura próprio para enraizamento. Uma vez enraizadas, as plântulas potencialmente transformadas são aclimatadas e transferidas para casa de vegetação. A análise molecular dessas plantas é necessária para comprovar a integração e expressão do(s) gene(s) exógeno(s) no genoma da planta e a análise da segregação para demonstrar a estabilidade da integração.

O estabelecimento de um protocolo de cocultura para determinada espécie vegetal, ou genótipo, exige o estudo de diferentes parâmetros que podem afetar, direta ou indiretamente, a eficiência do sistema de transformação via *Agrobacterium* spp. (CHENG et al., 2004; CURTIS, 2010; KARAMI et al., 2009; KIM et al., 2009; OGAWA; MII, 2005; OPABODE, 2006). Esse estudo deve ser realizado por etapas, a saber:

1. Estabelecer um método eficiente de regeneração para um ou mais tipos de explantes da espécie (ou genótipo) estudada.
2. Definir as condições de cultura mais favoráveis ao crescimento da planta doadora, de maneira que o estado fisiológico dos explantes no momento da cocultura seja o mais adequado à transformação e à regeneração.
3. Avaliar a melhor combinação “genótipo *versus* linhagem de *Agrobacterium* sp.”. Existem muitas opções de linhagens desarmadas de *Agrobacterium* spp., contendo diferentes tipos de plasmídios Ti desarmados, em diferentes contextos cromossômicos (Capítulo 3).
4. Definir as condições de crescimento, o estado fisiológico e a concentração da cultura de *Agrobacterium* sp., de maneira que a bactéria seja a mais infectante possível para o explante durante a cocultura.
5. Estabelecer as melhores condições de cocultura para que a transformação das células do explante seja a mais eficiente possível, sem que isso afete sua capacidade regenerativa. Condições básicas a serem

testadas são: tempo e temperatura de cocultura, pH, composição dos meios de cultura, presença de indutores (moléculas-sinal), tipo e estado fisiológico do explante, entre outras. Durante a cocultura, pelo menos três requerimentos básicos são necessários para que ocorra a indução de genes da região *vir*: pH entre 5 e 6, temperatura entre 22 °C e 28 °C e presença de uma fonte de carbono (GELVIN, 2009; WANG, 2006). Essas condições são encontradas na maioria dos protocolos de regeneração. O estabelecimento dessas condições de cocultura pode ser otimizado pelo uso de genes repórteres, sendo *gus* e *gfp* os mais comumente utilizados (Capítulo 8). No caso do gene *gus*, devem-se utilizar construções que contenham, dentro da sua sequência codificadora, um íntron que impede sua transcrição dentro do sistema procarioto de *Agrobacterium spp.*, evitando, assim, a detecção de falsos positivos (VANCANNEYT et al., 1990).

6. Determinar a dose e o tipo do antibiótico descontaminante e o tempo de exposição do explante a esse antibiótico, de maneira a impedir o crescimento de *Agrobacterium sp.* após a cocultura, sem interferir, ao mesmo tempo, no potencial regenerativo do explante. A cefotaxima e a carbenicilina são os antibióticos mais utilizados para tal fim, entretanto, outros antibióticos também podem ser muito eficazes, como vancomicina, augmentina, ticarcilina (sozinho ou em combinação com ácido clavulânico) e ampicilina. A utilização desses agentes deve ser precedida por testes de tolerância da planta.

7. Determinar a dose letal mínima do agente de seleção e o melhor tempo de exposição do explante a essa dose, de maneira que o maior número de brotos transgênicos seja selecionado. O agente de seleção é, geralmente, um antibiótico (como canamicina e higromicina) ou um herbicida (por exemplo, glifosato e fosfinotricina). Para a determinação da dose letal mínima do agente de seleção, uma curva de sobrevivência do explante a ser utilizado para a cocultura deve ser estabelecida em relação a diferentes concentrações do agente.

A primeira planta transgênica obtida pelo sistema *Agrobacterium spp.* foi o fumo (DE BLOCK et al., 1984; HORSCH et al., 1984), modelo para a transformação de espécies dicotiledôneas de ciclo curto graças à sua alta eficiência, tanto de regeneração como de transformação, e à simplicidade do seu protocolo. O protocolo de cocultura com fragmentos foliares de fumo então descrito foi adaptado, com pequenas modificações, para outros tipos de explantes de uma enorme gama de espécies vegetais. O refinamento desse protocolo básico permitiu também o estabelecimento com sucesso de protocolos de transformação para espécies até então consideradas recalcitrantes à transformação por *Agrobacterium spp.* (HERRERA-ESTRELLA et al., 2005; TZFIRA; CITOVSKY, 2006).

Acreditava-se, inicialmente, que as espécies monocotiledôneas não pudessem ser transformadas via *Agrobacterium spp.*, por não fazerem parte de sua gama natural de hospedeiros. Desde o primeiro sucesso da transfor-

mação de arroz (*Oryza sativa*), mediada por *Agrobacterium* spp. no início da década de 1990 (HIEI et al., 1994), avanços significativos na transformação de espécies de monocotiledôneas por *Agrobacterium* spp. foram alcançados (SHRAWAT; LÖRZ, 2006; SOOD et al., 2011). A princípio, plantas transgênicas de cereais como milho, trigo e cevada foram obtidas (CHENG et al., 1997; ISHIDA et al., 1996; TINGAY et al., 1997), seguidas de gramíneas forrageiras (SOMLEVA et al., 2002) e monocotiledôneas ornamentais (SUZUKI; NAKANO, 2002; SUZUKI et al., 2001). O arroz tornou-se um modelo para transformação de monocotiledôneas, pois apresenta genoma pequeno (430 Mbp), sistema eficiente e em larga escala de transformação genética, mapas genéticos saturados e mapas físicos com alta cobertura, grande coleção de dados de transcrito disponível, quatro genomas completamente sequenciados e disponíveis publicamente e grande colinearidade do seu genoma com os das outras gramíneas (HIRANO et al., 2008; UPADHYAYA, 2007). A transformação de unidades embriogênicas de arroz (HIEI et al., 1994), com modificações de Sallaud et al. (2003), será aqui descrita para ilustrar um protocolo básico de cocultura para espécies de monocotiledôneas.

Em paralelo, métodos alternativos de transformação pelo sistema *Agrobacterium* spp. foram desenvolvidos para a planta-modelo *Arabidopsis thaliana*. Esses métodos, denominados in planta, foram inicialmente baseados na transformação de plântulas em germinação (FELDMANN; MARKS, 1987), ou de plantas em começo de floração, submetidas a vácuo (BECHTOLD et al., 1993), em contato com culturas de *Agrobacterium* spp. em altas concentrações,

com o objetivo de introduzir a bactéria nos espaços intercelulares do tecido da planta. Clough e Bent (1998) descreveram posteriormente um método simplificado, consistindo basicamente na imersão das inflorescências (partes aéreas) da planta dentro da cultura de *Agrobacterium* sp. por alguns segundos, sem necessidade de vácuo. Na transformação in planta, o transgene é introduzido via *Agrobacterium* sp. em botões florais da planta intacta e as sementes derivadas são posteriormente selecionadas na presença do agente seletivo. A transformação in planta é de grande interesse para espécies vegetais recalcitrantes, pois não necessita das etapas in vitro de cultura de tecidos e regeneração para obtenção de uma planta transformada. Além de *A. thaliana*, a transformação in planta vem sendo utilizada em *Brassica campestris* subsp. *chimensis*, *Medicago truncatula* e *M. sativa* (QING et al., 2000; TRIEU et al., 2000; WEEKS et al., 2008).

O número significativo de sementes transgênicas obtidas e a simplicidade de manipulação fazem da transformação in planta uma alternativa atraente para validação e estudo da função biológica de genes. O protocolo adaptado do método de transformação por imersão floral (*floral dip*) (CLOUGH; BENT, 1998), utilizando a planta-modelo *A. thaliana*, será descrito neste capítulo.

No presente capítulo, três protocolos de transformação de plantas-modelo são apresentados e discutidos: a) cocultura com explantes organogênicos de fumo, planta-modelo para transformação de dicotiledôneas; b) cocultura com unidades embriogênicas de arroz,

planta-modelo para transformação de monocotiledôneas; c) transformação de *A. thaliana* por imersão de botões florais, sistema-modelo para transformação in planta. Esses protocolos podem ser adaptados para as demais espécies vegetais.

2 Cocultura de discos foliares de fumo

2.1 Material

- Água destilada, esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Capela de fluxo laminar.
- Espectrofotômetro para leitura de absorbância a 600 nm.
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital.
- Lâminas para bisturi e alça de platina.
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., contendo, em seu vetor, os transgenes de interesse (Capítulo 3).
- Meio de crescimento de bactéria LB (Apêndice 1).
- Meio de cultura para plantas MS (Apêndice 2).
- Microcentrífuga.
- Mistura solo:vermiculita (1:1), esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Papel de filtro, esterilizado por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Recipientes de polipropileno transparente ou vidro, próprios para cultura de tecidos (tipo *babyfood*).
- Sementes de fumo (*N. tabacum*), cultivar Xanthi, Petit Havana SR1, Havana 425, Samson ou W38.
- Solo adubado com superfosfato simples e matéria orgânica.
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% (v/v).
- Solução-estoque de BAP (10 mg/mL) (Apêndice 2).
- Soluções-estoque de cefotaxima e dos agentes seletivos apropriados (Apêndice 3).
- Tubos para microcentrífugas de 1,5 mL.

2.2 Procedimento

Desinfestação e micropropagação de plantas de fumo

1. Desinfestar a superfície das sementes de fumo em solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 20 minutos.

O tempo de desinfestação no hipoclorito de sódio depende da espécie vegetal, variando entre 10 e 30 minutos. Se as sementes possuírem casca muito irregular, cerosa ou pilosa, é aconselhável realizar pré-lavagem em etanol 70% durante 1 minuto, antes da esterilização, para quebrar a tensão superficial.

2. Lavar as sementes cinco vezes em água esterilizada, para retirar o hipoclorito residual.

Para sementes muito pequenas, como no caso do fumo, é aconselhável utilizar peneira esterilizada para amparar as sementes durante as lavagens.

3. Inocular as sementes sobre meio MS sólido em placas de Petri. Incubar as placas em uma sala de cultura com um fotoperíodo de 16 horas, a uma temperatura de 25 ± 2 °C.
4. Quando a plântula atingir aproximadamente 1 cm, transferi-la para um frasco, contendo meio MS sólido. Incubar as plântulas nas mesmas condições descritas nas etapas anteriores deste item.
5. Quando a plântula atingir aproximadamente 7 cm, cortar o caule em segmentos nodais, cada um contendo de uma a três gemas axilares. Eliminar as folhas dos segmentos e transferi-los para novos frascos contendo meio MS sólido. Incubar os segmentos nas mesmas condições descritas na etapa 4 deste item.
6. Subcultivar as plântulas por micropropagação a cada 3 meses. Utilizar, para a cocultura, plântulas micropropagadas com cerca de 5 cm, com quatro a cinco folhas totalmente expandidas e com sistema radicular desenvolvido.

Plântulas micropropagadas são a fonte ideal de explantes (fragmentos foliares) para cocultura com *Agrobacterium* spp., por se tratarem de material sem contaminações e geneticamente idêntico (clone), eliminando, assim, o “efeito genótipo”.

Infecção dos fragmentos foliares

7. Cultivar a linhagem de *Agrobacterium* sp. a ser utilizada na cocultura em meio de crescimento sólido LB, contendo os antibióticos apropriados, durante 48 horas, entre 25 °C e 28 °C.

As linhagens de *Agrobacterium* spp. podem também crescer em outros meios como MYA, YMB e YEB (Apêndice 1). Para mais detalhes sobre o cultivo de *Agrobacterium* spp., ver Capítulo 1.

As linhagens desarmadas de *Agrobacterium* spp. mais comumente utilizadas para cocultura de fumo são LBA4404, GV3101 e EHA101 (Capítulo 3).

8. Com a ajuda de uma alça de platina, inocular de duas a quatro colônias isoladas (recém-crescidas em meio sólido) em 10 mL de meio LB líquido.

Alternativamente, pode-se partir de uma suspensão bacteriana recém-crescida em meio líquido e diluí-la na proporção adequada, em meio líquido novo (por exemplo, 50 µL de suspensão em 10 mL de meio).

9. Cultivar as bactérias em um agitador do tipo orbital, durante aproximadamente 16 horas, a uma frequência de agitação entre 180 rpm e 200 rpm e temperatura de 28 °C, até a cultura atingir a fase exponencial de crescimento.

O tempo de crescimento de *Agrobacterium* spp. varia conforme a linhagem, dependendo também do meio de cultura, da temperatura e da aeração durante o cultivo (Capítulo 1).

A fase exponencial de crescimento das agrobactérias pode durar de 4 a 8 horas, durante a qual o tempo de geração varia de 70 a 90 minutos (WISE et al., 2006).

10. Determinar a absorvância a 600 nm (A_{600}) da suspensão bacteriana por leitura em espectrofotômetro. A cultura deve estar em fase exponencial de crescimento, ou seja, A_{600} entre 0,7 e 1,0.

Generalizando, pode-se considerar que, para *Agrobacterium* spp., $A_{600} = 1,0$ equivale a 5×10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (LIN et al., 1994).

11. Retirar as folhas das plantas de fumo micropropagadas in vitro (5 a 6 semanas de idade), tomando cuidado para não danificá-las.

Plantas de fumo cultivadas em casa de vegetação também podem ser utilizadas como fonte de explantes. Nesse caso, utilizar folhas jovens, totalmente expandidas, de plantas com aproximadamente 3 meses de idade e mantidas em casa de vegetação sob condições parcialmente controladas de temperatura (20 °C a 30 °C) e umidade (~ 70%). Desinfestar as folhas com hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 30 minutos e lavar abundantemente, pelo menos cinco vezes, com água destilada estéril.

12. Cortar a folha em quadrados de, aproximadamente, 0,5 cm² a 1,0 cm², sobre papel de filtro embebido em água ou meio MS líquido.

Os fragmentos foliares também podem ser cortados em forma de discos (1 cm de diâmetro) ou de tira. Entretanto, a obtenção dessas formas exige manipulações adicionais que podem aumentar as chances de contaminação ou de estresse dos explantes. A eficiência de transformação dessas diferentes formas é a mesma.

No caso de utilizar folhas desinfestadas, provenientes de plantas crescidas em casa de vegetação, evitar a utilização de áreas da folha que apresentem nervuras primárias e secundárias ou que estejam cloróticas, necrosadas, com coloração verde-escura ou com aparência encharcada.

13. Transferir imediatamente os fragmentos foliares cortados para 10 mL de meio MS líquido em uma placa

de Petri. Quando todos os explantes estiverem cortados, transferi-los do meio MS líquido para uma placa de Petri contendo 10 mL da suspensão bacteriana em meio LB (etapa 10 deste item). Certificar-se de que os explantes estão imersos na suspensão.

Utilizar, no mínimo, oito placas por tratamento ou construção testada, contendo dez explantes cada uma.

14. Selar as placas com filme de PVC. Incubar a cocultura no escuro, durante 20 minutos, a uma temperatura de 25 ± 2 °C.

15. Após a cocultura, transferir os explantes com auxílio da pinça, secando-os rapidamente em papel de filtro estéril, para eliminar o excesso de bactérias, e depositá-los em placa de Petri contendo meio MS sólido adicionado de BAP (1 mg/L). Colocar, aproximadamente, 10 explantes por placa e selar as placas com filme de PVC e incubar no escuro, durante 48 horas.

A maioria dos protocolos de cocultura de fumo considera que a face da folha (abaxial ou adaxial), que está em contato com o meio, não tem influência na taxa de regeneração de brotos. Entretanto, alguns protocolos consideram que a face abaxial em contato com o meio conduz a uma regeneração mais eficiente (CURTIS, 2010).

16. Após esse período, transferir os explantes para placas de Petri contendo meio MS sólido adicionado de BAP (1 mg/L) (para indução de brotos), cefotaxima (500 mg/L) (para evitar o crescimento das bactérias remanescentes) e o agente de seleção apropriado (para selecionar as células transformadas). Colocar,

aproximadamente, dez explantes por placa, com a face abaxial da folha em contato com o meio.

No controle positivo, colocar os explantes em meio MS contendo BAP e cefotaxima, mas sem o agente de seleção. Esse controle servirá para monitorar o sistema de regeneração de brotos sem o efeito do agente de seleção.

Para um segundo controle positivo, realizar uma cocultura sem bactéria e, depois, transferir os explantes para meio MS contendo somente BAP. Esse controle servirá para monitorar o sistema de regeneração de brotos sem o efeito da bactéria.

No controle negativo, realizar uma cocultura sem bactéria e, depois, transferir os explantes para meio MS contendo BAP, cefotaxima e o agente de seleção. Esse controle servirá para monitorar a eficiência do agente de seleção, isto é, nenhum explante deverá regenerar-se nessas condições.

Neste protocolo, utilizam-se geralmente as seguintes dosagens de agentes seletivos: canamicina (100 mg/L a 300 mg/L), higromicina (30 mg/L a 50 mg/L) ou fosfotricina (1 mg/L a 15 mg/L).

17. Selar as placas com filme de PVC e incubá-las em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 25 ± 2 °C.

Obtenção de brotos transgênicos

18. Após 2 semanas de incubação, cortar os fragmentos foliares para separar os pequenos calos formados. Transferir os fragmentos e os calos para meio MS novo, contendo BAP (1 mg/L), cefotaxima (250 mg/L) e o agente de seleção apropriado. Incubar as placas nas mesmas condições descritas nas etapas anteriores deste item.

Nesta etapa, os fragmentos foliares estão muito expandidos e, em alguns casos, soltando-se do meio, daí a necessidade de cortá-los. Ao inocular os fragmentos e os calos no meio novo, pressioná-los contra o meio para que eles se fixem, garantindo um maior contato entre o tecido vegetal e o meio de cultura.

19. Identificar os brotos (maiores de 0,7 cm) que forem surgindo a partir dos calos resistentes. Excisar esses brotos na base, procurando excluir tecidos do calo. Transferi-los individualmente para frascos contendo meio MS sólido para enraizamento, acrescido de cefotaxima (250 mg/L) e do agente de seleção apropriado (Figura 2).

Os primeiros brotos, resistentes ao agente de seleção, começam a aparecer com 3 a 4 semanas após a cocultura. Esses brotos surgem geralmente dos calos formados na margem do fragmento, ou de áreas internas feridas durante as manipulações (Figura 2).

É aconselhável escolher somente um broto por calo resistente, evitando, assim, trabalhar com brotos originários de uma mesma célula transformada, ou seja, do mesmo evento de transformação.

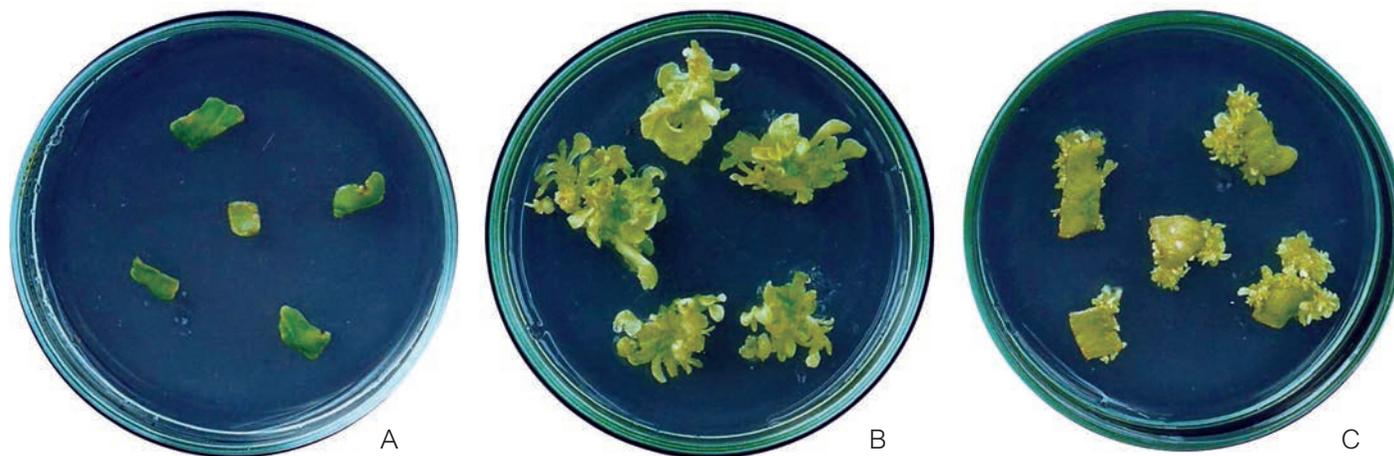
Nesta etapa, todos os explantes do controle positivo devem estar em processo de regeneração, enquanto, no controle negativo, todos os explantes devem estar cloróticos (Figura 2).

20. Manter os brotos no meio seletivo até o desenvolvimento completo das raízes.

Raízes não transgênicas são geralmente muito sensíveis aos diferentes agentes de seleção. Assim, somente os brotos que conseguirem enraizar em meio seletivo podem ser considerados potencialmente transgênicos. Brotos transgênicos representam aproximadamente 75% do número total de brotos retirados dos calos resistentes à canamicina (GALLOIS; MARINHO, 1995). É importante lembrar que a expressão do gene marcador de seleção em qualquer tecido da planta é dependente das suas sequências regulatórias (LEPLÉ et al., 1992).

21. Avaliar a eficiência de transformação, considerando o número total de brotos enraizados em meio seletivo em relação ao número total de explantes cocultivados.

22. Subcultivar, por micropropagação (como descrito na etapa 5 do item 2.2 Procedimento), cada plântula



Fotos: Laura Dusi

Figura 2. Fragmentos foliares de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) em meio MS, 1 mês após a cocultura: A) fragmentos foliares que foram cultivados sem a presença de *Agrobacterium* sp. e, depois, transferidos para meio seletivo (controle negativo); B) brotos não transgênicos se regenerando a partir de fragmentos foliares que foram cultivados sem a presença de *Agrobacterium* sp. e, depois, transferidos para meio não seletivo (controle positivo); C) brotos potencialmente transgênicos se regenerando a partir de fragmentos foliares que foram cocultivados com *Agrobacterium* sp. e, depois, transferidos para meio seletivo.

potencialmente transgênica, mantendo assim uma ou mais cópias (clones) in vitro.

Essa precaução adicional é importante no caso de a planta morrer durante o processo de aclimação, que, em algumas espécies vegetais, é uma etapa muito delicada (DRAPER et al., 1988).

É aconselhável manter o agente descontaminante (cefotaxima a 100 mg/L) durante os subcultivos, para evitar a contaminação por agrobactérias residuais. Porém, não é mais necessário manter o agente de seleção.

23. Retirar delicadamente as plântulas enraizadas (entre 5 cm e 8 cm de altura) do frasco e remover o excesso de meio de cultura. Transferir as plântulas para copos de plástico (de aproximadamente 8 cm de altura)

contendo a mistura solo:vermiculita estéril. Cobrir a parte aérea da plântula com um saco plástico, para evitar seu ressecamento.

É muito importante retirar todos os vestígios de meio de cultura das raízes, pois ele poderá servir como meio nutritivo para bactérias e fungos do solo, que estarão em contato com as raízes durante a aclimação.

No caso de vetores contendo o gene repórter *gus* ou *gfp*, para confirmar o estado transgênico das plântulas enraizadas na presença do agente de seleção, pode-se retirar um ou mais fragmentos das folhas e raízes dessas plântulas, no momento de transferi-las para os copos, e realizar testes para detectar a atividade enzimática dos genes repórteres (Capítulo 8).

Em paralelo, fragmentos das folhas e raízes dessas plântulas podem também ser utilizados para confirmar a presença dos transgenes pela técnica de PCR (Capítulos 9 e 10).

24. Manter as plantas em casa de vegetação sob condições parcialmente controladas de temperatura (20 °C a 30 °C) e umidade (~70%). Após 1 semana, retirar o plástico da parte aérea e transferir a planta inteira para um saco contendo solo adubado. Deixar a planta desenvolver-se normalmente na casa de vegetação.

As plantas cultivadas *in vitro* estão adaptadas à umidade alta do interior dos frascos. A transferência para o ambiente mais seco da casa de vegetação pode ser fatal. Por isso, durante os primeiros dias de aclimação, a proteção da parte aérea da planta com um saco plástico é fundamental para manter a umidade alta, que deve ser reduzida progressivamente. Durante esse período, a planta irá desenvolver uma cutícula para controlar as perdas de água.

25. Quando a planta atingir aproximadamente 30 cm de altura, retirar algumas folhas para realizar as devidas análises moleculares, visando confirmar a presença e integração do T-DNA no genoma da planta (Capítulos 9 a 12). Para a análise genética da descendência, proceder como descrito no Capítulo 4.

Quando as plantas começarem a florescer, cobrir as flores com sacos de papel pardo. Aguardar a maturação das sementes e coletá-las quando estiverem secas. As sementes podem ser estocadas em um ambiente fechado, frio e seco, conservando sua viabilidade durante muitos anos.

2.3 Observações

Para a indução de genes da região *vir* durante a cocultura, é importante a presença de compostos fenólicos,

tais como acetosiringona, α -hidroxiaacetosiringona, ácido sinápico ou ácido cafeico, que são naturalmente produzidos como defesa da planta no momento da infecção pela bactéria e são indutores (moléculas-sinal) do sistema de virulência de *Agrobacterium* spp. (MCCULLEN; BINNS, 2006). Tecidos ou células lesadas de algumas espécies como fumo produzem, aparentemente, quantidades suficientes dessas moléculas-sinal, garantindo a indução da região *vir* e a transferência do T-DNA. Entretanto, em outras espécies, observou-se que a virulência pode ser aumentada pela adição de acetosiringona, ou outro composto fenólico, ao meio de crescimento da bactéria e/ou ao meio de cultura da planta durante a cocultura (PITZSCHKE; HIRT, 2010).

Para uma máxima eficiência de transformação por *Agrobacterium* spp., é importante que as células do hospedeiro estejam num estado mínimo de estresse. Demonstrou-se que outras moléculas-sinal, liberadas pela planta como defesa ao ataque de *Agrobacterium* spp., como ácido salicílico, etileno, ácido jasmônico, ácido butírico e auxina (ácido indol-3-acético), podem inibir a expressão dos genes *vir*, principalmente nos estágios finais da formação do tumor (6 dias após a infecção) (GELVIN, 2009; LEE et al., 2009). Assim, a concentração da bactéria durante a cocultura e o tempo de cocultura são parâmetros críticos na transformação de diferentes espécies vegetais. Na presença de altas concentrações de bactéria, determinadas espécies vegetais, ou tipos de explantes, podem apresentar reações de hipersensibilidade a *Agrobacterium* spp. Na presença de uma baixa concentração, somente um número restrito de células pode ser transformado. Um tempo prolongado

de contato entre a bactéria e o explante pode ter efeitos distintos, dependendo da espécie vegetal. Geralmente, um período de 2 a 4 dias é suficiente. Períodos superiores a 5 dias podem dificultar a descontaminação dos explantes e causar sérios danos à célula vegetal. Entretanto, para algumas espécies, 7 dias de cocultura podem ser o ideal (CURTIS et al., 1995).

Agrobacterium spp. também têm sido amplamente utilizadas para estudos de expressão transiente em plantas intactas por meio de agroinfiltração (ou agroinoculação ou agroinfecção) (KAPILA et al., 1997). Essa estratégia simples e eficiente consiste na infiltração, com uma seringa, em folhas de planta inteira, de uma cultura de *Agrobacterium* sp. desarmada, contendo em seu vetor os genes em estudo, resultando na transformação de algumas ou todas as células na zona infiltrada. A agroinfiltração tem sido amplamente utilizada para: a) estudos de biologia viral utilizando *Agrobacterium* spp. como veículo para infecção sistêmica de vírus em plantas; b) estudo de silenciamento gênico em plantas pela estratégia VIGS (Capítulo 7); c) análise da interação agrobactéria/hospedeiro, utilizando o vírus como um marcador para a transferência do T-DNA ou na produção de proteínas recombinantes em plantas (como anticorpos ou vacinas) (DE MUYNCK et al., 2010; VAGHCHHIPAWALA et al., 2011).

Plantas transgênicas obtidas após a cocultura devem ser morfológicamente idênticas às plantas não transgênicas. Alterações fenotípicas não desejáveis podem ocorrer em virtude de variações somaclonais

decorrentes de um longo processo de cultura in vitro ou, raramente, por mutação insercional do T-DNA (JIN et al., 2008). Entretanto, dependendo do objetivo do estudo, por exemplo, a análise de função gênica por silenciamento ou superexpressão, alterações fenotípicas decorrentes da expressão do transgene são esperadas e desejáveis.

3 Cocultura de unidades embriogênicas de arroz

3.1 Material

- Agitador do tipo Vortex.
- Água destilada, esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Capela de fluxo laminar.
- Espectrofotômetro para leitura de absorbância a 600 nm.
- Filme plástico de parafina.
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital.
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., contendo em seu vetor os transgenes de interesse (Capítulo 3).
- Meio de cultura LB e AB para crescimento de agrobactéria (Apêndice 1).
- Meios de cultura de plantas básicos: NB, R2 e MS (Apêndice 2).

- Meios de cultura para embriogênese somática de arroz:

Meio	Componente (Apêndice 2)	Concentração final
Meio de indução NB	Meio de cultura básico NB	1X
	2,4-D	2,5 mg/L
	BAP	0,2 mg/L
Meio R2CC	Meio de cultura básico R2	1X
	Acetoseringona	200 µM
	2,4-D	2,5 mg/L
	BAP	0,2 mg/L
Meio NBS	Meio de cultura básico NB	1X
	Agarose tipo I (em substituição ao fitagel)	0,7% (p/v)
	2,4-D	2,5 mg/L
	BAP	0,2 mg/L
Meio pré-RN	Meio de cultura básico NB	1X
	Agarose tipo I (em substituição ao fitagel)	0,7% (p/v)
	ABA	5 mg/L
	BAP	2 mg/L
	ANA	1 mg/L
Meio RN	Meio de cultura básico NB	1X
	Fitagel	0,45% (p/v)
	BAP	3 mg/L
	ANA	0,5 mg/L

- Mistura solo:vermiculita (1:1), esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Papel de filtro em placas de Petri, esterilizado por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Papel de filtro, em retângulos de aproximadamente 30 cm x 20 cm, protegidos com papel pardo ou de alumínio, esterilizado por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Pinças, alça de platina e alça de Drigalsky.
- Placas de Petri de 100 mm x 20mm e 100 mm x 15 mm.
- Polissorbato 20.
- Sementes de arroz (*Oryza sativa*), cv. Nipponbare.
- Sistema de filtração (filtro e frasco) de 150 mL, graduado e estéril, com membrana com 50 mm de diâmetro e com poros de 0,2 µm.
- Solução de acetosiringona 100 mM (Apêndice 4).
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de glicerol 50% (v/v), esterilizada por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5% (v/v).
- Soluções-estoque dos antibióticos cefotaxima e timentina e dos agentes seletivos apropriados (Apêndice 3).
- Soluções-estoque de 2,4-D, ABA, BAP e ANA (1 mg/mL) (Apêndice 1).

- Tubos cônicos para centrífuga com tampa rosqueável de 50 mL, esterilizados por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL.

3.2 Procedimento

Indução de calos embriogênicos a partir de sementes maduras

1. Descascar sementes maduras de arroz manualmente, com o auxílio de uma pinça, ou utilizando descascador de sementes. Selecionar as sementes bem formadas e sem manchas no endosperma ou embrião para evitar contaminações. Usar 100 sementes para cada construção gênica.

Este protocolo é eficiente para a cultivar Nipponbare e várias outras variedades da subespécie japônica.

2. Desinfestar as sementes descascadas e selecionadas em béquer contendo etanol 70% por 5 minutos, seguido por hipoclorito de sódio 5%, com duas gotas de polissorbato 20, por 30 minutos. Durante esse tempo, misturar as sementes na solução, agitando manualmente o béquer por repetidas vezes.
3. Lavar as sementes abundantemente com água destilada por seis vezes. Secá-las bem em papel filtro.
4. Inocular as sementes sobre meio de indução NB em placas de Petri de 100 mm x 20 mm, colocando de 10 a 12 sementes por placa. Deixar as placas abertas

no fluxo por 15 minutos para retirar qualquer excesso de umidade do meio ou condensação. Selar as placas com filme plástico de parafina e incubá-las no escuro a 27 °C, durante 3 a 4 semanas.

É determinante que não haja condensação nas placas no momento de semear, sendo recomendável verter o meio de indução NB nas placas de Petri 1 ou 2 dias antes de inocular as sementes, para reduzir contaminações.

As sementes de arroz devem ser posicionadas no meio preferencialmente com a região do embrião voltada para cima e com leve pressão para que elas não se soltem do meio em razão do crescimento dos calos e/ou germinação do embrião. Caso as sementes se soltem do meio, haverá germinação do embrião e/ou proliferação de raízes em vez de calos embriogênicos.

A qualidade da indução do calo primário e a liberação das unidades embriogênicas dependem da qualidade do lote de sementes, sendo aconselhável realizar um teste de germinação antes de induzir os calos para verificar as condições das sementes.

Seleção e multiplicação de unidades embriogênicas

5. Após 3 semanas, quando os primeiros calos primários (de 0,5 cm a 1 cm de diâmetro) forem observados, bater levemente cada placa na palma da mão até que todos os calos soltem. Dessa forma, será possível liberar e identificar as pequenas unidades embriogênicas (UEs) individualizadas na superfície do meio. Transferir as UEs (de 0,5 mm a 1 mm de diâmetro) para novo meio de indução NB em placas de Petri de 100 mm x 15 mm, colocando de 30 a 50 unidades por placa (Figura 3).

Decorrido o período de indução em meio de indução NB, é possível observar, na região escutelar do embrião zigótico, a formação de calo primário compacto de 0,5 cm a 1 cm de diâmetro, podendo haver também formação de calos com aspecto aquoso na região mais apical do embrião da semente em germinação. A partir de alguns calos

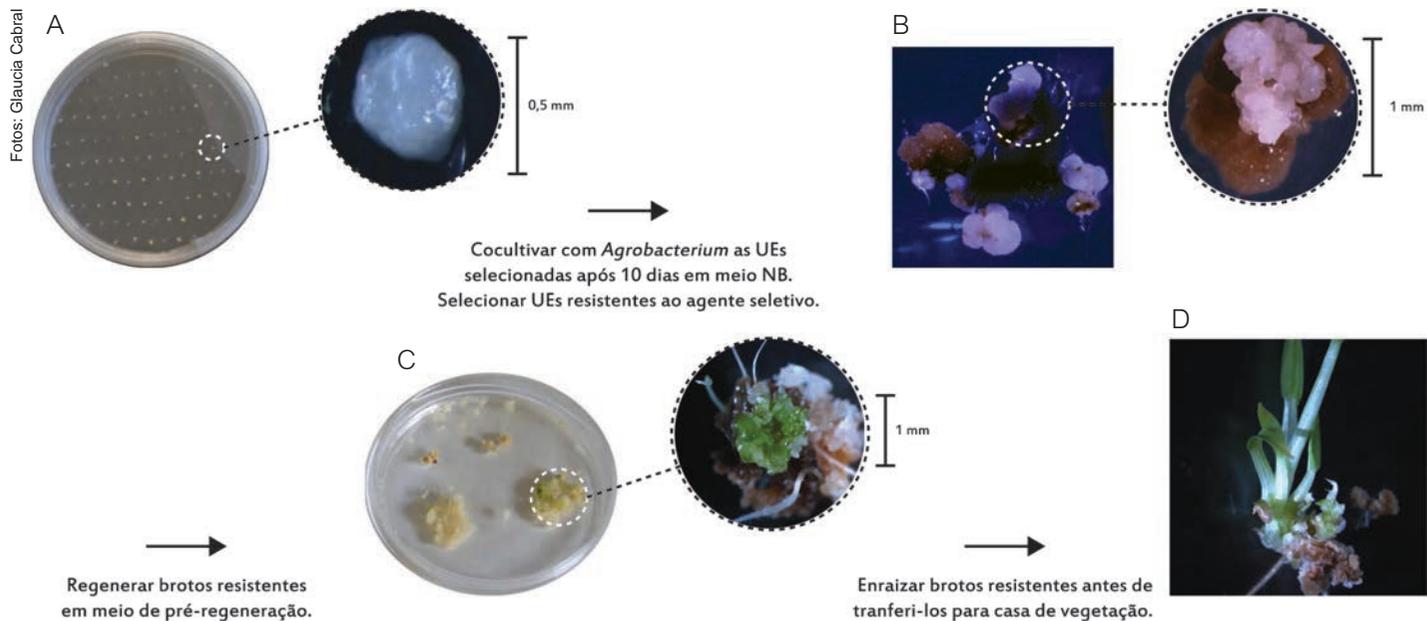


Figura 3. Etapas do protocolo de transformação de unidades embriogênicas (UEs) de arroz (*Oryza sativa*) por cocultura: (A) UEs plaqueadas em meio de indução NB após seleção de calos embriogênicos derivados do escutelo da semente madura de arroz (em destaque, UE medindo 0,5 mm); (B) formação de unidades globulares esbranquiçadas (em destaque) a partir das UEs originais, na segunda fase de seleção em meio de indução NBS; (C) distribuição das unidades globulares esbranquiçadas resistentes ao agente seletivo em meio NBS para controle da origem dos diferentes eventos de transformação (em destaque, UE transgênica resistente, após 3 a 4 semanas em meio de regeneração); e (D) plântula transgênica de arroz desenvolvida a partir de brotos resistentes.

primários, são formadas as pequenas UEs individualizadas, que são nódulos esféricos e compactos de 0,5 mm a 1 mm de diâmetro, que, normalmente, estão na superfície do meio (Figura 3).

- Cultivar as UEs no escuro a 27 °C, durante 8 a 10 dias. Após esse período, três tipos de estruturas deverão ser observados: a) UEs de tamanho inferior a 1 mm que podem ser transferidas para novo meio de

indução NB (placas de 100 mm x 15 mm e 15 UEs por placa) para uma nova incubação de 8 a 10 dias; b) UEs esféricas que apresentam superfície rugosa com tamanho em torno de 3 mm a 5 mm e que serão utilizadas para cocultura; c) UEs de formato ramificado e de tamanho superior a 5 mm que deverão ser eliminadas por estarem muito diferenciadas.

A seleção das UEs é uma etapa fundamental do procedimento. Se forem utilizadas unidades muito menores do que 3 mm, ocorrerá oxidação após a cocultura, enquanto as maiores que 5 mm, por estarem mais diferenciadas, podem conduzir a baixa frequência de transformação, além de originar plantas quimeras.

7. Coletar 200 μL da linhagem de *Agrobacterium* sp. estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Capítulo 1), inocular em 10 mL de meio LB líquido com os antibióticos apropriados e incubar a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 12 a 16 horas, a uma frequência de agitação entre 150 rpm e 200 rpm. Adicionar 10 mL de glicerol 50% à cultura bacteriana, homogeneizar em agitador do tipo Vortex e distribuir em alíquotas de 200 μL por tubo de microcentrifuga estéril.

Caso necessite utilizar posteriormente a mesma linhagem, armazenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ as alíquotas da cultura diluídas em glicerol (concentração final de 25%), após imergir os tubos em nitrogênio líquido (Capítulo 1). Desta forma, não é necessária a manutenção da agrobactéria em placas, e o planejamento da cocultura fica mais fácil, uma vez que a preparação da agrobactéria tem que ser sincronizada com a multiplicação das unidades embriogênicas.

8. Três a quatro dias antes da cocultura, espalhar 200 μL da linhagem de *Agrobacterium* sp. recém-crescida, com uma alça de Drigalsky, em meio AB suplementado com os antibióticos apropriados e cultivar por 3 dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. A agrobactéria deverá crescer abundantemente, formando uma camada viscosa na superfície do meio.

As linhagens desarmadas de *Agrobacterium* sp. EHA105, LBA4404 e AGL1 (Capítulo 3) são usadas para transformação de arroz, sendo a EHA105 a mais eficiente no caso da cultivar Nipponbare. A eficiência de transformação varia muito em função da combinação da linhagem com o vetor utilizado (HIEI et al., 1994, 1997).

É recomendável inocular duas placas de meio AB por construção utilizada.

Cocultura de unidades embriogênicas com *Agrobacterium* sp.

9. No dia da cocultura, selecionar as UEs que apresentem as seguintes características: a) tamanho de 3 mm a 5 mm; b) forma esférica; c) superfície rugosa de coloração branca e opaca; d) textura bastante compacta, firme; e) resistência quando pinçadas.

Utiliza-se, em geral, 100 UEs por construção gênica. O tamanho do T-DNA influencia a eficiência de transformação, se o T-DNA for muito grande (acima de 5 kb), aumentar o número de unidades a serem transformadas.

10. Coletar toda cultura bacteriana da placa (etapa 8 deste item) com uma espátula plana e transferir para 15 mL de meio R2CC líquido em tubo cônico de 50 mL. Homogeneizar a suspensão em agitador tipo Vortex. Coletar 1 mL da suspensão bacteriana e determinar a absorbância a 600 nm (A_{600}). Diluir a suspensão bacteriana com meio R2CC líquido para uma A_{600} de 0,5.

A leitura da A_{600} da suspensão bacteriana encontra-se geralmente em torno de 2,0.

11. Transferir 25 mL da suspensão diluída para placa de Petri (100 mm x 20 mm). Imergir as UEs (100 UEs por construção gênica) nessa suspensão por 15 minutos, agitando delicadamente a placa a cada 5 minutos. Em paralelo, cultivar 50 UEs em meio R2CC líqui-

do sem bactéria (controles de regeneração e de transformação).

12. Após cocultura líquida, transferir as UEs para papel de filtro retangular e rolá-las cuidadosamente sobre o papel, até que adquiram aparência desidratada, ou seja, sem nenhum resquício de umidade. Inocular 10 UEs em meio R2CC sólido [0,7 % (p/v) agarose tipo I] em placas de Petri de 100 mm x 15 mm, selar com filme plástico de parafina e incubar por 3 dias a cocultura sólida no escuro, entre 20 °C e 22 °C.

A secagem das UEs é ponto crítico para evitar supercrescimento bacteriano e para induzir plasmólise das células. De modo similar, é necessário evitar qualquer tipo de condensação ou umidade na placa de cocultura, deixando a placa aberta na capela por 15 minutos antes de vedá-la.

Usar algumas UEs após os 3 dias de cocultura sólida para confirmar a presença dos transgenes pela técnica de PCR (Capítulo 10) ou, se a construção permitir, para análise da expressão gênica do gene repórter (Capítulo 8).

Seleção de tecido embriogênico resistente ao agente seletivo

13. Após a cocultura sólida, transferir as UEs para meio de seleção R2S, que é o meio R2 (Apêndice 2), contendo antibióticos para inibir o crescimento da agrobactéria (cefotaxima 300 mg/L e timentina 100 mg/L) e o agente de seleção apropriado. Seguir a mesma razão de 10 UEs por placa, em placas de Petri de 100 mm x 20 mm. Se houver crescimento demasiado da bactéria, descartar as UEs contaminadas e transferir apenas as não contaminadas para meio de seleção. Cultivar as

placas vedadas com filme plástico de parafina no escuro a 27 °C, por 2 semanas.

Geralmente, utiliza-se a higromicina (30 mg/L a 50 mg/L) como antibiótico de seleção para espécies monocotiledôneas ou os herbicidas (princípio ativo fosfotricina ou glufosinato) a 10 mg/L.

A cefotaxima e a timentina podem ser substituídas por carbenicilina a 200 mg/L.

Os controles de regeneração e transformação consistirão de UEs que foram imersas em meio de cocultura sem a bactéria e que serão transferidas para o meio de seleção contendo timentina e cefotaxima (controle de regeneração), enquanto no controle de transformação, o meio conterá timentina, cefotaxima e o agente de seleção. É importante flambar bem a pinça para não haver contaminação cruzada entre UEs.

UEs contaminadas são aquelas em que se formou uma densa camada de bactéria cobrindo-as, tornando muito difícil a sua descontaminação. Por isso, essas UEs devem ser descartadas.

14. Transferir as UEs para meio NBS, acrescido de cefotaxima (200 mg/L), timentina (100 mg/L) e o agente de seleção apropriado, e cultivá-las no escuro, a 27 °C. Uma a duas semanas depois, várias UEs deverão necrosar, enquanto outras formarão pequenas unidades globulares e esbranquiçadas (Figura 3).
15. Espalhar delicadamente as unidades globulares com pinça, para expor os tecidos à seleção em meio NBS novo, acrescido de cefotaxima (200 mg/L), timentina (100 mg/L) e o agente de seleção apropriado. Colocar as unidades globulares oriundas de uma mesma UE próximas uma das outras e da UE de origem (Figura 3). Subcultivar as unidades globulares por mais 1 semana no escuro, a 27 °C.

É importante manter juntas as unidades globulares oriundas de uma mesma UE, de maneira a poder oportunamente rastrear as plantas oriundas de unidades globulares que vieram de uma mesma UE e, portanto, potencialmente oriundas de um mesmo evento de transformação.

Pré-regeneração dos tecidos selecionados e regeneração de brotos

16. Selecionar delicadamente, com uma pinça, as unidades globulares embriogênicas resistentes ao agente de seleção obtidas no meio NBS e transferi-las para meio pré-RN, acrescido de cefotaxima (200 mg/L), timentina (100 mg/L) e o agente de seleção apropriado, em placa de 100 mm x 20 mm. Incubar no escuro, a 27 °C, por 1 semana.

Unidades globulares embriogênicas transgênicas aumentam de tamanho e têm uma aparência compacta, cor branco-esverdeada e aspecto rugoso, de estrutura lobada e invaginada, enquanto unidades não transgênicas apresentam-se translúcidas, de cor bege e consistência mais mole ou aquosa. Essas devem ser descartadas.

17. Selecionar as unidades globulares embriogênicas potencialmente transgênicas do meio pré-RN e inocular em meio RN, acrescido de cefotaxima (100 mg/L), timentina (50 mg/L) e o agente de seleção apropriado, com uma densidade de quatro a cinco unidades por placa de 100 mm x 20 mm. Incubar por 2 dias no escuro, a 27 °C.

Após a transferência para meio RN, a manutenção da pressão seletiva é opcional e dependente do genótipo de arroz. No caso da cultivar Nipponbare, a pressão seletiva deve ser mantida.

18. Transferir as placas para sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 °C e empilhá-las de modo que recebam luz indireta (baixa luminosidade). Após 2 dias, espalhar as placas na prateleira para que passem a receber luz direta, por 3 a 4 semanas.

Após 3 semanas de cultura, as unidades embriogênicas tornam-se verdes e se diferenciam em brotos (Figura 3).

Enraizamento de plântulas transgênicas

19. Separar cuidadosamente os brotos do tecido original quando atingirem aproximadamente 2 cm de altura e transferi-los para tubo de ensaio com 25 mL de meio MS, contendo sacarose 5% (p/v) e um agente gelificante ultrapuro 0,3% (p/v). Cultivar os brotos (Figura 3) por 3 a 4 semanas em fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 °C.
20. Após esse período, transferir as plântulas com sistema radicular vigoroso para copos plásticos furados, contendo mistura solo:vermiculita. Manter em casa de vegetação em condições de alta umidade e baixa intensidade de luz. Após 2 semanas, retirar a plantas do sistema de aclimação e transferi-las para potes grandes com solo.

3.3 Observações

De modo geral, as condições e tempo de cultura para atingir as diferentes etapas da obtenção de

plantas de arroz transgênicas a partir da cocultura com UEs são:

Etapa	Temperatura	Luminosidade	Duração
Indução de calos em NB	27 °C	Escuro	3 semanas
Multiplicação das UEs	27 °C	Escuro	10 dias
Cocultura sólida em R2CC	entre 20 °C e 22 °C	Escuro	3 dias
Seleção em R2S	27 °C	Escuro	2 semanas
Seleção em NBS	27 °C	Escuro	3 semanas
Pré-regeneração	27 °C	Escuro	1 semana
Regeneração em RN	27 °C	Escuro	2 dias
	27 °C	Fotoperíodo de 16 horas	4 semanas
Enraizamento em MS	27 °C	Fotoperíodo de 16 horas	4 semanas

Diferentemente de fumo e de outras dicotiledôneas, a maioria das espécies monocotiledôneas, com exceção de milho (AHMADABADI et al., 2007), não é responsiva na via organogênica, ou mesmo na embriogênica, quando da utilização de tecidos diferenciados verdes como explantes, por exemplo, folhas, caules, cotilédones, hipo e epicótilos. Culturas embriogênicas

têm sido a principal fonte para obtenção de plantas transgênicas para as espécies monocotiledôneas em geral, quer seja a partir de calos, unidades ou suspensões celulares embriogênicas. Em cereais, embriões somáticos são obtidos direta ou indiretamente a partir de células meristemáticas simples (embriogênicas), que são tipicamente pequenas, isodiamétricas, ricamente citoplasmáticas, que contêm pequenos grãos de amido e se dividem rapidamente (VASIL, 2005). A manutenção de células embriogênicas em altos níveis de 2,4-D (acima de 2 mg/L) por subcultivos regulares pode perpetuar seu estado embriogênico meristemático, enquanto que, a redução no nível de 2,4-D induz rapidamente a diferenciação celular, perdendo sua totipotência. Baseado nesses conhecimentos, os métodos atuais de transformação de espécies monocotiledôneas, utilizam células embriogênicas meristemáticas, com alta taxa de divisão, tal como as de unidades embriogênicas obtidas de calos de semente madura de arroz (escutelo do embrião) que são cocultivadas com *Agrobacterium* sp., conforme protocolo descrito neste capítulo (HIEI et al., 1994; SALLAUD et al., 2003).

A eficiência de transformação de espécies monocotiledôneas por *Agrobacterium* sp. pode ser aumentada por fatores envolvidos na susceptibilidade da célula vegetal a *Agrobacterium* spp. ou na ativação da região *vir* de *Agrobacterium* sp. (CHENG et al., 2004). Entre esses fatores estão genótipo da planta, tipo de explante, linhagem de *Agrobacterium* sp., tipo de vetor binário e promotor dos genes de interesse e de seleção, condições de cocultura,

tratamento osmótico para dessecação de explantes antes ou após a cocultura. Entretanto, de uma maneira geral, a eficiência de transformação ainda é baixa, principalmente para genótipos-elite de cereais (KARAMI et al., 2009; VASIL, 2005).

A redução para a metade, ou remoção do CaCl_2 do meio de cocultura (R2CC), favorece o aumento da susceptibilidade do explante vegetal à infecção por *Agrobacterium* sp., uma vez que esse macronutriente tem papel crucial na defesa da planta contra microrganismos patogênicos (AZADI et al., 2010; SALLAUD et al., 2003).

O uso de acetosiringona (AS) durante a cocultura é um dos pontos críticos para transformação de espécies de monocotiledôneas em geral. AS é um composto fenólico necessário para a ativação dos genes *vir* de *Agrobacterium* spp., e essencial para a transferência do T-DNA. A adição de AS a 50 μM no meio de cocultura aumentou significativamente a eficiência de transformação de cana-de-açúcar (MANICKAVASAGAM et al., 2004).

Trocar a sacarose por uma aldose, como a D-glicose, como fonte de carbono no meio de cocultura, como o meio R2CC, tem sido rotineiramente usado para transformação eficiente de arroz (HIEI et al., 1994; SALLAUD et al., 2003). As aldoses podem potencializar a expressão dos genes *vir*, que são dependentes de AS, quando a concentração de AS no meio está reduzida, como a 50 μM (SHIMODA et al., 1990).

4 Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* por imersão dos botões florais (*floral dip*)

4.1 Material

- Centrífuga para tubos de 50 mL.
- Erlenmeyer 1 L.
- Espectrofotômetro para leitura de absorbância a 600 nm.
- Hidróxido de potássio (KOH).
- Incubadora com controle de temperatura e agitação orbital.
- Linhagem desarmada de *Agrobacterium* sp., contendo em seu vetor binário os transgenes em estudo (Capítulo 3).
- Meio LB de crescimento de agrobactéria (Apêndice 1).
- Meio MS sólido de germinação de sementes [0,6% (p/v) ágar; (Apêndice 2)].
- Papel de filtro em placas de Petri, esterilizado por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos.
- Placas de Petri.

- Sais MS (macro e micronutrientes do meio de cultura MS, Apêndice 2).
- Sementes de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0).
- Solo aerado adicionado de micro e macro nutrientes.
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de etanol 95% (v/v).
- Solução de inoculação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Sais MS	0,22 mL	0,22%
Sacarose	5,0 g	5%
MES	50 mg	0,05%
Surfactante organossilicone (copolímero de silicone poliéter)	20 mg	0,02%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Ajustar o pH para 5,7 com NaOH ou KOH 1N e esterilizar o meio por autoclavagem durante 20 minutos a 110 °C.

- Soluções-estoque de antibióticos (Apêndice 3).
- Surfactante não iônico (da família polioxietileno p-tercotil fenol).
- Tubos de plástico para centrifuga de 50 mL.
- Vasos plásticos (300 mL) e bandejas plásticas com tampa transparente para acondicionamento dos vasos.

4.2 Procedimento

Crescimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*

1. Desinfestar as sementes de *A. thaliana* utilizando etanol 70%, contendo 0,1% de surfactante não iônico, em agitação lenta durante 5 minutos.
2. Lavar as sementes duas vezes em etanol 95%. Depositar as sementes em papel de filtro estéril e esperar o etanol evaporar.

Para evitar contaminação, essa etapa deve ser realizada dentro do fluxo laminar.

Em virtude do pequeno tamanho das sementes, o descarte das soluções e recolhimento das sementes pode ser realizado com auxílio de uma micropipeta.

3. Semear em placas de Petri, contendo meio MS sólido para germinação de sementes. Incubar no escuro, a 4 °C, durante 48 horas para quebra da dormência. Após esse período, transferir as placas para uma sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas, a 22 ± 2 °C. Quando as plântulas atingirem pelo menos quatro folhas, transferi-las para vasos, contendo solo aerado adicionado de nutrientes e umedecido (Figura 4).

Para evitar danos às raízes, comprometendo seu desenvolvimento, antes de transferir as plântulas para o solo, umedecer o meio MS e recortá-lo ao redor da raiz. Com o auxílio de uma pinça, coletar a plântula, lavar rapidamente a raiz em água destilada e depositá-la no solo. Para a fixação da raiz, empurrar o solo delicadamente com o jato de água de uma pisseta.

O desenvolvimento da plântula até atingir o estágio de quatro folhas leva, aproximadamente, 7 dias, desde a inoculação das sementes.

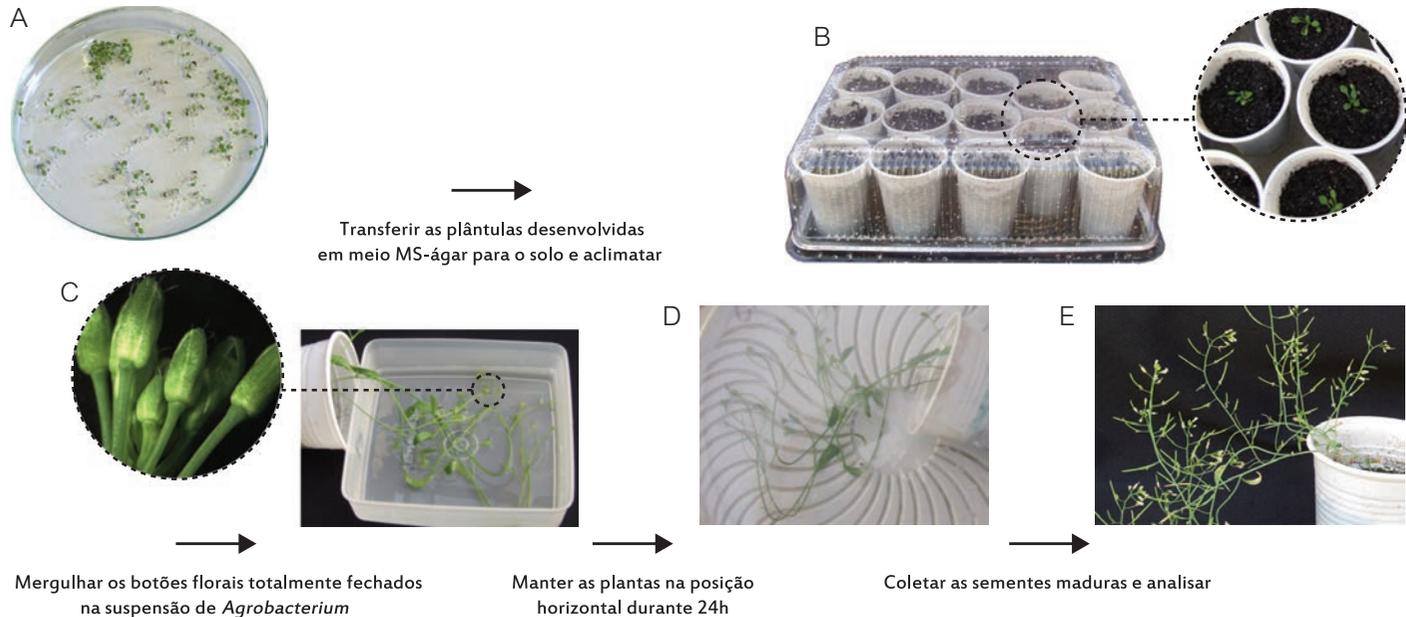


Figura 4. Etapas do protocolo de transformação de *Arabidopsis thaliana* por imersão de botões florais: (A) sementes de plantas de *A. thaliana* germinadas em meio MS sólido; (B) desenvolvimento das plântulas (em destaque), após 2 semanas da germinação em vasos contendo solo adubado; (C) inoculação da inflorescência em suspensão de *Agrobacterium* sp., utilizando botões totalmente fechados (em destaque); (D) plantas, após procedimento de transformação, mantidas na posição horizontal por 24 horas; (E) plantas submetidas ao procedimento de transformação, mostrando siliquis, contendo sementes em fase de amadurecimento para posterior coleta e análise da transgenia.

A germinação das sementes em meio MS sólido é vantajosa para obter uniformidade no tamanho das plantas a serem utilizadas no procedimento de transformação.

4. Aclimatar as plantas, colocando os vasos em bandeja contendo uma lâmina de água, coberta por tampa de plástico transparente, por 2 a 3 dias. Após esse período, retirar a cobertura e manter os vasos sobre uma

lâmina de água durante o crescimento das plântulas (de 3 a 4 semanas) (Figura 4).

Eliminar os brotos primários, podando-os, tende a induzir o aumento da inflorescência secundária, favorecendo a obtenção de numerosos botões florais. As plantas estarão prontas para transformação cerca de 4 a 6 dias após a poda.

O crescimento das plantas de *A. thaliana* pode ser realizado em sala de crescimento de plantas ou em casa de vegetação, e é dependente da umidade, temperatura e luminosidade.

Imersão do botão floral em suspensão de *Agrobacterium* sp.

- Com auxílio de alça de platina, inocular uma colônia de *Agrobacterium* sp., contendo em seu vetor binário os transgenes em estudo e crescidas em meio sólido (Capítulo 1), em 10 mL de meio LB líquido, contendo os antibióticos apropriados.

A escolha dos antibióticos depende da linhagem de *Agrobacterium* sp. e do gene de seleção presente na construção gênica.

- Cultivar as bactérias em agitador do tipo orbital, durante aproximadamente 24 horas, a uma frequência de agitação de 180 rpm, a 28 °C.
- Adicionar os 10 mL do pré-inóculo a 200 mL de meio LB líquido, contendo os antibióticos apropriados, e incubar a uma frequência de agitação de 180 rpm, a 28 °C, durante 12 a 16 horas. Coletar 1 mL e determinar a absorbância a 600 nm (A_{600}) da suspensão bacteriana por leitura em um espectrofotômetro. A cultura deve estar em fase exponencial de crescimento, ou seja, A_{600} entre 0,7 e 1,0.

O tempo de crescimento de *Agrobacterium* spp. varia conforme a linhagem, dependendo das condições de aeração durante o cultivo.

- Transferir a suspensão bacteriana para tubos de centrifugação e centrifugar por 15 minutos, a 5.400 g, a uma temperatura de aproximadamente 22 °C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 150 mL da solução de inoculação.

Preparar a solução de inoculação imediatamente antes do uso.

Para cada duas a três plantas, utilizar 150 mL de células em suspensão.

O surfactante organossilicone é um agente redutor da tensão superficial da membrana celular. Em doses de baixa toxicidade (0,02%), ele favorece a entrada da bactéria nos tecidos da planta, relativamente inacessíveis.

- Imergir os botões florais de três plantas vigorosas, tamanho de aproximadamente 10 cm e inflorescência totalmente fechada (sem pétalas aparentes, Figura 4), em 150 mL da suspensão de *Agrobacterium* sp., por 3 segundos a 1 minuto, agitando manualmente. Durante imersão, deve-se formar uma camada de suspensão bacteriana, cobrindo todos os botões florais. Evitar bolhas ao redor da inflorescência.

As plantas atingem o tamanho ideal para a transformação geralmente após 3 a 4 semanas do início da germinação das sementes.

É recomendável umedecer bastante as plantas nos 2 dias que antecedem o procedimento de inoculação. Porém, a quantidade de água no solo não deve ser demasiada, para evitar a absorção da suspensão de *Agrobacterium* spp.

Podem ser repetidas até três inoculações com *Agrobacterium* sp. no período de 6 dias. No entanto, os testes realizados indicaram que o efeito no aumento da taxa de transformantes não justifica o aumento de tempo e de material utilizado (CLOUGH; BENT, 1998).

- Após o período de imersão dos botões florais na suspensão de *Agrobacterium* sp., deixar as plantas na posição horizontal, dentro de bandejas cobertas com plástico transparente, durante 24 horas (Figura 4). Após esse período, retornar as plantas para a posição vertical e mantê-las a 22 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas e

umidade de, pelo menos, 80%, durante 3 a 4 semanas, ou até o início do amadurecimento das siliquas.

Manter os vasos com as plantas sobre uma lâmina de água, em bandejas com tampa de plástico, simulando uma câmara úmida, garantindo as condições de umidade. Evite a exposição à luz solar e ao ar quente no interior das bandejas.

Agrupar os novos botões florais de cada planta com barbante e prender em uma pequena estaca. Manter distância entre os vasos para evitar polinização cruzada.

11. Retirar completamente a água das bandejas quando as plantas apresentarem siliquas começando a secar, indicando o amadurecimento das sementes (Figura 4). Coletar as sementes maduras e armazenar a 4 °C.

Em geral, obtêm-se aproximadamente 1.000 sementes de cada planta (ou o equivalente ao volume aproximado de 100 µL).

12. Desinfestar as sementes (conforme descrito anteriormente nas etapas 1 e 2 do item 4.2 Procedimento). Semear em placas de Petri contendo meio MS sólido, adicionado do agente de seleção apropriado, para selecionar os transformantes. Transferir para o solo as plântulas que apresentam pelos menos quatro folhas. Após o crescimento das plantas (de 2 a 3 semanas), coletar uma folha para extrair DNA (Capítulo 9) e utilizá-lo nas análises moleculares, visando confirmar a integração e expressão do(s) transgene(s).

Para um controle paralelo da germinação, semear também em meio MS sólido, sem adição do agente de seleção.

A eficiência de transformação pelos métodos in planta pode atingir até cinco plantas transgênicas por planta-mãe inoculada. Como cada planta-mãe produz em média 1.000 sementes, a eficiência é de 0,5%.

Para seleção de sementes transgênicas de *A. thaliana*, as dosagens variam de acordo com o agente seletivo utilizado, sendo os agentes mais comuns: canamicina 50 mg/L a 100 mg/L, higromicina 15 mg/L a 30 mg/L, e fosfotricina 10 mg/L a 20 mg/L.

4.3 Observações

Apesar de o ecótipo Columbia (Col-0) ser o mais utilizado na transformação das plantas de *A. thaliana*, experimentos que utilizam os ecótipos Ws-0, Nd-0, No-0 indicaram frequência similar de transformantes. Para os experimentos que utilizam os ecótipos Ler-0, Dijon-G e Bla-2, foi observada uma diminuição no número de transformantes (CLOUGH; BENT, 1998).

Diversas linhagens de *Agrobacterium* spp., como LBA4404, EHA 105, Chry 105 e GV3103 (Capítulo 3), podem ser utilizadas com sucesso para a transformação por imersão floral de plantas do ecótipo Col-0.

Como alternativa à germinação de sementes em meio MS sólido, as sementes de *A. thaliana* podem ser plantadas diretamente no solo. Nesse caso, deve-se quebrar a dormência das sementes incubando-as em 300 µL de água destilada para o equivalente a 100 µL de sementes, a 22 ± 3 °C durante 24 horas, seguido por 48 horas a 4 °C. Depositar, com auxílio de uma micropipeta, uma a duas sementes por vaso (300 mL), contendo solo aerado, adubado e umedecido. Pode-se também utilizar uma mistura contendo substrato aerado, terra estéril e vermiculita (3:3:1). Recomenda-se cobrir o solo onde serão depositadas as sementes com tela contendo pequenos

orifícios (por exemplo, tela para mosquito) para reter a terra quando da inversão dos vasos de plantas, durante e após a inoculação com bactéria.

O estágio de desenvolvimento da planta no momento da inoculação com *Agrobacterium* spp. é muito importante. Embora a transformação possa ocorrer quando a bactéria é inoculada em outros estádios (por exemplo, nas rosetas, local de iniciação dos botões, ou nas sementes), os maiores índices em reprodutibilidade e eficiência de obtenção de transformantes são atingidos quando utilizadas plantas contendo numerosos botões, totalmente fechados. Uma das razões para que *A. thaliana* seja passível à transformação por imersão dos botões florais é que seu gineceu permanece aberto e acessível à aplicação exógena de *Agrobacterium* spp., nas fases iniciais do desenvolvimento floral (DESFEUX et al., 2000), o que permite o acesso da bactéria aos óvulos (o alvo da transformação) durante seu desenvolvimento. Um posterior fechamento do gineceu pode impedir a transformação de flores em estádios mais avançados. Aparentemente, somente *A. thaliana* e algumas espécies da família Brassicaceae satisfazem essas restrições. Dentre essas espécies, podem-se destacar: bolsa-de-pastor (erva medicinal, *Capsella bursa-pastoris*) (BARTHOLMES et al., 2008), canola (*Brassica napus*) (WANG et al., 2003) e rabanete (*Raphanus sativus*) (CURTIS; NAM, 2001).

Diferentes doses do surfactante organosilicone podem ser utilizadas na solução de inoculação. Os resultados indicam alta eficiência de obtenção de transformantes

quando se utilizam concentrações de surfactante organosilicone de 0,02% a 0,1%. Entretanto, recomenda-se cautela no aumento da dose utilizada, para evitar necrose nos tecidos das plantas, comum em alguns ambientes. Outros surfactantes podem ser utilizados, como poloxâmico f68 ou polissorbato 20. Contudo, o surfactante organosilicone (CLOUGH; BENT, 1998; CURTIS, 2010) tem a vantagem de reduzir a tensão da superfície da célula, mais do que outros surfactantes e, em dose de baixa fitotoxicidade, favorece melhor a entrada da bactéria nos tecidos da planta, relativamente inacessíveis.

5 Referências

- AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 16, n. 4, p. 437-448, 2007.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2002.
- AZADI, P.; CHIN, D. P.; KURODA, K.; KHAN, R. S.; MII, M. Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 101, n. 2, p. 201-209, 2010.
- BARTHOLMES, C.; NUTT, P.; THEISSEN, G. Germline transformation of Shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) by the 'floral dip' method as a tool for evolutionary and developmental biology. **Gene**, Amsterdam, v. 409, n. 1/2, p. 11-19, 2008.
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences: Série 3: Sciences de la vie**, Paris, v. 316, n. 10, p. 1194-1199, 1993.
- BRASILEIRO, A. C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 111-125.

- BRASILEIRO, A.; ARAGÃO, F. Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. **Journal of Plant Biotechnology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 113-121, 2001.
- CHENG, M.; FRY, J. E.; PANG, S.; ZHOU, H.; HIRONAKA, C. M.; DUNCAN, D. R.; CONNER, T. W.; WAN, Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, n. 3, p. 971-980, Nov. 1997.
- CHENG, M.; LOWE, B.; SPENCER, T.; YE, X.; ARMSTRONG, C. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 40, n. 1, p. 31-45, 2004.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, London, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998.
- CURTIS, I. S. Genetic transformation – *Agrobacterium*. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. (Ed.). **Plant cell culture: essential methods**. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. p. 199-215.
- CURTIS, I. S. **Transgenic crops of the world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. 454 p.
- CURTIS, I. S.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Leaf disk transformation. In: GARTLAND, K. M. A.; DAVEY, M. R. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 59-70.
- CURTIS, I. S.; NAM, H. G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method—plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 363-371, 2001.
- DE BLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 8, p. 1681-1689, 1984.
- DE MUYNCK, B.; NAVARRE, C.; BOUTRY, M. Production of antibodies in plants: status after twenty years. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 529-563, 2010.
- DESFEUX, C.; CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 123, n. 3, p. 895-904, 2000.
- DRAPER, J.; SCOTT, R.; ARMITAGE, P.; WALDEN, R. **Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell Scientific, 1988. 355 p.
- FELDMANN, K. A.; MARKS, M. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. **Molecular and General Genetics**, v. 208, n. 1/2, p. 1-9, 1987.
- GALLOIS, P.; MARINHO, P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. In: JONES, H. (Ed.). **Plant gene transfer and expression protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 39-48.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium* in the genomics age. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 4, p. 1665-1676, Aug. 2009.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; SIMPSON, J.; MARTINEZ-TRUJILLO, M. Transgenic plants: an historical perspective. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 286, p. 3-32, 2005.
- HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 205-218, 1997.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, London, v. 6, n. 2, p. 271-282, 1994.
- HIRANO, H. Y.; HIRAI, A.; SASAKI, T. **Rice biology in the genomics era**. New York: Springer, 2008. 381 p.
- HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; SANDERS, P. R.; LLOYD, A.; HOFFMANN, N. L. Inheritance of functional foreign genes in plants. **Science**, Washington, DC, v. 223, n. 4635, p. 496-498, 1984.
- HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, Washington, DC, v. 227, n. 4691, p. 1229-1231, 1985.
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 6, p. 745-750, 1996.
- JIN, S.; MUSHKE, R.; ZHU, H.; TU, L.; LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 8, p. 1303-1316, 2008.
- KAPILA, J.; DE RYCKE, R.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. **Plant Science**, Limerick, v. 122, n. 1, p. 101-108, 1997.

- KARAMI, O.; ESNA-ASHARI, M.; KARIMI KURDISTANI, G.; AGHAVAISI, B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 53, n. 2, p. 201-212, 2009.
- KIM, M.; BAEK, K.; PARK, C.-M. Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 8, p. 1159-1167, 2009.
- KOLE, C.; MICHLER, C.; ABBOTT, A. G.; HALL, T. C. **Transgenic crop plants: principles and development**. New York: Springer, 2010. 315 p.
- LEE, C.-W.; EFETOVA, M.; ENGELMANN, J. C.; KRAMELL, R.; WASTERNAK, C.; LUDWIG-MÜLLER, J.; HEDRICH, R.; DEEKEN, R. *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 9, p. 2948-2962, 2009.
- LEPLÉ, J. C.; BRASILEIRO, A. C. M.; MICHEL, M. F.; DELMOTTE, F.; JOUANIN, L. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 3, p. 137-141, 1992.
- LIN, J. J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Focus**, Gaithersburg, v. 16, n. 3, p. 72-77, 1994.
- MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN, S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 3, p. 134-143, 2004.
- MCCULLEN, C. A.; BINNS, A. N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 22, p. 101-127, 2006.
- MIKI, B.; MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 193-232, 2004.
- OGAWA, Y.; MIL, M. Evaluation of 12 β -lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 10, p. 736-743, 2005.
- OPABODE, J. T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, [Lagos], v. 1, n. 1, p. 12-20, 2006.
- PEÑA, L. (Ed.). **Transgenic plants: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2005. 437 p. (Methods in Molecular Biology, v. 286).
- PITZSCHKE, A.; HIRT, H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. **EMBO Journal**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 1021-1032, 2010.
- QING, C. M.; FAN, L.; LEI, Y.; BOUCHEZ, D.; TOURNEUR, C.; YAN, L.; ROBAGLIA, C. Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 67-72, 2000.
- SALLAUD, C.; MEYNARD, D.; VAN BOXTEL, J.; GAY, C.; BÈS, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B. F.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **TAG: Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, n. 8, p. 1396-1408, 2003.
- SHIMODA, N.; TOYODA-YAMAMOTO, A.; NAGAMINE, J.; USAMI, S.; KATAYAMA, M.; SAKAGAMI, Y.; MACHIDA, Y. Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 87, n. 17, p. 6684-6688, 1990.
- SHRAWAT, A. K.; LÖRZ, H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 575-603, 2006.
- SOMLEVA, M. N.; TOMASZEWSKI, Z.; CONGER, B. V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of switchgrass. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 2080-2087, 2002.
- SOOD, P.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A. Problems and possibilities of monocot transformation. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2011.
- SUNDAR, I. K.; SAKTHIVEL, N. Advances in selectable marker genes for plant transformation. **Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 165, n. 16, p. 1698-1716, 2008.
- SUZUKI, S.; NAKANO, M. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 9, p. 835-841, 2002.

SUZUKI, S.; SUPAIBULWATANA, K.; MII, M.; NAKANO, M. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 1, p. 89-97, 2001.

TINGAY, S.; MCELROY, D.; KALLA, R.; FIEG, S.; WANG, M.; THORNTON, S.; BRETTELL, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, London, v. 11, n. 6, p. 1369-1376, 1997.

TRIEU, A. T.; BURLEIGH, S. H.; KARDAILSKY, I. V.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; VERSAW, W. K.; BLAYLOCK, L. A.; SHIN, H. S.; CHIOU, T. J.; KATAGI, H.; DEWBRE, G. R.; WEIGEL, D.; HARRISON, M. J. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. **Plant Journal**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 531-541, 2000.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 147-154, 2006.

UPADHYAYA, N. M. **Rice functional genomics**: challenges, progress and prospects. New York: Springer, 2007. 499 p.

VAGHCHHIPAWALA, Z.; ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. In: PEREIRA, A. (Ed.). **Plant reverse genetics**: methods and protocols. New York: Humana Press, 2011. v. 678, p. 65-76.

VANCANNEYT, G.; SCHMIDT, R.; O'CONNOR-SANCHEZ, A.; WILLMITZER, L.; ROCHA-SOSA, M. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 245-250, 1990.

VASIL, I. A history of plant biotechnology: From the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1423-1440, 2008.

VASIL, I. The story of transgenic cereals: The challenge, the debate, and the solution: A historical perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 41, n. 5, p. 577-583, 2005.

WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. 2nd ed. New York: Humana Press, 2006. v. 1, 512 p. (Methods in Molecular Biology, v. 343).

WANG, W. C.; MENON, G.; HANSEN, G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, n. 4, p. 274-281, 2003.

WEEKS, J. T.; YE, J.; ROMMENS, C. M. Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 587-597, 2008.

WISE, A. A.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. In: WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. 2nd ed. New York: Humana Press, 2006. v. 1, p. 3-14. (Methods in Molecular Biology, v. 343).

Capítulo 7

Expressão transiente e indução de silenciamento utilizando *Agrobacterium* spp. e vetores virais

Cristiano Lacorte
Simone da Graça Ribeiro

1 Introdução

Expressão gênica transiente

A transformação de plantas é, geralmente, associada à incorporação do DNA exógeno de forma estável no genoma. No entanto, a expressão heteróloga de um gene pode ocorrer independentemente da integração do DNA no genoma. Esse tipo de expressão gênica, chamada transiente, está associada a qualquer método de transformação genética de plantas, seja por *Agrobacterium* spp. seja por métodos diretos de transformação, como a transformação de protoplastos (Capítulo 4) e a biobalística (Capítulos 5), mas que não envolve a transferência desse transgene para gerações futuras (FISCHER et al., 1999; KOHLI et al., 2006).

A introdução do gene exógeno na célula não implica sua integração estável, a qual ocorre em apenas uma pequena parte das células transformadas (estimada em cerca de 0,1%); no entanto, em todas as células que receberam DNA exógeno, ocorre a expressão transiente. A expressão transiente, dependendo do método utilizado, pode ser observada após 6 a 8 horas, não sendo mais detectável após 7 a 15 dias. Assim, como ocorre em plantas transgênicas, a transcrição das sequências exógenas varia conforme o tipo de promotor, o tipo de tecido e demais fatores potencialmente envolvidos na regulação gênica. Porém, a expressão transiente não é influenciada por fatores como efeito de posição e o número de cópias do transgene no genoma, os quais podem levar ao silencia-

mento transcricional, como se observa frequentemente em plantas transgênicas (KOHLI et al., 2006).

Experimentos em que se utilizou expressão transiente, por métodos de biobalística (Capítulo 5), transformação de protoplastos (Capítulo 4) e vetores virais ou infiltração de tecido foliar com cultura de *Agrobacterium* spp., são utilizados para estudos de regulação gênica, localização subcelular de proteínas, produção heteróloga de proteínas e validação da função gênica, substituindo ou complementando o uso de testes com plantas transgênicas. A vantagem desses métodos em relação às plantas transgênicas é a rapidez, simplicidade e menor custo, uma vez que dispensam as etapas de cultura de tecidos (seleção e regeneração de plantas), e as análises e caracterização dos eventos de transformação (Capítulo 6).

Produção de proteínas heterólogas em plantas

O uso de plantas para a produção de proteínas heterólogas apresenta diversas vantagens em relação aos sistemas atualmente mais utilizados, baseados em microrganismos e cultura de células *in vitro*. O baixo custo, a facilidade de escalar a produção e o baixo risco de contaminação por patógenos capazes de infectar o homem são algumas dessas vantagens (POGUE et al., 2002; SHARMA; SHARMA, 2009).

A produção de proteínas heterólogas em plantas pode ser obtida a partir de diferentes órgãos das plantas transgênicas; por exemplo, folhas, sementes e órgãos de reserva. No entanto, o desenvolvimento de uma platafor-

ma para a expressão de proteínas heterólogas baseada em plantas transgênicas pode demandar muito tempo e trabalho (FISCHER et al., 1999). Como alternativa, podem-se produzir proteínas heterólogas por meio da expressão transiente, utilizando as técnicas de infiltração de tecidos foliares com *Agrobacterium* spp. ou pelo uso de vetores virais (HEFFERON, 2012; STREATFIELD, 2007; YIN et al., 2007).

Agroinfiltração

A infiltração com *Agrobacterium* spp., ou agroinfiltração, geralmente é feita em tecidos foliares com as mesmas linhagens e vetores utilizados para a obtenção de plantas transgênicas (Capítulo 6) (KAPILA et al., 1997). Em razão do grande número de células que são transformadas, após 3 a 4 dias de expressão transiente, é possível obter quantidades suficientes das proteínas heterólogas de interesse tanto para detecção quanto para purificação, em pequena ou média escala.

Embora a agroinfiltração seja um método simples e eficiente de transformação, frequentemente o nível de expressão de proteínas heterólogas é baixo, como resultado, em parte, da pouca capacidade de tecidos foliares para acumular proteínas (STREATFIELD, 2007). O nível de expressão também é afetado pelo silenciamento gênico induzido pelo processo de transformação pela *Agrobacterium* spp. Para tentar contornar esse problema, utiliza-se a coexpressão de supressores de silenciamento, que são genes de origem viral e que atuam de diferentes formas nas vias de silenciamento gênico (BURGYAN;

HAVELDA, 2011). A coexpressão do gene de interesse junto a um supressor de silenciamento eleva o nível de expressão, pelo aumento da estabilidade dos mRNAs (VOINNET et al., 2003), assim como prolonga o período durante o qual são expressos. Diversos supressores de silenciamento estão sendo descritos e testados em sistemas de expressão transiente. Os supressores mais utilizados para a expressão transiente em *Nicotiana benthamiana* são o P-19 e o HC-Pro, derivados de *Tombusvirus* e de *Potyvirus*, respectivamente (BURGYAN; HAVELDA, 2011; VOINNET et al., 2003).

Vetores virais

Outra forma de expressão transiente, bastante eficiente para a expressão de proteínas heterólogas, é a que utiliza vetores virais. Um vetor viral é, essencialmente, um vírus modificado, obtido a partir de um clone infeccioso. A sequência clonada, correspondente ao vírus, é modificada de acordo com duas estratégias: a) substituição, pelo gene de interesse, de genes não essenciais à infecção viral, como genes envolvidos na transmissão; b) inserção de um gene exógeno em sítios de clonagem ou restrição incorporados em locais específicos do genoma viral (Figura 1) (GLEBA et al., 2007; HEFFERON, 2012; LACORTE; RIBEIRO, 2011).

A maioria dos vetores virais disponíveis é derivada de vírus com genoma baseado em RNA. Dessa forma, a inoculação pode ser feita a partir da transcrição in vitro, seguida da inoculação mecânica do RNA na planta hospedeira. Como alternativa, o vetor viral também

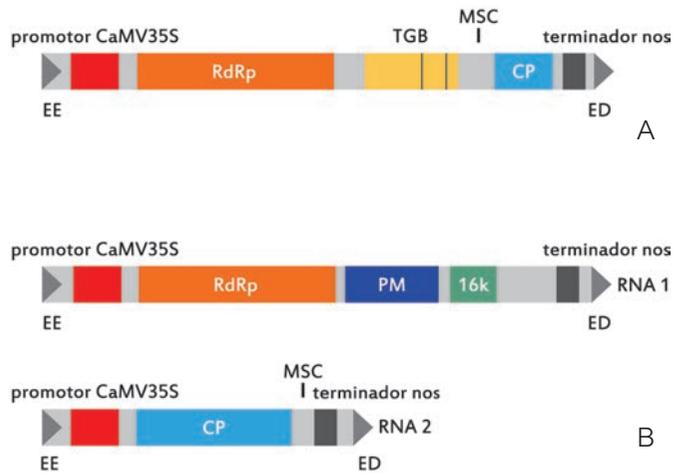


Figura 1. Representação esquemática da organização genômica de vetores virais baseados no PVX (A) e TRV (RNA1 e RNA2) (B). EE e ED representam as extremidades esquerda e direita do T-DNA, respectivamente; MSC, múltiplo sítio de clonagem, para a inserção da sequência exógena; promotor CaMV35S, promotor 35 do *Cauliflower mosaic virus*; terminador do gene da nopalina sintase; RdRp, RNA polimerase RNA-dependente; CP, capa proteica; TGP, *triple gene box*; PM, proteína de movimento; 16K, proteína com atividade de supressor de silenciamento.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

pode ser clonado em um cassette de expressão, em vetor binário de *Agrobacterium* spp., e uma suspensão de *Agrobacterium* sp., contendo esse vetor, é infiltrada na folha da planta hospedeira. Nesse método, chamado agroinoculação, o T-DNA transferido para a célula vegetal contém a sequência correspondente ao vetor viral que, após ser transcrita, irá iniciar os processos de replicação, tradução e movimento envolvidos na infecção viral (GLEBA et al., 2007). Ao produzir as proteínas virais, o

vetor viral também irá produzir a proteína heteróloga de interesse.

Como a infecção viral tipicamente implica elevados níveis de replicação e transcrição, também se espera um nível elevado de produção de proteínas heterólogas (POGUE et al., 2010). O vetor viral não se integra ao genoma da planta, nem é transmitido para a progênie, portanto, a expressão de um gene a partir de um vetor viral é considerada um tipo de expressão transiente. Ao contrário dos outros métodos usados para expressão transiente, a expressão baseada na infecção viral não diminui após 5 a 10 dias, uma vez que o vetor viral constitui um replicon que se mantém nas células de forma autônoma (LICO et al., 2008).

Assim como a infiltração com *Agrobacterium* spp., a infecção viral também é um método rápido e simples. A coleta pode ser feita após 4 a 5 dias nas folhas inoculadas, ou após 10 a 15 dias, nas folhas que apresentam infecção sistêmica – no caso de *Tobacco mosaic virus* (TMV) e do *Potato virus X* (PVX), por exemplo. Diversos vetores de alta eficiência e ampla faixa de hospedeiro foram desenvolvidos a partir de diferentes vírus (LACORTE; RIBEIRO, 2011; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2011). Os vetores mais utilizados são derivados do TMV e do PVX (CHAPMAN et al., 1992; DONSON et al., 1991), os quais são modificados visando aumentar a estabilidade do inserto e a eficiência de inoculação do vetor viral, melhorar as condições de contenção relativas a biossegurança, facilitar a clonagem de sequências exógenas e elevar o nível de expressão (LACORTE et al., 2010; MARILLONNET et al., 2005). Alguns vetores também

permitem a clonagem de genes para a fusão com peptídeos (*tags*) para facilitar a identificação e purificação das proteínas heterólogas, além de proteínas fluorescentes, ampliando as possibilidades de aplicação desses vetores, por exemplo, em estudos de localização de proteínas na célula (KAGALE et al., 2012; LACORTE et al., 2010).

Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Com o advento das técnicas de sequenciamento em larga escala, uma enorme quantidade de sequências – genômicas e expressas – está sendo gerada. Em uma etapa subsequente, a função ou envolvimento dos diversos genes e sequências candidatas, potencialmente envolvidas nos processos celulares em estudo, precisam ser validados (BECKER; LANGE, 2009).

O silenciamento gênico é uma ferramenta importante, pois fornece informação relevante sobre a função gênica, por meio da genética reversa (BAULCOMBE, 1999; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2011). O gene de interesse pode ser silenciado de forma estável, por meio da obtenção de plantas transgênicas, ou de forma transiente, pela inoculação com um vetor viral. Conforme ressaltado anteriormente, para a expressão de proteínas heterólogas, a obtenção de plantas transgênicas pode demandar muito tempo e trabalho, dependendo do número de genes a serem avaliados, dos métodos de regeneração e transformação e do ciclo de vida da espécie estudada.

Uma alternativa mais rápida e mais simples é o silenciamento gênico induzido por vírus (*virus induced*

gene silencing – VIGS). Com este método pode-se induzir o silenciamento do gene em estudo após um período relativamente curto (2 a 4 semanas), sem a necessidade de produção de plantas transgênicas (LIU et al., 2002; ROBERTSON, 2004).

A técnica de VIGS é baseada na resposta da planta à infecção viral, que inclui o reconhecimento e a indução do silenciamento de sequências do vírus (VOINNET, 2005; ZERBINI et al., 2005). Utilizando-se um vetor viral contendo uma sequência exógena alvo, é possível induzir o silenciamento tanto das sequências do vírus quanto das sequências de interesse. Ao contrário dos vetores utilizados para a expressão de proteínas heterólogas, no VIGS não é necessário incorporar a sequência completa do gene de interesse, bastando apenas um fragmento de, aproximadamente, 300 pb a 500 pb, já que a proteína não será traduzida (NETHRA et al., 2006; PURKAYASTHA; DASGUPTA, 2009).

Diversos vetores foram desenvolvidos e testados (LACORTE; RIBEIRO, 2011; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2011); no entanto, o vetor viral baseado no *Tobacco rattle virus* (TRV), inoculado em *N. benthamiana*, é o sistema mais eficiente atualmente, induzindo o silenciamento de forma consistente e prolongada (LIU et al., 2002; RATCLIFF et al., 2001). O TRV possui ampla faixa de hospedeiros e é utilizado com sucesso em diversas espécies de plantas (MACFARLANE, 2011). Finalmente, outros vetores estão sendo desenvolvidos e testados visando à aplicação da metodologia em grupos específicos de plantas, como

monocotiledôneas (ROBERTSON, 2004; SCOFIELD; NELSON, 2009; WATSON et al., 2005).

Assim como nos vetores virais para expressão heteróloga de proteínas, a inoculação do vetor viral pode ser realizada mecanicamente, a partir de RNA obtido por transcrição *in vitro* (no caso de vírus de RNA), por agroinoculação, ou por biobalística – neste último caso para vetores virais baseados em vírus de DNA ou de RNA, cujo genoma tenha sido clonado após conversão em cDNA (LACORTE; RIBEIRO, 2011; VELÁSQUEZ et al., 2009). À medida que o vetor viral infecta sistemicamente a planta, o silenciamento gênico é induzido, e os efeitos fenotípicos podem ser avaliados após 2 a 4 semanas (NETHRA et al., 2006).

Neste capítulo, serão apresentadas duas metodologias para a produção de proteínas heterólogas em plantas de *N. benthamiana* por expressão transiente: a) agroinfiltração, na qual as plantas são infiltradas com uma suspensão de *Agrobacterium* sp., contendo um vetor binário com o gene *mgfp*, da *green fluorescent protein* (mGFP); b) agroinoculação, na qual as plantas são infiltradas com uma linhagem de *Agrobacterium* sp. contendo um vetor binário que codifica um vetor viral, também contendo o gene *mgfp*. Como exemplo da metodologia de silenciamento induzido por vírus (VIGS), será apresentada a inoculação de plantas de *N. benthamiana* com o vetor viral baseado no TRV, contendo parte da sequência correspondente ao gene da fitoeno desaturase (*pds*).

2 Agroinfiltração para expressão de proteínas heterólogas

2.1 Material

- Espectrofotômetro para leitura de absorbância a 600 nm.
- Linhagem de *Agrobacterium* (GV3101) transformada com vetor binário, contendo o gene *mgfp* (Capítulo 8).
- Linhagem de *Agrobacterium* transformada com vetor binário, contendo um supressor de silenciamento (por exemplo, HC-Pro ou P-19).
- Linhagem de *Agrobacterium* (GV3101) transformada com o vetor binário pGR107-mGFP, contendo a sequência que codifica para o vetor baseado no PVX, com o gene *mgfp* (Figura 1A).
- Meio de crescimento de bactérias (LB ou YEB, Apêndice 1), contendo os antibióticos apropriados (Apêndice 1 e Capítulo 1).
- Plantas de *N. benthamiana* (com cerca de 4 semanas, 4 a 6 folhas).
- Seringas descartáveis de 3 mL ou 5 mL.
- Tampão de infiltração: MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,5, acetosiringona 150 μM (adicionar imediatamente antes de usar) (Apêndice 4).

2.2 Procedimento

Preparação da suspensão de *Agrobacterium* spp.

1. Inocular as linhagens de *Agrobacterium* em meio LB ou YEB, e os antibióticos apropriados, em placas de Petri. Incubar a 28 °C, por 2 dias.
2. Com uma alça de platina, coletar duas a três colônias isoladas de *Agrobacterium* sp. e inocular em 3 mL de meio LB, com os antibióticos apropriados, em tubos de ensaio. Incubar, sob agitação, por 12 a 16 horas, a 28 °C.
3. Transferir 30 µL de cada cultura para tubos de ensaio novos, contendo 10 mL de LB, com os antibióticos apropriados. Incubar por 12 a 16 horas, sob agitação, a 28 °C.
4. Centrifugar os tubos com as culturas, a 4.000 rpm (3.200 g), por 20 minutos.
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 10 mL de meio tampão de infiltração (contendo acetosiringona 150 µM).
6. Ressuspender as culturas, coletar 1 mL da suspensão e medir a absorbância a 600 nm (A_{600}) em um espectrofotômetro.
7. Diluir as suspensões de bactéria para atingir $A_{600} = 0,5$.

Considerar o volume inicial ($V_i = 9$ mL), a A_{600} medida (C_i) e a A_{600} final desejada ($C_f = 0,5$). Elevar a suspensão, calculando o volume final para que se obtenha uma $A_{600} = 0,5$ pela fórmula: $V_f = V_i \times C_i / C_f$, ou seja, $V_f = 9 \times A_{600} / 0,5$

8. Misturar a suspensão de *Agrobacterium* sp. (contendo o vetor binário com o gene *mgfp*) com a suspensão de *Agrobacterium* sp. (contendo o gene supressor de silenciamento HC-Pro), na proporção de 2:1 (por exemplo, 10 mL da suspensão de *Agrobacterium* sp. com o gene *mgfp* e 5 mL da suspensão da linhagem contendo o supressor de silenciamento).

Infiltração das folhas

9. Encher a seringa com a suspensão de bactérias. Remover o ar da seringa.

Utilizar luvas e óculos de proteção.

10. Segurar a folha a ser infiltrada, girar cuidadosamente e apoiar a seringa na superfície abaxial da folha. Mantendo o dedo posicionado na superfície adaxial da folha, pressionar o êmbolo lentamente (Figura 2).

A pressão da seringa contra a folha e o dedo utilizado como apoio na outra face da folha devem ser apenas suficientes para permitir que o espaço intercelular do mesófilo seja infiltrado, e para evitar que a suspensão vaze e escorra da seringa. Não aplicar força em excesso, evitando perfurar a folha infiltrada.

11. Pressionar o êmbolo lentamente, observando a área sendo infiltrada (Figura 2A). Manter a pressão no êmbolo da seringa contra a folha, procurando infiltrar a maior área possível. Será possível visualizar a suspensão bacteriana penetrando no tecido (Figura 2).

Aumentar a pressão, se necessário, e, caso não seja possível prosseguir com a infiltração, posicionar a seringa em outra parte da folha e repetir o processo, garantindo que toda a área foliar seja infiltrada

(Figura 2). Se for preciso, fazer alguns furos na folha, com uma agulha, antes de proceder à infiltração. Marcar as folhas infiltradas (ou áreas infiltradas) com corretivo líquido à base de água.

12. Cultivar as plantas em casa de vegetação, ou câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C, por 3 a 4 dias.
13. Após 3 a 5 dias, analisar as plantas sob luz ultravioleta e observar a fluorescência da GFP.

Para a observação da fluorescência da GFP em microscópio de fluorescência, ver Capítulo 8.

As plantas agroinoculadas com o vetor viral baseado no PVX poderão apresentar fluorescência nas áreas infiltradas de 4 a 5 dias. No entanto, após 10 a 15 dias, as folhas mais novas também deverão apresentar fluorescência da GFP, em consequência da infecção sistêmica do vetor viral baseado no PVX (Figura 2C).

14. Coletar as folhas infiltradas, remover as nervuras e áreas não infiltradas (por exemplo, as partes apical e basal). Coletar as folhas infiltradas e proceder diretamente às análises de detecção de proteínas. Como alternativa, congelar e estocar as folhas a -80 °C, para análises posteriores.

Para detecção de proteínas por *Western blot* e por ELISA, ver Capítulos 19 e 17, respectivamente.

2.3 Observações

Pode ser feita a infiltração com mais de uma linhagem de *Agrobacterium* sp. contendo construções diferentes. Esse tipo de abordagem pode ser utilizado,

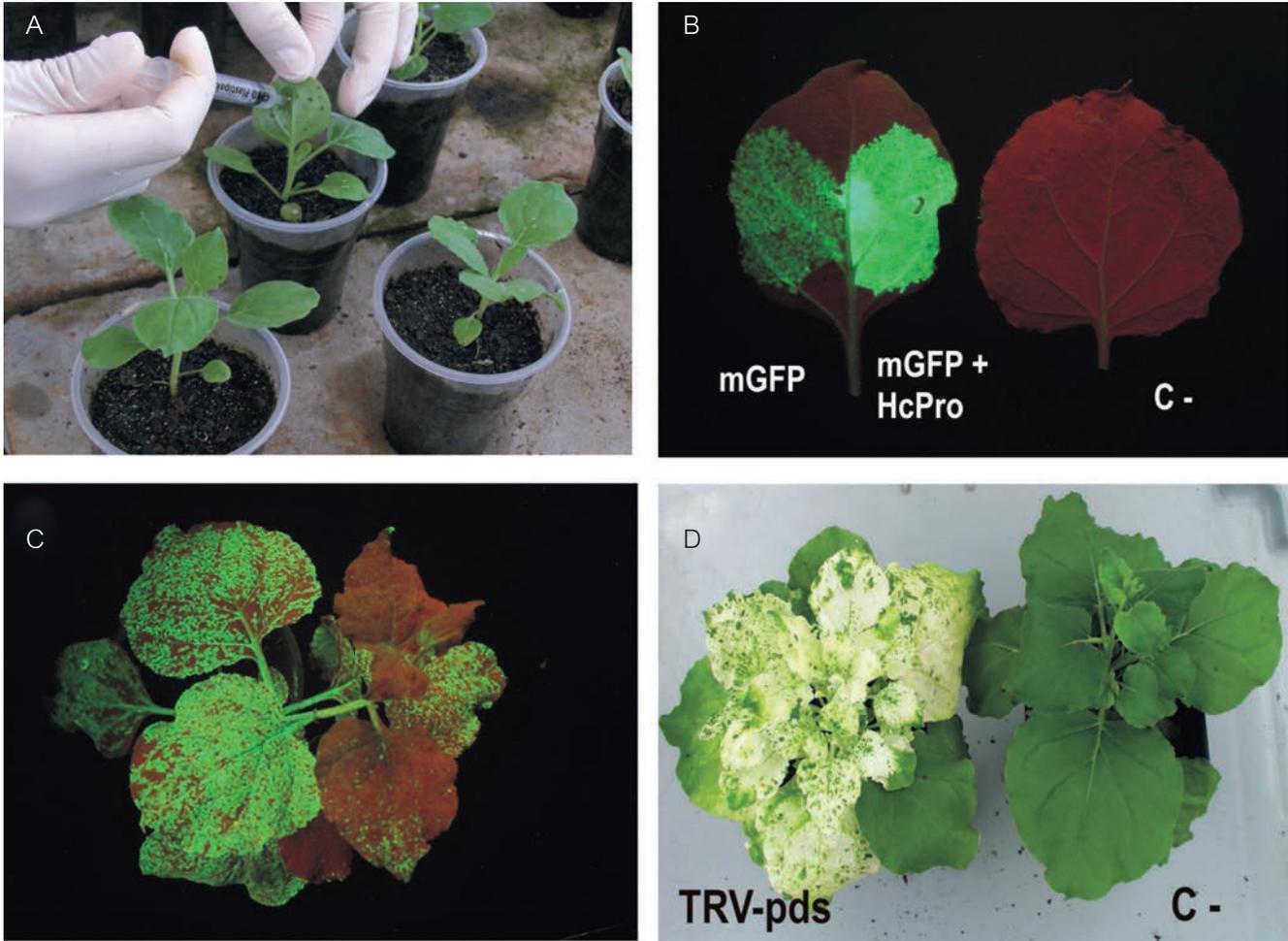
por exemplo, para estudos de interação ou localização de proteínas.

A coinfiltração com *Agrobacterium* sp. contendo gene de supressor de silenciamento é opcional, mas aumenta o nível de expressão do gene de interesse. No exemplo da Figura 2B, foram feitas agroinfiltrações com a linhagem de *Agrobacterium* sp. contendo o gene *mgfp*, e na área à direita foi feita a coinfiltração com a linhagem contendo o supressor de silenciamento HC-Pro. Após 5 dias, a fluorescência de mGFP na região que coexpressa o supressor de silenciamento é mais intensa e pode ser detectada por mais tempo (10 a 12 dias).

A maioria dos vetores virais possivelmente apresenta algum gene com atividade de supressor de silenciamento. Essa atividade, no entanto, pode não ser muito elevada, de forma que a coinfiltração com um supressor de silenciamento “forte” pode aumentar o nível de expressão nas células inoculadas, após 4 a 10 dias. Esse efeito não é observado posteriormente, em áreas infectadas sistemicamente.

O tamanho da planta utilizada para infiltração pode influenciar na eficiência da infiltração. Em geral, plantas com quatro a seis folhas são mais fáceis de infiltrar. As folhas mais novas, não expandidas, independentemente da idade da planta, dificilmente podem ser infiltradas.

Plantas de *N. benthamiana* são relativamente fáceis de serem cultivadas. As sementes são germinadas em substrato ou solo, numa sementeira. Após 10 a 12 dias, as plântulas são cuidadosamente transplantadas para vasos



Fotos: Cristiano Laconte

Figura 2. Expressão transiente e VIGS em plantas de *Nicotiana benthamiana*. A) agroinfiltração em plantas de *N. benthamiana*; B) expressão transiente de GFP em folha infiltrada com *Agrobacterium* sp. contendo um vetor com o gene GFP (folha infiltrada à esquerda e controle; não infiltrada, à direita). Na folha infiltrada, a região à direita foi coinfiltrada com a suspensão contendo o gene do supressor de silenciamento HC-Pro; C) expressão transiente de mGFP a partir de vetor viral baseado no PVX, 15 dias após agroinoculação; note-se a expressão generalizada do gene de interesse devido à dispersão sistêmica do vetor viral; D) planta inoculada com o vetor viral baseado no TRV, contendo parte da sequência do gene *pds*. As áreas brancas indicam o silenciamento do gene *pds*, cerca de 15 dias após a inoculação. Planta infiltrada, à esquerda, e planta controle não infiltrada, à direita.

de 0,2 L a 0,5 L, com solo (Figura 2A). Após 10 a 15 dias em casa de vegetação, as plantas com 4 a 6 folhas estão prontas para serem utilizadas.

3 Agroinoculação de vetores virais para VIGS

3.1 Material

- Espectrofotômetro para leitura de absorbância a 600 nm.
- Linhagens de *Agrobacterium* GV3101 pBinTra6 (plasmídeo contendo o vetor TRV-RNA 1).
- Linhagem de GV3101 pTRV-PDS e pTV00 (plasmídeos contendo os vetores TRV-RNA 2, com um fragmento do gene *pds* e com o mesmo vetor sem inserto).
- Meio de crescimento de bactérias LB ou YEB (Apêndice 1), contendo 50 µg/mL rifampicina e 100 µg/mL canamicina (Apêndice 3 e Capítulo 1).
- Plantas de *N. benthamiana* (com cerca de 4 semanas, 4 a 6 folhas).
- Seringas descartáveis de 3 mL ou 5 mL.
- Tampão de infiltração: MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,5, acetosiringona 150 µM (adicionar imediatamente antes de usar) (Apêndice 4).

3.2 Procedimento

Preparação da suspensão de *Agrobacterium* sp.

1. Preparar as culturas como descrito anteriormente (item 2.2 Procedimento).
2. Ressuspender as culturas em tampão de infiltração.
3. Ajustar a concentração das suspensões ($A_{600} = 0,5$). Misturar as duas culturas na proporção de 1:1.
4. Em cada planta, infiltrar duas folhas diferentes, em uma área de aproximadamente 2 cm² a 3 cm².
5. Cultivar as plantas em casa de vegetação, ou câmara de crescimento, a 22 °C, com fotoperíodo de 16 horas, por 2 a 3 semanas. Observar o aparecimento de sintomas. As plantas inoculadas com o TRV-PDS deverão mostrar áreas brancas nas folhas mais novas, em consequência do silenciamento do gene *pds* (Figura 2).
6. Coletar amostras das folhas para avaliar o silenciamento por detecção de sRNA (Capítulo 14) e/ou quantificação dos níveis de RNA por PCR quantitativa (Capítulo 15), confirmando o silenciamento gênico.
7. Avaliar as plantas inoculadas e silenciadas em função do objetivo do experimento (infecção por patógenos, alterações morfológicas ou metabólicas, etc.).

3.3 Observações

Diversos fatores podem afetar a eficiência de indução do silenciamento (temperatura, concentração do

inóculo, tamanho do inserto, etc.). Com relação às plantas, independentemente da espécie, considera-se que a indução do silenciamento é mais eficiente quando são inoculadas plantas jovens. Esse e outros fatores, como temperatura na câmara de crescimento, concentração do inóculo, etc., devem ser testados e otimizados conforme a espécie e as condições disponíveis.

Alguns sistemas que permitem induzir o silenciamento de forma órgão-específica têm sido desenvolvidos, permitindo assim o estudo de genes cujo silenciamento possa comprometer o desenvolvimento da planta. Além disso, esses vetores possuem genes repórteres que facilitam a identificação dos tecidos silenciados (QUADRANA et al., 2011).

Vetores virais comumente utilizados para produção de proteínas heterólogas e silenciamento gênico em plantas são considerados como grupo de biossegurança do tipo 1. No entanto, o TRV no Brasil é um patógeno quarentenário. Dessa forma, as medidas apropriadas de contenção e descarte do material infectado devem ser seguidas. Essas medidas são essencialmente as mesmas adotadas para manipulação de organismos do grupo 1 (por exemplo, *Agrobacterium* spp. e *Escherichia coli*). Entre outras medidas, as plantas devem ser mantidas em compartimento fechado, com acesso controlado, e todo material infectado deve ser esterilizado por autoclavagem (solo e parte aérea) antes de ser descartado.

4 Referências

- BAULCOMBE, D. C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 2, p. 109-113, 1999.
- BECKER, A.; LANGE, M. VIGS-genomics goes functional. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2009.
- BURGYAN, J.; HAVELDA, Z. Viral suppressors of RNA silencing. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 265-272, 2011.
- CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 549-57, 1992.
- DONSON, J.; KEARNEY, C. M.; HILF, M. E.; DAWSON, W. O. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 88, n. 16, p. 7204-7208, 1991.
- FISCHER, R.; VAQUERO-MARTIN, C.; SACK, M.; DROSSARD, J.; EMANS, N.; COMMANDEUR, U. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 30, p. 113-116, 1999.
- GLEBA, Y.; KLIMYUK, V.; MARILLONNET, S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 134-141, 2007.
- HEFFERON, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. **Virology**, New York, v. 433, n. 1, p. 1-6, 2012.
- KAGALE, S.; UZUHASHI, S.; WIGNESS, M.; BENDER, T.; YANG, W.; BORHAN, M. H.; ROZWADOWSKI, K. TMV-Gate vectors: gateway compatible tobacco mosaic virus based expression vectors for functional analysis of proteins. **Scientific Reports**, London, v. 2, p. 874, 2012.
- KAPILA, J.; DE RYCKE, R.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. **Plant Science**, Limerick, v. 122, n. 1, p. 101-108, 1997.
- KOHLI, A.; MELENDI, P. G.; ABRANCHES, R.; CAPELL, T.; STOGER, E.; CHRISTOU, P. The quest to understand the basis and mechanisms that control expression of introduced transgenes in crop plants. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 1, n. 4, p. 185-195, 2006.
- LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G. Vetores virais: aplicações em genômica funcional e na produção de proteínas recombinantes em plantas.

Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 19, p. 217-271, 2011.

LACORTE, C.; RIBEIRO, S. G.; LOHUIS, D.; GOLDBACH, R.; PRINS, M. Potatovirus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway cloning system. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 7-13, 2010.

LICO, C.; CHEN, Q.; SANTI, L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 216, n. 2, p. 366-377, 2008.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-induced gene silencing in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 777-786, 2002.

MACFARLANE, S. A. Tobravirus - plant pathogens and tools for biotechnology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 577-583, 2011.

MARILLONNET, S.; THOERINGER, C.; KANDZIA, R.; KLIMYUK, V.; GLEBA, Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, n. 6, p. 718-723, 2005.

NETHRA, P.; NATARAJA, K. N.; RAMA, N. A.; UDAYAKUMAR, M. Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector. **Current Science**, Bangalore, v. 90, n. 3, p. 431-435, 2006.

POGUE, G. P.; LINDBO, J. A.; GARGER, S. J.; FITZMAURICE, W. P. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 45-74, 2002.

POGUE, G. P.; VOJDANI, F.; PALMER, K. E.; HIATT, E.; HUME, S.; PHELPS, J.; LONG, L.; BOHOROVA, N.; KIM, D.; PAULY, M.; VELASCO, J.; WHALEY, K.; ZEITLIN, L.; GARGER, S. J.; WHITE, E.; BAI, Y.; HAYDON, H.; BRATCHER, B. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 638-654, 2010.

PURKAYASTHA, A.; DASGUPTA, I. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 47, n. 11/12, p. 967-976, 2009.

QUADRANA, L.; RODRIGUEZ, M. C.; LÓPEZ, M.; BERMÚDEZ, L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; DESCALZO, A.; ASIS, R.; ROSSI, M.; ASURMENDI, S.; CARRARI, F. Coupling virus induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics, in *Arabidopsis* and across all stages of

tomato fruit development. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 1278-1291, 2011.

RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 237-245, 2001.

ROBERTSON, D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 495-519, 2004.

SCOFIELD, S. R.; NELSON, R. S. Resources for virus-induced gene silencing in the grasses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 149, n. 1, p. 152-157, 2009.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 656-665, 2011.

SHARMA, A. K.; SHARMA, M. K. Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 811-832, 2009.

STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2007.

VELÁSQUEZ, A. C.; CHAKRAVARTHY, S.; MARTIN, G. B. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, v. 28, p. 1292, 2009.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 3, p. 206-220, 2005.

VOINNET, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 949-956, 2003.

WATSON, J. M.; FUSARO, A. F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 26, p. 5982-5987, 2005.

YIN, Y.; LI, G.; RENA, X.; HERRLER, G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 335-347, 2007.

ZERBINI, F. M.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 191-244, 2005.

Capítulo 8

Genes repórteres
gus (β -glucuronidase)
e *gfp* (proteína verde-
-fluorescente)

Cristiano Lacorte
Leila Maria Gomes Barros

1 Introdução

Genes repórteres são ferramentas importantes em estudos de biologia molecular e celular e nas metodologias utilizadas para a obtenção de plantas transgênicas. Sua aplicação nessas áreas é ampla, servindo, por exemplo, para identificar células transformadas, monitorar a atividade de um promotor, determinar a localização subcelular de proteínas e aperfeiçoar os métodos de transformação de plantas. Genes repórteres, idealmente, codificam proteínas de fácil detecção e quantificação, sem apresentar atividade endógena detectável no organismo alvo (JIANG et al., 2008; ROSELLINI, 2012; RUIJTER et al., 2003). Nenhum gene repórter atualmente disponível atende a todas essas características; no entanto, muitas de suas limitações podem, pelo menos em parte, ser contornadas pela escolha do gene mais apropriado e sua correta utilização. Na Tabela 1 estão listados os principais genes repórteres utilizados em plantas e algumas de suas características e aplicações. Alguns genes repórteres (*nos*, *ocs*, *cat*, *nptII*, e *lacZ*) estão em desuso, pelo fato de os ensaios de detecção serem laboriosos, utilizarem elementos radioativos ou apresentarem atividade endógena em plantas. Atualmente, os genes repórteres mais utilizados são *gus* e *gfp*, que apresentam diversas vantagens para sua detecção e quantificação (JIANG et al., 2008; MILLWOOD et al., 2008; ROSELLINI, 2012).

β -glucuronidase (GUS)

O gene *uidA* ou *gus*, originário de um operon de *Escherichia coli*, codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) (EC. 3.2.1.31). A GUS é uma hidrolase cuja forma ativa é um tetrâmero constituído por monômeros de peso molecular de 68,2 kDa cada um (GALLAGHER, 1992; JEFFERSON et al., 1986). O gene *gus* vem sendo amplamente utilizado como repórter desde que foi testado pela primeira vez em plantas transgênicas (JEFFERSON et al., 1987). Os métodos de detecção da atividade enzimática da GUS são simples, rápidos e versáteis, por existirem substratos comerciais que podem ser utilizados em ensaios histoquímicos, fluorimétricos e espectrofotométricos (GALLAGHER, 1992), contribuindo para sua ampla aceitação. Soma-se a essas características o fato de a maioria das espécies de plantas não apresentar atividade endógena significativa. A GUS não requer cofator, é bastante estável, resistente a diversos solventes e detergentes e ativa em ampla faixa de pH (5,0 a 9,0). Quando fusionada a outras proteínas, tanto na região N- como na C-terminal, a GUS, geralmente, não perde atividade, podendo ser transportada para cloroplastos, núcleo e outras organelas (GALLAGHER, 1992; JEFFERSON et al., 1987).

A principal limitação para o uso da GUS como repórter é o fato de os ensaios para sua detecção não permitirem a sobrevivência do tecido analisado. Outras limitações, como a atividade endógena semelhante à GUS, presente em algumas espécies e tipos de tecidos, normalmente podem ser contornadas com ajustes nas condições do ensaio (ALWEN et al., 1992; HODAL et al., 1992; THOMASSET et al., 1996).

Tabela 1. Genes repórteres utilizados em plantas.

Gene	Proteína	Origem	Deteção	Referência
<i>nos</i>	Nopalina sintase	T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Eletroforese em papel	Bevan et al. (1983)
<i>ocs</i>	Octopina sintase	T-DNA de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cromatografia com uso de (¹⁴ C) arginina	Maille (1983)
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferase	Transposons e plasmídios bacterianos	Cromatografia em papel com uso de (¹⁴ C) cloranfenicol	Pröls et al. (1988)
<i>nptII (neo)</i>	Neomicina fosfotransferase II ou aminoglicosídeo 3'fosfotransferase II	Transposon Tn5 de <i>Escherichia coli</i>	Eletroforese em papel com uso de (γ^{32} P) ATP	Herrera-Estrella et al. (1983)
<i>lacZ</i>	β -galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	Ensaio enzimáticos colorimétricos, fluorimétricos e histoquímicos	Teeri et al. (1989)
<i>uidA (gus)</i>	β -glucuronidase	<i>Escherichia coli</i>	Ensaio enzimáticos histoquímicos e fluorimétricos	Jefferson et al. (1987)
<i>luc</i> ou <i>lux</i> ou <i>ruc</i>	Luciferase	Vaga-lume (<i>Photinus pyralis</i>), bactéria (<i>Vibrio fischeri</i>) ou coral (<i>Renilla reniformis</i>)	Ensaio enzimático luminométrico	Koncz et al. (1987), Mayerhofer et al. (1995) e Ow et al. (1986)
<i>gfp</i> e demais variantes	<i>Green fluorescent protein</i>	Água-viva (<i>Aequorea victoria</i>)	Microscopia de fluorescência, luz ultravioleta	Chiu et al. (1996) e Millwood et al. (2008)
DsRed2 e eqFP611	<i>Red fluorescents proteins</i>	Coral (<i>Discosoma</i> sp.) e anêmona (<i>Entacmaea quadricolor</i>), respectivamente	Microscopia de fluorescência, luz ultravioleta	Forner e Binder (2007), Kremers et al. (2011) e Nishizawa et al. (2006)
<i>R</i> e <i>C1</i>	Proteínas envolvidas com a síntese de antocianinas	Milho (<i>Zea mays</i>)	Microscopia de luz	Ludwig et al. (1990)

Proteína verde-fluorescente (green fluorescent protein – GFP)

A GFP é originária da água-viva *Aequorea victoria*, encontrada na costa do Pacífico, na América do Norte. Esta proteína emite luz verde (508 nm) quando excitada pela luz azul ou ultravioleta (475 nm e 395 nm, respectivamente) (CHIU et al., 1996; CUBITT et al., 1995). Por ser autofluorescente, não necessita de substratos exógenos ou cofatores, de forma que a observação da fluorescência pode ser feita in vivo. A GFP tem sido amplamente utilizada como repórter em estudos de microrganismos, animais e vegetais (CHALFIE et al., 1994; CHIU et al., 1996; KREMERS et al., 2011). A GFP apresenta 238 resíduos de aminoácidos, com 27 kDa (CHIU et al., 1996; CUBITT et al., 1995). Permite fusões tanto N- como C- terminais (GREBENOK et al., 1997; HANSON; KOHLER, 2001).

O gene *gfp* nativo apresenta sítios crípticos que são reconhecidos como introns quando expressos em plantas, comprometendo a síntese de transcritos completos e o correto dobramento da proteína, resultando em baixa fluorescência (HASELOFF et al., 1997). Para contornar esses problemas, diversas variantes sintéticas e mutantes da GFP foram produzidas, procurando eliminar os sítios de reconhecimento de introns, além de modificar os espectros de absorção e emissão, a fotoestabilidade, a resistência a pH ácido, a velocidade de formação do cromóforo, entre outras propriedades físicas (CHIU et al., 1996; DOBBIE et al., 2008; ; HANSON;

KOHLER, 2001; HASELOFF et al., 1997; KREMERS et al., 2011; SHANER et al., 2005). A GFP é a proteína fluorescente mais estudada e mais utilizada como repórter. Atualmente, porém, diversas outras proteínas autofluorescentes estão disponíveis, sendo utilizadas em aplicações variadas, como a localização subcelular de proteínas, a atividade de proteases e fatores de transcrição, a translocação de Ca^{2+} e alterações no pH celular, o movimento de organelas e proteínas na célula e o estudo das interações entre proteínas por métodos como *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) e *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Com o aperfeiçoamento das técnicas e equipamentos de microscopia de fluorescência, as proteínas autofluorescentes tornaram-se ferramentas essenciais para a biologia celular (KREMERS et al., 2011; MILLWOOD et al., 2008; SHANER et al., 2005).

Ao contrário da GUS, a fluorescência da GFP e demais proteínas fluorescentes não é resultante de uma reação enzimática, cujo produto aumenta com o tempo. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional ao número de moléculas presentes na célula, o que dificulta a detecção quando há pouca expressão da GFP (CHALFIE et al., 1994; DOBBIE et al., 2008; RUIJTER et al., 2003).

Neste capítulo, são descritos protocolos usados para detecção histoquímica e fluorimétrica da GUS e para detecção de GFP em células vegetais e em plantas.

2 Ensaio histoquímico para detecção da presença da GUS em tecidos vegetais

2.1 Material

- Água destilada.
- Solução de etanol 70% (v/v).
- Tampão de reação (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão fosfato de sódio 1 M pH 7,0	10 mL	100 mM
Ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$)	65,8 mg	2 mM
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	372 mg	10 mM
Triton X-100	100 μ L	0,1%
X-Gluc 50 mg/mL	1 mL	1 mM
H_2O	q.s.p. 100 mL	

Esterilizar a solução for filtração, distribuir em alíquotas (por exemplo, 5 mL) e manter a -20 °C.

- Tampão fosfato de sódio 1 M, pH 7,0 (Apêndice 4).
- Solução de X-Gluc 50 mg/mL (1 mL): pesar 50 mg de X-Gluc e dissolver em 1 mL de DMSO, ou dimetilformamida, ou metanol. Acrescentar ao tampão de reação.



Dimetilformamida (DMF) é altamente tóxico, inflamável e irritante para os olhos. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.



Metanol é altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão, provoca cegueira e queimaduras profundas. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

2.2 Procedimento

O ensaio histoquímico é muito utilizado para identificar plantas ou tecidos transformados, para otimizar as condições de transformação e para estudos de expressão gênica, particularmente a atividade tecido-específica de promotores. O substrato utilizado, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-Gluc), forma um precipitado azul quando hidrolisado pela GUS (JEFFERSON, 1987) (Figura 1).

1. Incubar o tecido no tampão de reação, em volume suficiente para cobrir a amostra. Vedar o recipiente, para evitar a evaporação.

Recomenda-se que seja usado o menor volume possível de tampão, devido ao custo elevado do X-gluc. Placas para ELISA ou tubos de microcentrifuga são bem apropriados para a reação.

2. Incubar no escuro, a uma temperatura entre 25 °C e 37 °C. Dependendo da atividade da GUS na amostra, a reação pode levar desde alguns minutos até 16 horas ou mais.

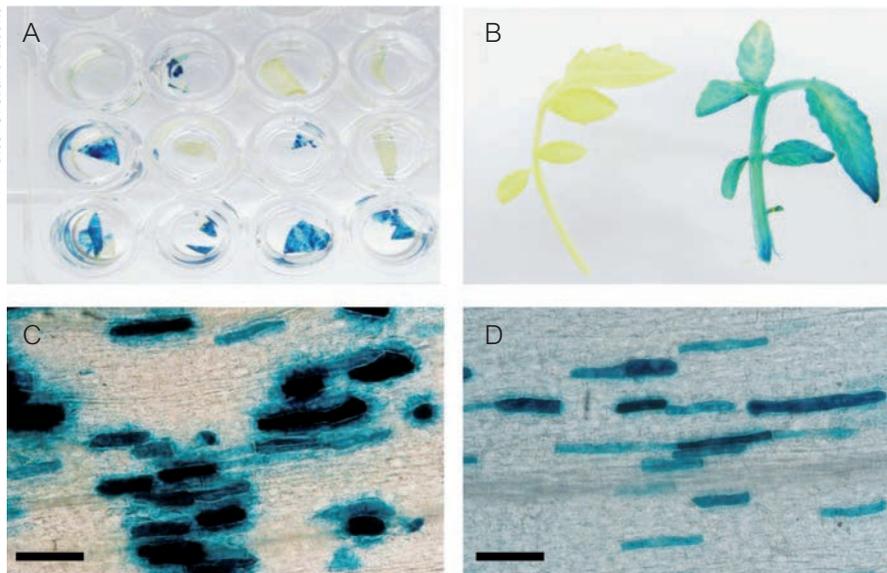


Figura 1. Ensaio histoquímico da atividade de GUS: A) Exemplo de ensaio para detectar a expressão em tecidos de plantas potencialmente transgênicas, feito em placas ELISA de 24 poços; B) Folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) transgênico, contendo o gene *gus* (direita), e controle não transformado (esquerda); C e D) Expressão transitória de GUS em folhas de alho (*Allium sativum*) transformadas por biobalística. Os ensaios foram feitos em tampões contendo 0,5 mM (C) e 5 mM (D) de ferricianeto de potássio. Barra = 50 μ m.

É importante avaliar o desenvolvimento da reação periodicamente. Reações prolongadas podem levar à oxidação dos tecidos.

- Retirar o tampão de reação e adicionar etanol 70%, para interromper a reação e remover a clorofila, permitindo melhor visualização da coloração azul. Após 24 a 48 horas, observar as amostras no microscópio estereoscópico ou no microscópio de luz.

2.3 Observações

O ensaio histoquímico para detecção da atividade da GUS requer algumas precauções na sua execução e na interpretação dos resultados. A difusão do produto

da primeira etapa da reação (5-bromo-4-cloro-indoxil) para os tecidos adjacentes pode induzir o acúmulo do produto final (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo) longe do sítio de localização da GUS (CAISSARD et al., 1994; GUIVARC'H et al., 1996). Para minimizar a difusão do produto da reação, recomenda-se adicionar ao tampão de reação um agente oxidante, como o ferricianeto de potássio – $K_3Fe(CN)_6^-$, que também pode ser utilizado juntamente com o ferrocianeto de potássio – $K_4Fe(CN)_6$. Concentrações entre 0,5 mM e 5 mM diminuem a difusão do produto da reação (Figura 1C e 1D); porém, concentrações elevadas inibem a atividade da GUS (GUIVARC'H et al., 1996).

O uso de GUS em estudos de promotores e mecanismos de regulação da transcrição gênica em plantas pode ser influenciado pela elevada estabilidade citoplasmática da enzima. Portanto, ensaios criteriosos, com a correta e cuidadosa interpretação dos resultados são essenciais, principalmente para este tipo de estudo.

No ensaio histoquímico, dependendo do tipo de tecido, pode ser difícil garantir a penetração do substrato X-Gluc nas camadas internas; por isso, recomenda-se colocar a reação por 30 a 60 segundos sob vácuo parcial antes da incubação a 37 °C.

Algumas espécies de plantas apresentam atividade endógena semelhante à GUS, particularmente em órgãos reprodutivos e gametas (HODAL et al., 1992). Em geral, essa atividade é mais elevada em pH em torno de 5,0, enquanto o pH ótimo para a GUS de *E. coli* é em torno de 7,0 (ALWEN et al., 1992; HODAL et al., 1992). A GUS endógena é mais sensível à temperatura e, para inativá-la, recomenda-se incubar a amostra a 50 °C, por 30 a 60 minutos, antes da reação (HODAL et al., 1992). A presença de microrganismos endofíticos que apresentam atividade semelhante à GUS pode levar a erros na interpretação dos resultados (TÖR et al., 1992).

O gene *gus* pode ser transcrito por *Agrobacterium* spp., levando a falsos positivos em experimentos de transformação, principalmente no período logo após a cocultura (Capítulo 6). Para contornar esse problema, foram desenvolvidos vetores nos quais foi introduzido

um intron no gene *gus*, que é excisado apenas pelo sistema eucarioto, impedindo assim a expressão de *gus* em *Agrobacterium* spp. (VANCANNEYT et al., 1990).

Alguns tipos de tecidos podem sofrer oxidação durante a reação da GUS. Nesse caso, deve-se diminuir o tempo de incubação ou acrescentar, ao tampão de reação, ácido ascórbico ou polivinilpirrolidona-40 (PVP-40) na concentração de 1% a 2%. Como alternativa, podem ser testados outros tampões, tais como Tris, MES, tampão citrato e MOPS (ALWEN et al., 1992).

O ensaio histoquímico, apesar de não ser um método quantitativo, pode ser utilizado para estimar a eficiência da transformação genética por biobalística (RUSSELL et al., 1992).

3 Ensaio fluorimétrico para quantificação da atividade específica da GUS

O ensaio fluorimétrico é utilizado para quantificar a atividade da GUS em extratos de tecidos de plantas transgênicas ou de explantes. O substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) é hidrolisado pela GUS, resultando em ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (MU), que apresenta fluorescência em pH alcalino (JEFFERSON, 1987).

3.1 Material

- Cubetas apropriadas à luz ultravioleta.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Fluorímetro com comprimento de onda de excitação em torno de 360 nm, e emissão de 460 nm.
- Solução padrão de MU 1 mM: pesar 19,8 mg de MU e diluir em 100 mL de água destilada.
- Tampão de extração GUS (100 mL):

Componente	Volume	Concentração final
Tampão fosfato de sódio 1 M, pH 7,0	10 mL	100 mM
EDTA 500 mM	2 mL	10 mM
Sarcosil 30%	330 µL	0,1%
Triton X-100	100 µL	0,1%
DTT 1M	100 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tampão de parada (Na₂CO₃ 0,2 M): dissolver 21,2 g de Na₂CO₃ em 600 mL de água destilada esterilizada por autoclavagem e completar o volume para 1 L.
- Tampão de reação (MUG 2 mM): pesar 22 mg de MUG e dissolver em 25 mL de tampão de extração. Preparar imediatamente antes da utilização.

- Tampão fosfato de sódio 1 M, pH 7,0 (Apêndice 4) ou fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 100 mM, pH 7,0.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL ou placas para ELISA de 96 poços.
- Tubos de microcentrífuga de 2 mL ou placas para ELISA de 24 poços.

3.2 Procedimento

Extração

1. Macerar 30 mg a 100 mg de cada tecido a ser testado em 300 µL a 500 µL de tampão de extração em tubos de microcentrífuga e centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos.

Para facilitar a coleta de tecido foliar, podem-se usar a própria tampa do microtubo para retirar discos foliares. Dois discos são suficientes para o ensaio (~30 mg).

Como a GUS é muito estável, geralmente, pode-se macerar os tecidos à temperatura ambiente.

Entre as amostras a serem testadas, deve-se incluir uma amostra de tecido não transformado, como controle (branco da reação).

2. Transferir o sobrenadante para novos tubos.

Extratos de plantas transgênicas, contendo a GUS, podem ser mantidos a 4 °C por alguns dias ou a -80 °C por alguns meses, embora possa haver decréscimo da atividade da GUS. Os extratos não devem ser mantidos a -20 °C, pois a essa temperatura a enzima não se mantém estável.

- Retirar uma alíquota (50 μL a 100 μL) de cada extrato para, posteriormente, determinar a concentração de proteína total (Capítulo 20).

Calibração do fluorímetro

- Ligar o fluorímetro e aguardar por cerca de 15 minutos. Ajustar o “zero”, com 2 mL de Na_2CO_3 0,2 M.

Qualquer modelo de fluorímetro equipado com filtros de excitação em torno de 360 nm ou 460 nm pode ser utilizado para quantificar a fluorescência do MU. O protocolo, aqui descrito, utiliza os modelos mais simples e acessíveis, os quais utilizam cubetas para leitura da fluorescência das amostras.

Utilizar cubetas apropriadas para luz UV, de acordo com as especificações do aparelho.

- Diluir 10 μL da solução padrão de MU 1 mM em 10 mL de H_2O (concentração final de 1 μM). A seguir, diluir na própria cubeta utilizada no fluorímetro, adicionando 100 μL de MU 1 μM em 1.900 μL de Na_2CO_3 0,2 M (concentração final de MU = 50 nM).

O estoque de MU 1 mM pode ser guardado a 4 °C, no escuro, por 1 mês. As diluições (1 μM e 50 nM) devem ser preparadas antes da utilização.

- Posicionar a cubeta com a solução de MU 50 nM no fluorímetro e ajustar o aparelho para 500 unidades. Portanto, 10 unidades de fluorescência correspondem a 1 nM de MU.

Para os fluorímetros com leitoras de placas, deve-se fazer uma curva de calibração com diferentes concentrações de MU.

Reação

- Distribuir alíquotas de 1.980 μL de tampão de parada em placas para ELISA (de 6 ou 24 poços) ou em tubos de microcentrífuga.
- Para obter o tempo zero, transferir 10 μL de tampão de reação e 10 μL de extrato para o tampão de parada.

O tempo zero da reação pode apresentar fluorescência em razão da presença de compostos no extrato ou no tampão de reação, decorrente da degradação espontânea do substrato.

- Distribuir 100 μL de tampão de reação em placas para ELISA de 96 poços ou tubos de microcentrífuga. Incubar a 37 °C, por cerca de 10 minutos.
- Iniciar a reação, adicionando 100 μL de cada extrato ao tampão de reação, na placa para ELISA (etapa 7 deste item). A seguir, imediatamente, marcar o tempo e incubar a placa ou os tubos com a reação a 37 °C, no escuro.

É recomendável incluir uma amostra sem extrato, para avaliar a degradação espontânea do substrato.

- Retirar alíquotas de 20 μL da reação, a cada 10 ou 15 minutos, e transferir para 1.980 μL de tampão de parada. Coletar, no mínimo, quatro intervalos de tempo.

Os parâmetros aqui apresentados devem servir apenas como um exemplo para determinar a atividade específica da GUS em extratos de tecidos vegetais. Dependendo do nível de atividade da GUS e do tipo de fluorímetro utilizado, pode ser necessário variar o tempo de reação, o volume de extrato na reação, a concentração de proteína dos extratos ou o volume das alíquotas transferidas para o tampão de parada. Por exemplo, se uma amostra apresentar fluorescência acima de 500 unidades, recomenda-se diminuir o volume da alíquota a ser quantificada ou diluir o extrato proteico da reação.

12. Medir a fluorescência das amostras no fluorímetro.

O produto da reação (MU) é degradado com a luz, inclusive durante a leitura no fluorímetro; por isso, as unidades de fluorescência devem ser anotadas logo após posicionar a cubeta no aparelho, pois a fluorescência tende a diminuir.

13. Determinar a concentração de proteína total no extrato (Capítulo 20) e calcular a atividade específica de GUS (etapa 14 deste item).

Cálculo da atividade específica de GUS

14. Calcular a atividade específica da GUS de acordo com a fórmula abaixo (ROBIC, 2005). A atividade é expressa em picomoles (pmol) de MU (produto da reação) por minuto e por mg de proteína presente na reação.

$$AE_{GUS} = \frac{U_{f(MEDIDA)}}{U_{f(CALIBRAÇÃO)}} \times \frac{V_{REAÇÃO}}{V_{EXTRATO}} \times \frac{F_{DILUIÇÃO}}{V_{MEDIDO} \times C_{PROTEÍNA}}$$

em que:

AE_{GUS} = atividade específica de GUS [pmol MU/(min·mg)]

$U_{f(CALIBRAÇÃO)}$ = fluorescência correspondente a 1 pmol MU

$U_{f(MEDIDA)}$ = fluorescência por minuto

$V_{REAÇÃO}$ = volume de reação (mL)

$V_{EXTRATO}$ = volume de extrato utilizado no ensaio (mL)

V_{MEDIDO} = volume da reação usada na medição (mL)

$C_{PROTEÍNA}$ = concentração de proteína total na amostra (mg/mL)

$F_{DILUIÇÃO}$ = fator de diluição da amostra

15. A seguir, será descrito um exemplo de cálculo da atividade específica de GUS.

Leitura da fluorescência

No exemplo a seguir, foram utilizadas amostras obtidas de uma planta transgênica contendo o gene *gus* e de outra planta não transformada (controle negativo). Os valores de fluorescência obtidos, subtraindo-se o valor do tempo zero, foram plotados em função do tempo de reação, e calculada a equação da reta e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) (Figura 2).

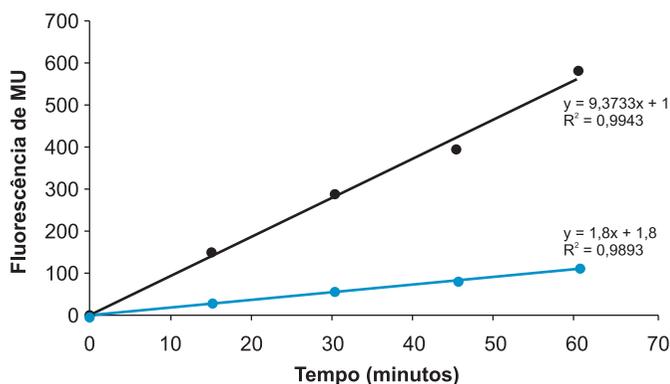


Figura 2. Fluorescência de MU após reação com extrato de planta transgênica contendo o gene *gus* (●) e de planta não transformada (●).

Calibração do fluorímetro

Na calibração do fluorímetro, 10 unidades de fluorescência (U_f) correspondem a 1 nM de MU (etapa 6 do item 3.2 Procedimento). Como a atividade de GUS

é expressa em picomoles (pmol) de MU (produto da reação) por minuto e por mg de proteína presente na reação, é necessário converter a unidade de MU, de nM para pmoles. Para converter 1 nM de MU em nmol de MU, multiplica-se o valor em nM pelo volume da cubeta em litros (por exemplo, 2 mL = 0,002 L) e, a seguir, por 1.000, para transformar nmoles em pmoles; então: 1 nM de MU = 2 pmol de MU. Portanto, se 2 pmol MU correspondem a $10 U_f$, logo, no volume da cubeta, 1 pmol de MU corresponde a $5 U_f$; assim, $U_{f(CALIBRAÇÃO)} = 5$.

Determinação da atividade por minuto

Para calcular a atividade por minuto, escolhe-se um intervalo de tempo, dentro do intervalo linear da reação; por exemplo, 30 minutos. Calcula-se o valor da fluorescência pela equação da reta – nesse exemplo, 282,2 unidades de fluorescência em 30 minutos de reação, ou seja, 9,4 unidades de fluorescência por minuto ($U_{f(MEDIDA)}$). Subtrair o valor da fluorescência por minuto da amostra controle (planta não transformada): $U_{f(MEDIDA)} = 9,4 - 1,86 = 7,54$.

Determinação da atividade específica

A atividade específica de uma enzima leva em conta a quantidade de proteína na reação. Portanto, é necessário determinar a concentração da proteína no extrato ($C_{PROTEÍNA}$) (Capítulo 20), e determinar quanto desse total de proteína está presente na reação, considerando-se o volume de extrato utilizado – por exemplo, $V_{REACÃO} = 0,2$ mL e $V_{EXTRATO} = 0,1$ mL – e o volume dessa reação que foi utilizado na quantificação ($V_{MEDIDO} = 0,02$ mL)

(etapa 10 do item 3.2 Procedimento). Supondo que o extrato da planta transgênica nesse exemplo contenha 2,0 mg/mL, utilizando a equação (etapa 14 do item 3.2 Procedimento), a atividade específica da GUS (*AEGUS*) será de 75,4 pmol MU/minuto/mg de proteína.

3.3 Observações

Na fórmula apresentada na etapa 14 do item 3.2 Procedimento, o fator de diluição da amostra ($F_{DILUIÇÃO}$) representa a diluição do extrato proteico antes de ser adicionado à reação. Se o extrato for utilizado sem prévia diluição, considerar $F_{DILUIÇÃO} = 1$.

Alguns modelos de fluorímetro permitem o ajuste da intensidade da luz de excitação, como também da luz que chega ao detector (*slit opening*), influenciando diretamente o sinal obtido e a sensibilidade do método. Também pode ser necessário, dependendo do tipo de fluorímetro, calibrar as unidades da fluorescência correspondentes a 1 pmol de MU.

A quantificação da atividade da GUS pode ser realizada em fluorímetros com dispositivos para leitura de placas de ELISA de 96 poços. Esse tipo de ensaio é mais rápido e permite a análise simultânea de um grande número de amostras (CERVERA, 2005; GALLAGHER, 1992).

A atividade da GUS é inibida por íons divalentes, daí a adição de EDTA. O ditioneitol (DTT) é adicionado para estabilizar a enzima, podendo ser substituído por β -mercaptoetanol 10 mM (JEFFERSON et al., 1987).

A atividade enzimática da GUS também pode ser quantificada espectrofotometricamente. Neste ensaio, o substrato utilizado é o p-nitrofenil- β -D-glucuronídeo (PNPG), cujo produto da reação, p-nitrofenol, apresenta cor amarela em pH alcalino (JEFFERSON, 1987). Apesar de a sensibilidade do ensaio espectrofotométrico ser muito inferior à do método fluorimétrico (cerca de 100 vezes), o primeiro é um método simples e eficiente, sendo uma boa alternativa caso não haja um fluorímetro disponível.

Um ensaio qualitativo rápido, utilizando como substrato o PNPG ou MUG, pode ser utilizado para identificar plantas ou tecidos transgênicos. Pequenas amostras do tecido são maceradas diretamente no tampão de reação adicionado de PNPG ou MUG. Após incubar as amostras a 37 °C, observar a formação de coloração amarela no caso da reação com PNPG, e a fluorescência, sob luz ultravioleta, da reação com MUG.

4 Observação da fluorescência da GFP ao microscópio

A observação da fluorescência da GFP em tecidos vegetais é extremamente simples, utilizando-se um microscópio de luz ou estereoscópico com luz UV e os filtros apropriados (Figura 3). É importante que a observação seja feita em uma sala escura, evitando a interferência de outras fontes de luz na visualização da fluorescência.

4.1 Material

- Água destilada.
- Bisturi.
- Lâminas e lamínulas para microscopia.
- Microscópio de fluorescência, com luz UV e filtros apropriados (por exemplo, filtro BP 450-490 nm excitação/BP 515-565 emissão ou filtro PB 450-490 excitação/LP 420 emissão).
- Plantas, tecidos ou células do mesmo material, porém, não transformadas (controle negativo).
- Plantas, tecidos ou células expressando o gene *gfp*.

4.2 Procedimento

1. No microscópio, ligar a fonte de luz UV e aguardar por, aproximadamente, 5 minutos.
2. Com o bisturi, cortar um pedaço do tecido a ser observado (aproximadamente 1 cm²), colocar sobre uma lâmina, adicionar algumas gotas de água destilada e, cuidadosamente, posicionar a lamínula.
3. Posicionar a lâmina no microscópio, ligar a fonte de luz visível e ajustar o foco.
4. Desligar a luz visível, ajustar a luz UV e os filtros apropriados.

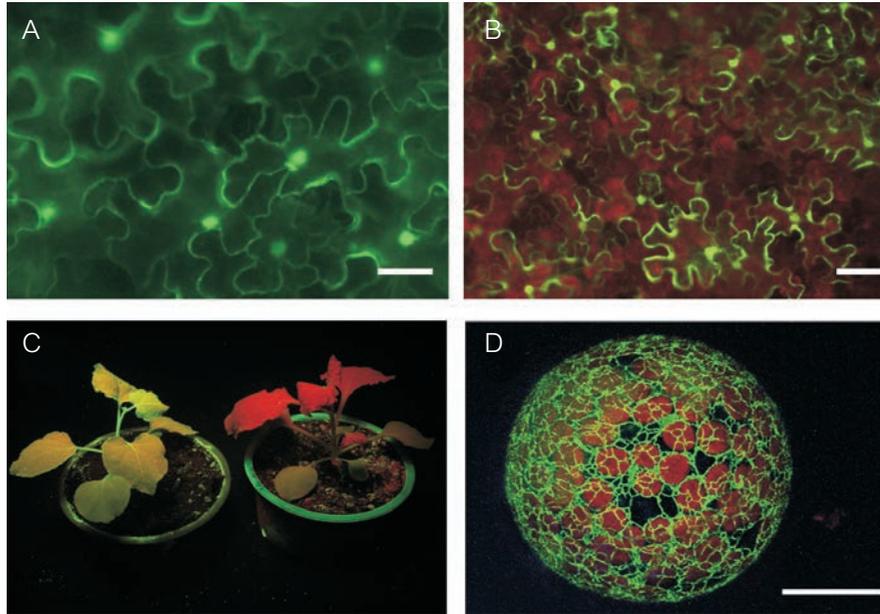


Figura 3. Detecção da fluorescência de GFP em plantas, tecidos e células vegetais. A e B) Fluorescência em células da epiderme de folhas de *Nicotiana benthamiana* ao microscópio de fluorescência utilizando os filtros (A) BP 450-490 nm / BP 515-565 (excitação/emissão) e (B) PB 450-490 / LP 420 (excitação/emissão) (etapa 4 do item 4.2 Procedimento). C) Plantas de *N. benthamiana* sob luz ultravioleta: planta transgênica (esquerda) contendo o gene *mgfp*, apresentando fluorescência da GFP e planta não transformada (direita), apresentando apenas a fluorescência vermelha da clorofila. D) Detecção da fluorescência de GFP em microscópio confocal: protoplasto de folhas de *N. benthamiana* infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* (Capítulo 7) apresentando fluorescência no retículo endoplasmático. Barra = 25 μ m.

Ao observar uma amostra de folha, se for utilizado um filtro do tipo *longpass* (LP) (por exemplo, um filtro PB 450-490 excitação/LP 420 emissão), serão visualizadas a fluorescência verde da GFP e a fluorescência vermelha da clorofila. Se o nível de expressão de GFP for baixo, sua fluorescência poderá não ser claramente observada. Nesse caso, um filtro *bandpass* (BP) (por exemplo, BP 450-490 nm excitação/BP 515-565 emissão) que bloqueia os comprimentos de onda acima de 565 nm pode ser necessário, barrando a fluorescência vermelha emitida pela clorofila (~ 650 nm) e evidenciando a fluorescência da GFP (Figuras 3A e 3B).

- Uma vez selecionados os filtros e o campo apropriado no microscópio, captar a imagem com máquina fotográfica digital. No programa utilizado para a obtenção das imagens, pode ser necessário variar, por exemplo, o tempo de exposição e o balanço das cores, para obter o resultado esperado.

A incidência de luz UV pode causar danos às células, aos tecidos e à GFP (*photobleaching*, destruição fotoquímica do fluoróforo), afetando a intensidade da fluorescência e, conseqüentemente, a qualidade da imagem. Portanto, é importante que a observação e obtenção de imagens sejam feitas dentro do menor intervalo de tempo possível.

4.3 Observações

A expressão do gene repórter *gfp* pode ser detectada in vivo. Essa característica permite uma melhor visualização da célula, evitando os problemas associados à fixação do tecido. O potencial das técnicas que envolvem a detecção de proteínas fluorescentes pode ser mais bem aproveitado em um microscópio confocal de fluorescên-

cia. Além de maior sensibilidade, a microscopia confocal de fluorescência amplia as possibilidades de análises. Fusões com a GFP e outras proteínas fluorescentes permitem, por exemplo, estudar a interação entre proteínas e monitorar alterações de expressão ou determinar a localização subcelular de uma determinada proteína (Figura 3C). A preparação do material para observação em microscopia confocal de fluorescência é essencialmente a mesma que aquela para um microscópio óptico de fluorescência. Células em suspensão e células da epiderme de cebola transformadas ou protoplastos obtidos a partir de folhas infiltradas com *Agrobacterium* sp. (Capítulo 7) são alguns dos sistemas mais utilizados, pois permitem uma melhor visualização ao microscópio.

Apesar de não apresentar sinal de localização nuclear ou qualquer outro peptídeo de endereçamento subcelular, a GFP, quando expressa em eucariotos, em razão de seu tamanho, difunde-se livremente para o interior do núcleo (Figura 2A e 2B). Quando fusionada, a outra proteína pode perder a capacidade de atravessar os poros nucleares (GREBENOK et al., 1997).

Para estudos de localização subcelular, é importante que sejam incluídos marcadores apropriados para cada tipo de organela, os quais podem ser corantes ou proteínas cuja localização é bem conhecida. Alguns exemplos desses marcadores são o DAPI, que se liga ao DNA (358/461 nm excitação/emissão), e o MitoTracker, com diferentes faixas de excitação/emissão, específico para mitocôndrias.

Existem diversas proteínas fluorescentes, algumas derivadas da GFP, com diferentes propriedades e aplicações. O tipo de filtro utilizado deve ser apropriado para cada versão. Os filtros BP 450-490 nm excitação/BP 515-565 (ou LP 420) emissão, por exemplo, podem ser utilizados para a GFP nativa, mGFP, eGFP (S65T), GFP red shifted (rsGFP), entre outras.

A fluorescência endógena do tecido pode interferir e até mesmo inviabilizar a observação da GFP. Em geral, essa fluorescência vem de compostos presentes na parede celular. É difícil diferenciar a fluorescência endógena do tecido da fluorescência específica da GFP, mas, de modo geral, a fluorescência endógena apresenta uma tonalidade mais amarelada ou castanha. Para auxiliar a observação e a interpretação das imagens, é importante observar amostras de tecido não transformado. Da mesma forma, tecido que expressa GFP pode servir como controle positivo, facilitando a interpretação das imagens e o ajuste do microscópio. (BILLINTON; KNIGHT, 2001).

Para experimentos de expressão transiente, a epiderme de cebola (*Allium cepa* L.) é um tecido bastante conveniente. É um material de fácil obtenção, a preparação das lâminas é simples, as células são grandes, e não apresentam cloroplastos, nem outras fontes de autofluorescência que sejam significantes. Para a utilização desse material, as escamas (catáfilos), preferencialmente das camadas intermediárias do bulbo, são separadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm² e posicionadas numa placa de Petri com a epiderme interna

(adaxial) voltada para cima. O material é transformado por biobalística (Capítulo 5) e incubado no escuro por 12 a 24 horas. A seguir, a epiderme é cuidadosamente removida, com a ajuda de uma pinça, posicionada em uma lâmina sobre uma gota de água e observada ao microscópio de fluorescência (VARAGONA et al., 1992).

5 Observação e obtenção de imagens da fluorescência de GFP in planta

5.1 Material

- Filtro amarelo (K2, 8 ou 022).
- Fonte de luz UV (UV longo, 365 nm).



A exposição à **radiação ultravioleta** pode causar danos à retina e à pele. Sua manipulação deve ser feita com óculos de proteção específicos para luz UV. Procurar não expor a pele, usando jaleco de mangas longas e luvas.

- Máquina fotográfica digital.
- Plantas ou tecidos que expressam GFP (versão mGFP5).
- Tripé ou algum tipo de suporte para a máquina fotográfica.

5.2 Procedimento

1. Transferir as plantas que expressam GFP para uma sala escura. Ligar a luz UV e aguardar por cerca de

10 minutos. Apagar a luz da sala, incidir a luz UV sobre a planta e observar a fluorescência da GFP.

2. Para a obtenção de imagens da fluorescência da GFP, posicionar a máquina digital com filtro amarelo no tripé, acertar o enquadramento da imagem, regular o tempo de exposição (geralmente entre 5 e 15 segundos) e programar o disparador automático, para diminuir a chance de trepidação da máquina ao acionar o disparador.

O filtro amarelo melhora a qualidade da imagem, filtrando a luz UV e realçando o contraste entre a fluorescência verde da GFP e a fluorescência vermelha da clorofila (Figura 3C).

3. Uma vez ajustada às condições da máquina fotográfica, apagar a luz da sala, direcionar a luz UV sobre as plantas, e acionar o disparador da máquina.

Durante a exposição, alterar a posição da lâmpada UV em relação à planta fotografada, com o cuidado de manter a lâmpada fora do campo de enquadramento. Isso permitirá uma iluminação mais homogênea do material fotografado. Pelo mesmo motivo, é recomendável um tempo de exposição mais longo (por exemplo, de 5 a 15 segundos).

4. Uma vez obtidas as imagens, desligar a luz UV.

Caso religar a luz seja necessário, aguardar no mínimo 15 minutos, pois acender a luz com a lâmpada quente reduz sua vida útil.

5.3 Observações

A fluorescência da versão mGFP5 é mais forte e evidente do que a da GFP nativa, quando se utiliza uma

lâmpada de luz UV (365 nm). Essa versão, semelhante à GFP nativa, apresenta um pico de absorção máximo a 395 nm e outro menor a 470 nm. A versão eGFP (ou sGFP) apresenta uma mutação (S65T) que modifica o espectro de absorção, passando a apresentar um único pico a 490 nm (CHIU et al., 1996; CUBITT et al., 1995). A eGFP emite fluorescência em 511 nm, sendo essa mais intensa (5 a 6 vezes) que a fluorescência emitida pela proteína nativa ou pela mGFP5. A eGFP é mais apropriada à observação ao microscópio de fluorescência ou confocal.

A GFP pode ser quantificada utilizando um fluorímetro. No entanto, compostos da planta podem apresentar fluorescência na mesma faixa de excitação/emissão, interferindo nas análises. Além disso, a GFP é capaz de formar dímeros e ligações hidrofóbicas com outras proteínas de plantas, o que também pode alterar a intensidade de fluorescência medida (ROBIC et al., 2009). Uma alternativa para contornar esses problemas é medir a fluorescência de GFP em extratos contendo ureia 6 M. Assim, a fluorescência endógena e as interações hidrofóbicas podem ser suprimidas, permitindo a quantificação mais precisa da GFP (ROBIC et al., 2009).

6 Referências

- ALWEN, A.; MORENO, R. M. B.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Plant endogenous β -glucuronidase activity: how to avoid interference with the use of the *E. coli* β -glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants. **Transgenic Research**, London, v. 1, n. 2, p. 63-70, 1992.
- BEVAN, M.; BARNES, W. M.; CHILTON, M. D. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 11, n. 2, p. 369-385, 1983.
- BILLINTON, N.; KNIGHT, A. W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 291, n. 2, p. 175-197, 2001.
- CAISSARD, J.-C.; GUIVARC'H, A.; REMBUR, J.; AZIMI, A.; CHRIQUI, D. Spurious localizations of diX-indigo microcrystals generated by the histochemical GUS assay. **Transgenic Research**, London, v. 3, n. 3, p. 176-181, 1994.
- CERVERA, M. Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 286, p. 203-214, 2005.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, DC, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994.
- CHIU, W.-L.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H.; SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 325-330, 1996.
- CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends Biochemistry Science**, Cambridge, v. 20, n. 11, p. 448-455, 1995.
- DOBBIE, I. M.; LOWNDES, N. F.; SULLIVAN, K. S. Autofluorescent proteins. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 85, p. 1-22, 2008.
- FORNER, J.; BINDER, S. The red fluorescent protein eqFP611: application in subcellular localization studies in higher plants. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 28, 2007.
- GALLAGHER, S. R. (Ed.). **GUS Protocols: Using the GUS Gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, 1992.
- GREBENOK, R. J.; PIERSON, E.; LAMBERT, G. M.; GONG, F. C.; AFONSO, C. L.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CARRINGTON, J. C.; GALBRAITH, D. W. Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 573-586, 1997.
- GUIVARC'H, A.; CAISSARD, J. C.; AZMI, A.; ELMAYAN, T.; CHRIQUI, D.; TEPFER, M. In situ detection of expression of the gus reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. **Transgenic Research**, London, v. 5, p. 281-288, 1996.
- HANSON, M. R.; KOHLER, R. H. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, n. 356, p. 529-39, 2001.

- HASELOFF, J.; SIEMERING, K. R.; PRASHER, D. C.; HODGE, S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 94, n. 6, p. 2122-2127, 1997.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J. P.; MONTAGU, M. V.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 987-995, 1983.
- HODAL, L.; BOCHARDT, A.; NIELSEN, J. E.; MATTSSON, O.; OKKELS, F. T. Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase in transgenic and non-transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v. 87, n. 1, p. 115-122, 1992.
- JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reports**, New York, v. 5, n. 4, p. 387-405, 1987.
- JEFFERSON, R. A.; BURGESS, S. M.; HIRSH, D. β -glucuronidase from *Escherichiacoli* as a gene-fusion marker. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 83, n. 22, p. 8447-8451, 1986.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.
- JIANG, T.; XING, B.; RAO, J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle upon Tyne, v. 25, p. 41-76, 2008.
- KONCZ, C.; OLSSON, O.; LANGRIDGE, W. H.; SCHELL, J.; SZALAY, A. A. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 84, n. 1, p. 131-135, 1987.
- KREMERS, G.-J.; GILBERT, S. G.; CRANFILL, P. J.; DAVIDSON, M. W.; PISTON, D. W. Fluorescent proteins at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 124, p. 157-160, 2011.
- LUDWIG, S. R.; BOWEN, B.; BEACH, L.; WESSLER, S. R. A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. **Science**, Washington, DC, v. 247, n. 4941, p. 449-450, 1990.
- MAILLE, M. A radiotechnique suitable for the detection of octopine synthesis in crown-gall tissues grown in vitro. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 134, n. 1, p. 133-136, 1983.
- MAYERHOFER, R.; LANGRIDGE, W. H. R.; CORMIER, M. J.; SZALAY, A. A. Expression of recombinant *Renilla* luciferase in transgenic plants results in high-levels of light emission. **Plant Journal**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1031-1038, 1995.
- MILLWOOD, R. J.; MOON, H. S.; STEWART JUNIOR, C. N. Fluorescent proteins in transgenic plants. In: GEDDES, C.D. (Ed.). **Reviews in fluorescence 2008**. New York: Springer, 2008. v. 5, p. 387-403.
- NISHIZAWA, K.; KITA, Y.; KITAYAMA, M.; ISHIMOTO, M. A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 12, p. 1355-1361, 2006.
- OW, D. W.; WET, J. R. de; HELINSKI, D. R.; HOWELL, S. H.; WOOD, K. V.; DELUCA, M. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. **Science**, Washington, DC, v. 234, n. 4778, p. 856-859, 1986.
- PRÖLS, M.; TOPFER, R.; SCHELL, J.; STEINBISS, H. H. Transient gene expression in tobacco protoplasts: I. Time course of CAT appearance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 221-224, 1988.
- ROBIC, G. **Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de proteína recombinante utilizando β -glucuronidase**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ROBIC, G.; LACORTE, C.; MIRANDA, E. A. Fluorometric quantification of green fluorescent protein in tobacco leaf extracts. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 392, n. 1, p. 8-11, 2009.
- ROSELLINI, D. Selectable markers and reporter genes: a well furnished toolbox for plant science and genetic engineering. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 31, n. 5, p. 401-453, 2012.
- RUIJTER, N. C. A.; VERHEES, J.; VAN LEEUWEN, W.; VAN DER KROL, A. R. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP Reporter System for gene expression studies in plants. **Plant Biology**, New York, v. 5, n. 2, p. 103-115, 2003.
- RUSSELL, J. A.; ROY, M. K.; SANFORD, J. C. Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 28, n. 2, p. 97-105, 1992.

SHANER, N. C.; PAUL, A.; STEINBACH, P. A.; TSIEN, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. **Nature Methods**, New York, v. 2, n. 12, p. 905-909, 2005.

TEERI, T. H.; LEHVASLAIHO, H.; FRANCK, M.; UOTILA, J.; HEINO, P.; PALVA, E. T.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Gene fusions to lacZ reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 343-350, 1989.

THOMASSET, B.; MÉNARD, M.; BOETTI, H.; DENMAT, L. A.; INZÉ, D.; THOMAS, D. β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic tobacco cells: specific elimination of plant inhibitors and minimization of endogenous GUS background. **Plant Science**, Limerick, v. 113, n. 2, p. 209-219, 1996.

TÖR, M.; MANTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in *Discorea* species. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 9, p. 452-456, 1992.

VANCANNEYT, G.; SCHMIDT, R.; O'CONNOR-SANCHEZ, A.; WILLMITZER, L. ROCHA-SOSA, M. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 245-250, 1990.

VARAGONA, M. J.; SCHMIDT, R. J.; RAIKHELAI, N. V. Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 10, p. 1213-1227, 1992.

Capítulo 9

Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais

Eduardo Romano
Soraya Cristina de Macedo Leal-Bertioli

1 Introdução

Isolamento de DNA é uma etapa fundamental em todos os procedimentos de biologia molecular, inclusive na análise da integração de DNAs exógenos no genoma vegetal. Atualmente, existe um número grande de protocolos que descreve a extração de DNA para diferentes espécies e tecidos vegetais; entretanto, o isolamento de DNA de boa qualidade ainda é considerado fator limitante para o desenvolvimento da pesquisa em algumas espécies.

A diversidade de protocolos existente reflete a variabilidade da composição bioquímica encontrada em diferentes plantas e tecidos, o que impossibilita o desenvolvimento de um único protocolo ideal para diferentes espécies vegetais. Apesar de o número de protocolos disponíveis aumentar constantemente, a maior parte deles é uma variação dos métodos descritos por Dellaporta et al. (1983) e por Doyle e Doyle (1987), que serão descritos neste capítulo. Ambos visam isolar DNA de alta qualidade, evitando: a) degradação do DNA por DNAses endógenas; b) coisolamento de polissacarídeos que podem inibir a ação de enzimas utilizadas na extração; c) coisolamento de substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA ou inibir a ação de enzimas.

Com o avanço de técnicas de sequenciamento, genotipagem e código de barra em larga escala, surgiu a necessidade de adaptar protocolos de extração de DNA para um número grande de amostras simultaneamente, em um curto espaço de tempo e sem comprometer a

qualidade do DNA. Em paralelo à aplicação de técnicas de biologia molecular em condições de campo (fora de laboratório) para diagnose, melhoramento assistido por marcadores (MAS), entre outras, há demanda por protocolos simples, rápidos, que produzam DNA com qualidade.

A seguir, serão descritas as etapas básicas da maioria dos métodos de extração de DNA vegetal utilizados rotineiramente em laboratórios de biologia molecular, com a breve explicação de cada passo.

O primeiro passo é a quebra das paredes celulares e membrana nuclear. Normalmente, essa etapa é realizada de forma mecânica pela maceração do tecido vegetal congelado por nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido mantém o material em baixa temperatura (-196 °C), para que não haja ação de enzimas líticas ou ação oxidativa. O pó obtido pela maceração é imediatamente ressuscitado em um tampão de extração com pH entre 8,0 e 9,0, que é desfavorável à ação de enzimas degradantes. O composto ácido etileno diamonotetracético (EDTA) é muito utilizado nos tampões de extração por ser um agente quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação de DNAses que usam metais como cofatores (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para evitar os efeitos indesejáveis da oxidação, diferentes produtos podem ser incluídos nos tampões de extração, como polivinilpirrolidona solúvel (PVP-40) e/ou albumina de soro bovino (BSA), a concentrações de 1% a 2%. O PVP é um antioxidante que inibe a ação de compostos fenólicos. A BSA atua absorvendo os polifenóis e, portanto, evitando

a ação dessas substâncias que tornam o DNA oxidado e inacessível às enzimas de restrição (WEISING et al., 1995). Outro composto que pode ser incluído no tampão de extração, para evitar a oxidação de compostos fenólicos, é o β -mercaptoetanol. Ele é um agente redutor que desnatura peroxidases e polifenoloxidasas, impedindo a ação danosa dessas enzimas sobre o DNA, e pode ser utilizado em diferentes concentrações, dependendo da necessidade (ALDRICH; CULLIS, 1993). Na maioria dos protocolos de extração de DNA de tecidos vegetais, o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é utilizado no tampão de extração. O CTAB solubiliza as membranas, formando um complexo com o DNA, o que facilita uma posterior precipitação diferencial desse complexo (WEISING et al., 1995).

Após a etapa de ressuspensão do conteúdo celular em tampão de extração, realiza-se, normalmente, a desproteinização por meio de uma ou mais extrações com solventes orgânicos (fenol ou clorofórmio:álcool isoamílico), seguida de centrifugação para separar a fase orgânica da aquosa. Esses solventes desnaturam proteínas que ficam na interface, enquanto o DNA e outros contaminantes, como carboidratos e RNAs, se mantêm na fase aquosa. Alguns protocolos incorporam proteases antes da extração com solventes orgânicos, o que facilita a separação do DNA das proteínas da cromatina (DRAPER et al., 1988).

Após a etapa de desproteinização, o DNA é precipitado pela adição de um álcool. Nessa etapa, a concentração de sal deve ser compatível com o processo de precipitação.

Vários tampões de extração contêm sais, sendo os mais comuns o acetato de sódio ou de amônio, que devem estar pelo menos a 0,3 M ou 2,5 M, respectivamente. Porém, se a concentração ainda for inferior a essa, é necessário ajustá-la antes da adição do álcool. Na precipitação, os íons positivos do sal neutralizam a carga negativa dos grupos fosfato dos ácidos nucleicos, tornando essas moléculas menos hidrofílicas e, conseqüentemente, menos solúveis em água. O álcool (etanol ou isopropanol) tem uma constante dielétrica menor do que a da água, facilitando a interação do sódio (Na^{+2}) com o grupo fosfato dos ácidos nucleicos, diminuindo ainda mais a hidrofílicidade, tirando, assim, os ácidos nucleicos de solução. O precipitado é lavado com etanol 70% para retirar o excesso de sais. O DNA é ressuspendido em água ou em tampão TE. A maioria dos métodos de extração de DNA copurifica RNA junto com o DNA. Se necessário eliminar o RNA, um tratamento com RNase A pode ser realizado.

O aspecto do DNA, ao final da preparação, pode ser utilizado como um diagnóstico inicial da qualidade do DNA, e os problemas mais comuns são:

- a) A contaminação por polifenóis pode ser evidenciada pela coloração do DNA, que tende a ficar marrom. O escurecimento é devido à oxidação dos polifenóis em compostos quinônicos, que, por sua vez, são fortes agentes oxidantes que danificam DNAs e proteínas (LOOMIS, 1974). Nesse caso, uma nova extração pode ser realizada com adição de PVP-40 e/ou BSA no tampão de extração, a concentração de 1% a 2% e a

concentração de β -mercaptoetanol pode ser aumentada para até 5%.

- b) O coisolamento de polissacarídeos, que podem facilmente ser detectados pelo aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso do DNA e de difícil ressuspensão. Nesse caso, o DNA pode sofrer diferentes tratamentos que o separam dos outros contaminantes. Tais métodos incluem precipitação diferencial ou gradientes de densidade. O gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) com brometo de etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) é um método de purificação que fornece preparações de DNA altamente puras e pode ser realizado após qualquer método de extração (WEISING et al., 1995). Entretanto, esse método é, atualmente, pouco utilizado em razão de sua complexidade e do tempo demandado para finalizar a extração. Uma boa alternativa é uma nova precipitação com acetato de amônio ou de sódio.

Como mencionado anteriormente, não existe um único protocolo ideal para extração de DNA de diferentes espécies vegetais. Neste capítulo, serão descritos quatro protocolos utilizados em diversos laboratórios e que se têm mostrado bastante eficientes. O primeiro protocolo é baseado no detergente CTAB, o qual é o mais utilizado para extração de DNA de diferentes espécies vegetais (DOYLE; DOYLE, 1987; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Normalmente, as extrações por esse protocolo fornecem DNA suficientemente puro para digestões com enzimas de restrição e para ampliações por PCR. Se o pesquisador não tiver um protocolo bem definido para a espécie e/ou tecido vegetal com que trabalha, é aconselhável que

teste esse protocolo inicialmente. Algumas preparações podem necessitar de uma etapa de purificação posterior para remoção de contaminantes, como fenóis ou polissacarídeos. Para tal fim, uma precipitação com acetato de sódio, como uma etapa opcional para remoção de polissacarídeos, também será descrita.

O segundo protocolo descrito é destinado à extração de DNA em pequena escala e, por isso, é utilizado principalmente em experimentos de PCR, que necessitam de pequenas quantidades (20 ng a 200 ng) de DNA (Capítulo 10). O protocolo é simples, rápido e possui a vantagem de não utilizar nitrogênio líquido, podendo ser utilizado quando é necessário processar várias amostras simultaneamente, ou quando somente pequenas quantidades de tecido estão disponíveis. Apesar de ser possível a amplificação por PCR a partir de preparações de DNA de baixa qualidade, a omissão de alguns dos passos do protocolo aqui descrito pode comprometer a reprodutibilidade das reações de PCR, resultando, muitas vezes, em falsos negativos. Portanto, protocolos extremamente simplificados só devem ser utilizados após testes com o tecido e espécie de trabalho.

O terceiro método descrito foi estabelecido por Dellaporta et al. (1983) e é uma alternativa ao método CTAB. O método Dellaporta fundamenta-se na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos por alta concentração de acetato de potássio (CH_3CO_2K) na presença de sódio dodecil sulfato (SDS). Esse método é simples e muito utilizado em extração de DNA de diversas espécies vegetais.

O quarto método é indicado para trabalhos de biologia molecular realizados em condições limitadas de infraestrutura: seja em casos de coleta de material a campo, seja em laboratórios com condições menos favoráveis. Em casos assim, é possível adotar metodologias que demandem menos equipamentos e/ou reagentes de alto custo. Nesse contexto, aconselha-se utilizar o método que extrai DNA por maceração em membrana de náilon, o qual é uma adaptação do *squash blot* (LANGRIDGE et al., 1991). O protocolo baseia-se na afinidade do DNA, carregado negativamente, com a membrana carregada positivamente. Depois de fixado à membrana, o DNA fica aderido e pode ser eluído para utilização imediata, ou guardado em temperatura ambiente por longos períodos. O DNA obtido é adequado para procedimentos que demandam pequenas quantidades. Adaptações comerciais desse protocolo permitem o estoque da amostra fixada na membrana por vários anos, utilizando o mesmo princípio das membranas de náilon. Esse método pode ser utilizado em laboratórios não equipados para biologia molecular, assim como pode extrair DNA com qualidade para aplicações, como genotipagem em larga escala (MCCLURE et al., 2009). Sua maior limitação é a pequena quantidade de material obtido. Entretanto, pela possibilidade de estocar o DNA por muitos anos, tem sido utilizado para produção de bancos de DNA (FRÉGEAU et al., 2003).

A literatura científica está repleta de protocolos de extração e análise de DNA de plantas. Os protocolos descritos a seguir tentam cobrir os princípios básicos de extração, assim como guiar o leitor em alguns métodos

mais tradicionais e de eficácia comprovada para um grande número de espécies. Com a automatização de vários procedimentos, como sequenciamento de DNA e genotipagem em larga escala, vários métodos de extração de DNA automatizados também foram desenvolvidos e estão disponíveis comercialmente. Desde máquinas automáticas para o rompimento de membrana/parede celular em placa de 96 ou 384 poços até estações de trabalho ou robôs (*workstations*) de preparação de amostras estão disponíveis para laboratórios com demandas para grandes amostragens de material vegetal. Kits comerciais também estão disponíveis tanto para pequena quantidade de amostras quanto para trabalhos em larga escala. Dessa forma, dependendo da demanda do material biológico e dos recursos financeiros disponíveis, existem vários métodos, em diversas escalas de trabalho, e cabe ao pesquisador escolher o que mais se adapta às suas condições.

2 Método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987, modificado)

2.1 Material

- Acetato de sódio 3 M (Apêndice 4).
- Agitador do tipo Vortex.
- Almofariz e pilão.
- Banho-maria a 37 °C.

- Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (v/v).



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- EDTA 500 mM pH 8,0 (Apêndice 4).
- Etanol 70% (v/v).
- Isopropanol ou etanol absoluto.
- Centrífuga para tubos de 50 mL.
- Nitrogênio líquido.
- Tubos de polipropileno de 50 mL.
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Solução de RNase A 10 mg/mL (10 mL) (Apêndice 4).
- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tampão CTAB (500 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
CTAB	10 g	2%
NaCl 5 M	140 mL	1,4 M
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	50 mL	100 mM
EDTA 500 mM	20 mL	20 mM
β -mercaptoetanol	1 mL	0,2%
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	



β -mercaptoetanol é volátil e altamente tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Apêndice 4).

2.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 1.

1. Pesar até 3 g de tecido vegetal fresco.

Preferencialmente, utilizar folhas jovens. Depois de colhidas, devem ser colocadas imediatamente, e mantidas, em nitrogênio líquido até o momento de serem usadas. Após a etapa do congelamento, as folhas podem ser conservadas a -80 °C por vários meses. No momento de utilização, as folhas devem ser retiradas do congelador, colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas até a maceração.

2. Colocar as folhas no almofariz e adicionar nitrogênio líquido.
3. Macerar as folhas congeladas com ajuda de um pilão até obter um pó fino.

O material não deve ser descongelado. Se for necessário, adicionar mais nitrogênio líquido. Tudo deve ser feito com muito cuidado, para que o pó não saia do almofariz.

4. Transferir o pó o mais rapidamente possível para um tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão

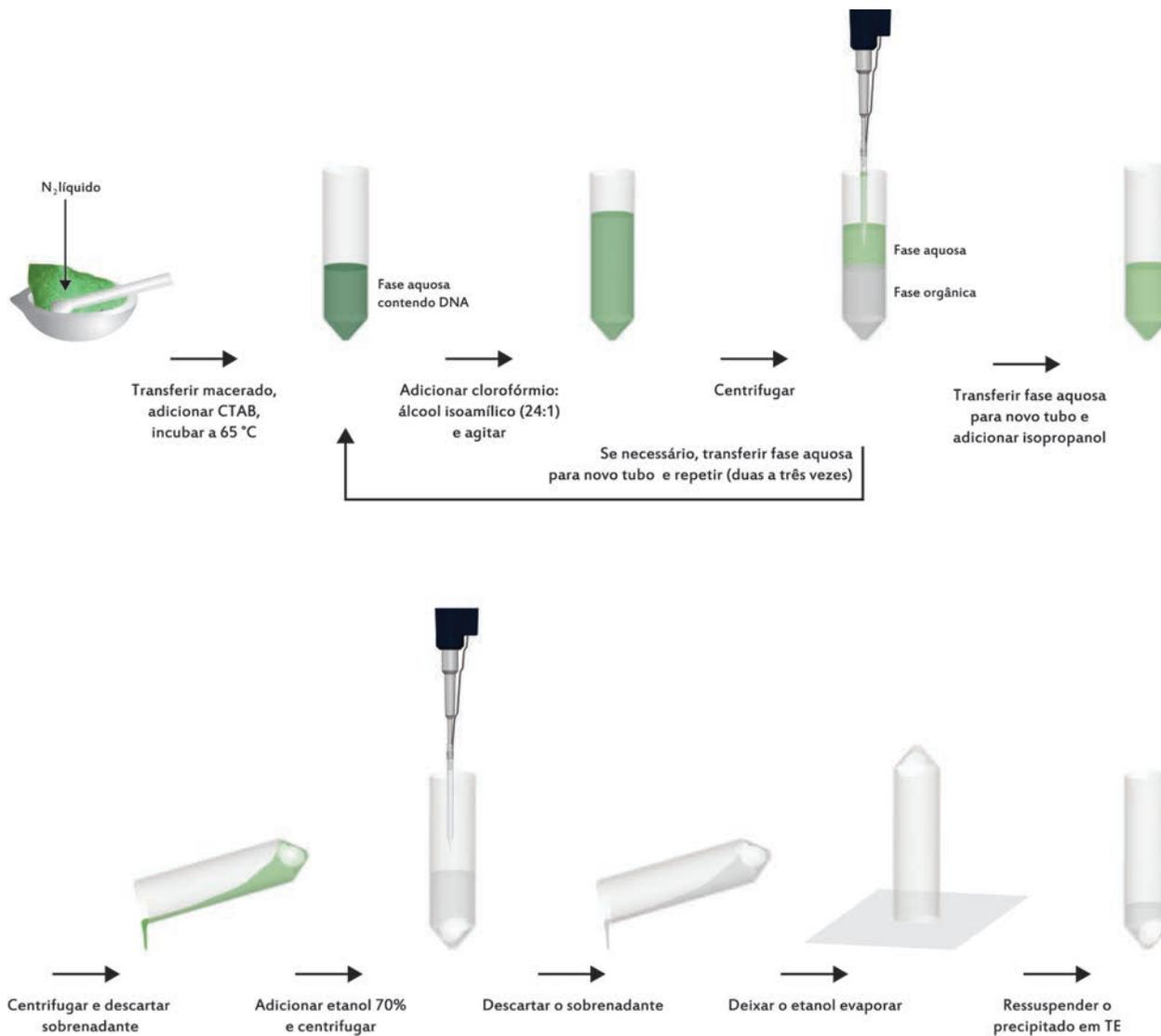


Figura 1. Esquema representativo das etapas de extração de DNA por meio do método CTAB.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

CTAB preaquecido a 65 °C em banho-maria. Incubar, nessa temperatura, por 30 minutos a 1 hora, agitando manualmente a cada 10 minutos.

O β-mercaptoetanol deve ser adicionado ao tampão CTAB após aquecimento, imediatamente antes do uso.

5. Adicionar um volume de clorofórmio:álcool isoamílico e agitar o tubo manualmente, ou com o auxílio de um agitador, por 10 minutos.

A agitação deve ser suave para evitar quebra do DNA, mas suficiente para a emulsificação das fases.

6. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 g (12.000 rpm no rotor Sorvall SS 34).
7. Transferir a fase aquosa (fase superior) para novo tubo. Deve-se tomar extremo cuidado para não pipetar nada da fase inferior. Repetir a extração (a partir da etapa 5 deste item).

Esta etapa pode ser repetida mais uma ou duas vezes, levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém, com maiores perdas de DNA.

8. Caso necessário, adicionar RNase A, a uma concentração final de 100 µg/mL e incubar a 37 °C, por 30 minutos.
9. Adicionar 0,6 volume de isopropanol gelado ou 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Misturar gentilmente por inversão do tubo várias vezes.

10. Centrifugar a amostra por 20 minutos a 10.000 g (12.000 rpm no rotor Sorvall SS 34), e cuidadosamente descartar o sobrenadante.

11. Lavar o precipitado com, aproximadamente, 5 mL de etanol 70% e centrifugar por 3 minutos a 10.000 g.

12. Descartar o etanol cuidadosamente e secar o precipitado, deixando o tubo invertido em papel-toalha ou colocando o tubo em câmara de fluxo laminar para evaporar o etanol.

O precipitado não deve ter resíduos de etanol ou isopropanol ou secar demais, dificultando a ressuspensão do DNA.

13. Após a secagem, ressuspender o precipitado em cerca de 500 µL de TE ou água bidestilada esterilizada por autoclavagem e incubar à temperatura ambiente por meia hora ou mais.

14. Se for necessária uma purificação posterior, seguir para a etapa 15 deste item.

Tratamento com acetato de sódio (opcional)

15. Adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, misturar e incubar no gelo por 15 minutos.

16. Centrifugar por 30 minutos (10.000 g, a 4 °C).

17. Retirar o sobrenadante com cuidado para não pipetar o precipitado.

18. Repetir as etapas 9 a 13 deste item.

3 Miniextração para PCR

3.1 Material

- Agitador para microtubos com controle de temperatura.
- Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (v/v) (Apêndice 4).



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- EDTA 500 mM (Apêndice 4).
- Etanol 70% (v/v).
- Isopropanol.
- Microcentrífuga.
- Microtubo de 1,5 mL para microcentrífuga e minipilão.
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).

- Tampão de extração para PCR (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
CTAB	0,8 g	0,8%
NaCl 5 M	16 mL	800 mM
EDTA 500 mM	4,4 mL	22 mM
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	22 mL	220 mM
Sarcosil	1 g	1%
Sorbitol	2,55 g	140 mM
β -mercaptoetanol	200 μ L	0,2%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Inserir β -mercaptoetanol ao tampão imediatamente antes do uso.



β -mercaptoetanol é volátil e altamente tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

3.2 Procedimento

1. Macerar 300 mg de tecido vegetal fresco em um microtubo com a ajuda de um minipilão que se encaixe perfeitamente no fundo do tubo.
2. Adicionar 1 mL de tampão de extração para PCR.
3. Adicionar ao macerado 400 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico.
4. Incubar com agitação a 55 °C, por 10 minutos.

5. Centrifugar em microcentrífuga a 12.000 rpm, por 5 minutos.
6. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo com cuidado para não pipetar nada da fase inferior.
7. Adicionar ao sobrenadante 1,2 volume de isopropanol.
8. Centrifugar em microcentrífuga a 12.000 rpm, por 10 minutos.
9. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com etanol 70%.
10. Repetir a etapa 7 deste item.
11. Descartar o sobrenadante e secar o precipitado, deixando o microtubo invertido em papel-toalha ou colocando o microtubo em câmara de fluxo laminar.

O precipitado não deve ter resíduos de isopropanol ou secar demais, o que pode dificultar a ressuspensão do DNA.

12. Dissolver o precipitado em 50 µL de tampão TE ou água bidestilada esterilizada por autoclavagem.

4 Método Dellaporta modificado

4.1 Material

- Acetato de potássio 5 M (Apêndice 4).
- Acetato de sódio 5 M, pH 5,2 (Apêndice 4).
- Almofariz e pilão.

- Banho-maria ou banho seco a 65 °C.
- Centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Etanol 70% (v/v).
- Filtro do tipo Miracloth™ ou similar.
- Isopropanol resfriado a -20 °C.
- Microcentrífuga.
- Microtubo de 1,5 mL para microcentrífuga.
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Nitrogênio líquido.
- SDS 20% (p/v) (Apêndice 4).
- Tampão de extração Dellaporta (500 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl 5 M	50 mL	500 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	50 mL	50 mM
Tris-HCl 1M, pH 8,0	50 mL	100 mM
β-mercaptoetanol	1 mL	0,2%
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	



β-mercaptoetanol é volátil e altamente tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).

- Tris-HCl 1M, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tubos de polipropileno de 50 mL.

4.2 Procedimento

1. Pesar até 3 g de tecido vegetal fresco.

Preferencialmente, utilizar folhas jovens. Depois de colhidas, devem ser colocadas imediatamente, e mantidas, em nitrogênio líquido até o momento de serem usadas. Após a etapa do congelamento, as folhas podem ser conservadas a -80 °C por vários meses. Para algumas espécies, é possível também desidratar as folhas e mantê-las em sílica gel até o uso. No momento de utilização, as folhas devem ser retiradas do congelador, colocadas novamente em nitrogênio líquido e mantidas até o momento de maceração.

2. Colocar as folhas no almofariz e adicionar nitrogênio líquido.
3. Macerar as folhas congeladas com ajuda de um pilão até obter um pó fino.

O material não deve descongelar. Se for necessário, adicionar mais nitrogênio líquido. Tudo deve ser feito com muito cuidado, para que o pó não saia do almofariz.

4. Transferir o pó o mais rapidamente possível para um tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão de extração preaquecido a 65 °C. Manter o tubo nessa temperatura enquanto as outras amostras são preparadas.
5. Adicionar 1 mL de SDS 20% e misturar por inversão. Incubar por 20 minutos, a 65 °C. Misturar manualmente a cada 10 minutos.

6. Adicionar 5 mL de acetato de potássio 5 M, misturar por inversão e incubar por 20 minutos a 65 °C. Misturar manualmente a cada 5 minutos.

Nesta etapa, ocorre a precipitação de proteínas e polissacarídeos, deixando o DNA em solução.

7. Centrifugar por 20 minutos (20.000 g a 4 °C). Retirar o sobrenadante com muito cuidado para não pipetar o sedimento. Filtrar o sobrenadante em filtro do tipo Miracloth® e transferir para novo tubo.
8. Adicionar ao filtrado 0,7 volume de isopropanol gelado, misturar por inversão do tubo e incubar por, pelo menos, 1 hora a -20 °C.
9. Centrifugar por 20 minutos (20.000 g, a 4°C). Descartar o sobrenadante.
10. Secar o precipitado e ressuspender em 300 µL a 700 µL de tampão TE ou água bidestilada esterilizada por autoclavagem. Transferir a amostra para microtubo.
11. Se for necessária uma purificação posterior, seguir para a etapa 12 deste item.
12. Precipitar o DNA pela adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 5 M e 0,7 volume de isopropanol. Misturar por inversão do tubo.
13. Incubar por, pelo menos, uma hora, a -2 °C.
14. Centrifugar em microcentrifuga (12.000 rpm, por 10 minutos). Lavar o precipitado com etanol 70%.

15. Secar o precipitado, deixando o tubo invertido em papel-toalha ou colocando o tubo em câmara de fluxo laminar.

O precipitado não deve ter resíduos de etanol, mas também não deve secar demais, pois pode dificultar a ressuspensão do DNA.

16. Dissolver em 100 µL de tampão TE ou água bidestilada esterilizada por autoclavagem.

4.3 Observação

Vários autores descrevem métodos nos quais os núcleos celulares são extraídos antes da extração de DNA (LOUREIRO et al., 2007; ROBERTS, 2007). Tais métodos permitem que o DNA nuclear seja extraído sem contaminação do DNA de cloroplastos e mitocôndrias e utilizado quando for necessária uma preparação com DNA exclusivamente nuclear, como na produção de bibliotecas genômicas em cromossomos artificiais de bactéria (BACs) ou em estudos que utilizam a técnica de citometria de fluxo.

5 Extração de DNA por maceração em membrana

5.1 Material

- Água bidestilada esterilizada por autoclavagem.
- Banho seco a 94 °C.

- Bastão de vidro.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Membrana de náilon cortada em pedaços de 2 cm x 2 cm.
- Microtubo de 1,5 mL para microcentrífuga.
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- NaOH 1N (Apêndice 4).
- Papel de filtro cortado em pedaços de 3 cm x 3 cm.
- Pinça com ponta fina.
- Pipeta de vidro, micropipeta ou pisseta.
- Placa de vidro ou acrílico de cerca de 5 cm x 5 cm (com pelo menos 3 mm de espessura).
- Solução 1:

Componente	Quantidade	Concentração final
NaCl 5 M	30 mL	1,5 M
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	50 mL	0,5 M
EDTA 500 mM, pH 8,0	200 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1M, pH 8,0 (Apêndice 4).

5.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 2.

1. Na placa de vidro, depositar a membrana de náilon sobre o papel de filtro.

A placa de vidro é utilizada para oferecer suporte físico durante a maceração e evitar o rompimento da membrana.

2. Embeber a membrana com NaOH 1N de forma que fique totalmente encharcada, mas sem transbordar.

3. Com o auxílio da pinça, colocar o tecido vegetal sobre a membrana de náilon.
4. Macerar o tecido vegetal com o bastão de vidro.
5. Após a maceração, lavar a membrana com NaOH 1N, com o auxílio de uma pipeta de vidro, micropipeta ou pisseta.

Essa lavagem retira o excesso de restos celulares, deixando o DNA ligado à matriz (membrana).

6. Lavar a membrana com a Solução 1.

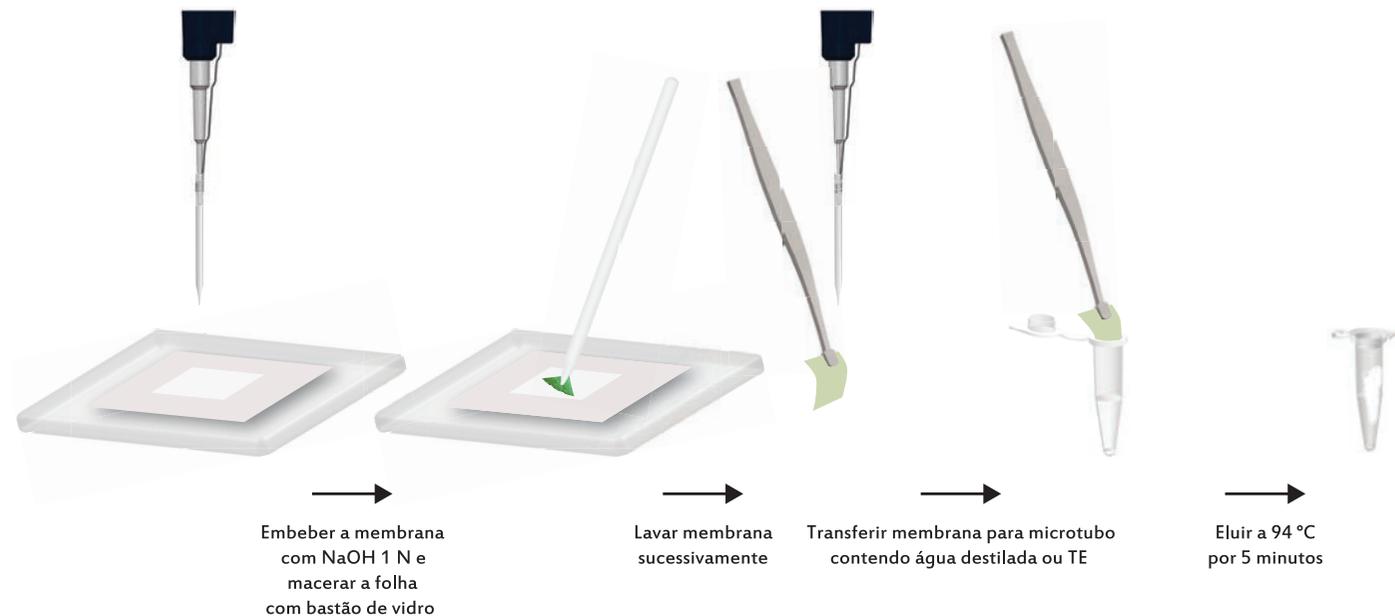


Figura 2. Esquema representativo das etapas de extração de DNA por maceração em membrana de náilon.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

7. Lavar a membrana três vezes com tampão TE.

Após cada lavagem, encostar a ponta da membrana em papel de filtro seco, para que o excesso de líquido escoe por capilaridade.

8. Lavar a membrana rapidamente com água destilada.
9. Transferir a membrana para um microtubo contendo 100 μ L de tampão TE ou água bidestilada esterilizada por autoclavagem.

Antes da eluição, a membrana pode ser seca e armazenada em temperatura ambiente para posterior utilização do DNA.

10. Para eluir o DNA, aquecer o microtubo a 94 °C por 5 minutos.
11. Descartar a membrana. O DNA eluído em tampão TE está pronto para uso.

6 Quantificação e análise da qualidade do DNA total extraído

6.1 Estimativa em gel de agarose

Este método é extremamente simples, não necessita de aparelhos sofisticados e fornece estimativas de concentrações do DNA com aproximação suficientemente precisa para grande parte das técnicas que utilizam DNA genômico. Consiste na comparação visual de um gradiente de concentração conhecida do DNA (DNA padrão) em

relação à amostra extraída, após eletroforese em um gel de agarose corado com brometo de etídio (Apêndice 4). O DNA padrão deve ser de alto peso molecular (por exemplo, DNA de fago λ) – pois DNA de baixo peso molecular é de difícil comparação com DNA genômico – e, de preferência, produzido comercialmente com uma concentração precisa. O gel de agarose também permite verificar degradação do DNA extraído, em forma de múltiplas bandas de menor peso molecular do que seria a do DNA genômico, que se confundem em uma única mancha (*smear*) difusa no gel. Observa-se também a coextração de RNAs (bandas de baixo peso molecular) e o excesso de sais (a banda de DNA genômico aparece distorcida).

6.2 Quantificação por espectrofotometria

Este método fornece alta precisão na determinação da concentração de ácidos nucleicos. No entanto, exige preparações de DNA bastante puras. Polissacarídeos, proteínas, RNAs e outros contaminantes interferem na quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria. Portanto, a quantificação em espectrofotômetro só é aconselhável em preparações de DNA de alta qualidade. É importante ressaltar que este método não permite visualizar o peso molecular do DNA extraído, não se observando, portanto, o nível de degradação.

O método é baseado no princípio de que ácidos nucleicos absorvem luz ultravioleta em um padrão específico em comprimento de onda de 260 nm. Quando

a luz ultravioleta atravessa a amostra, um fotodetector mede a quantidade de luz absorvida, que é proporcional à concentração de ácidos nucleicos.

Para se obter a quantificação de DNA ou RNA isolado e estimar sua pureza, procede-se à leitura espectrofotométrica medindo-se a absorbância em diferentes comprimentos de onda ($A_{230\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}$, $A_{280\text{ nm}}$ e $A_{310\text{ nm}}$). A quantidade do ácido nucleico presente na amostra é medida em $A_{260\text{ nm}}$. No comprimento de onda de 280 nm, mede-se a quantidade de polissacarídeos na amostra. A leitura obtida no comprimento de onda de 230 nm mede eventuais sujeiras presentes na cuveta, enquanto a medida em 310 nm estima a presença de compostos fenólicos (amostras puras devem resultar em absorbância a 310 nm próxima de zero).

A concentração de diferentes ácidos nucleicos de uma amostra é dada pelas fórmulas:

$$[\text{DNA}] = 50 \mu\text{g/mL} \times D \times A_{260\text{nm}}$$

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times D \times A_{260\text{nm}}$$

$$[\text{oligonucleotídeo fita dupla}] = 50 \mu\text{g/mL} \times D \times A_{260\text{nm}}$$

em que:

D é o fator de diluição usado para fazer a leitura no espectrofotômetro.

$A_{260\text{nm}}$ é a leitura da absorbância da amostra no comprimento de onda de 260 nm.

A pureza da amostra do DNA é medida pela razão entre as leituras A_{260} e A_{280} . Um DNA puro deve ter uma razão entre 1,8 e 2,0. Razão menor significa contaminação com proteínas; razão maior indica contaminação com fenol.

Como não há diferença entre a leitura de DNA e RNA, para se quantificar o DNA extraído, é necessário que a amostra esteja sem RNA. No entanto, um procedimento alternativo baseado na ligação de um corante (Hoechst dye 33258) que se liga somente em DNA permite a determinação precisa da concentração de DNA mesmo em preparações contaminadas por RNA. Para tal, é necessário um espectrofotômetro de fluorescência para realizar a quantificação.

Atualmente, existe uma nova geração de espectrofotômetros que permite a análise de concentrações muito baixas de amostras (até 3,7 pg/ μL) em pequenos volumes (a partir de 1 μL). O princípio de detecção das amostras é o mesmo dos espectrofotômetros convencionais, entretanto, seu design permite que um volume bastante pequeno (a partir de 1 μL) de amostra seja medido com alta acuidade. Esses equipamentos utilizam uma tecnologia de retenção de amostra, que é colocada em uma plataforma hidrofóbica, na qual a tensão superficial mantém a amostra na posição correta, eliminando a necessidade de se utilizarem cuvetas. É utilizada uma lâmpada de arco de xenônio como fonte de luz, detectada por um *charge coupled device* (CCD). Os nanoespectrofotômetros são ligados a um computador, com programas específicos que realizam as análises de quantidade e qualidade. Um cuida-

do especial é necessário ao homogeneizar a amostra. Em razão do pequeno volume, erros de amostragem podem causar desvios significativos nos dados gerados. Várias leituras podem ser necessárias para assegurar a acuidade dos resultados obtidos. Amostras de DNA genômico são especialmente sensíveis a esses erros, pois frequentemente são menos homogêneas que amostras de DNA plasmidial.

Assim, como os espectrofotômetros convencionais, os nanoespectrofotômetros também oferecem parâmetros para analisar a pureza do DNA extraído, determinando as quantidades de contaminantes (RNA, proteína, polissacarídeos e fenóis). Além do mais, para analisar a qualidade da amostra, é também comum realizar testes enzimáticos antes de utilizar o DNA extraído. Os dois principais são: o teste da susceptibilidade à ação de enzimas de restrição (Capítulo 12), no qual uma alíquota do DNA é utilizada para verificar se o DNA é adequado a servir de substrato para as enzimas de restrição (sensíveis à presença de qualquer elemento estranho à natureza do DNA); e o teste da PCR (Capítulo 10), no qual o DNA é utilizado como molde para amplificação a partir de um iniciador conhecido, de preferência para regiões repetitivas do genoma, para confirmar se está suficientemente puro e sem inibidores enzimáticos para permitir a ação da DNA polimerase.

7 Referências

ALDRICH, J.; CULLIS, C. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using klen *Taq* 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 11, n. 2, p. 128-141, 1993.

DELLAPORTA, S.; WOOD, J.; HICKS, J. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, Diliman, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRAPER, J.; SCOTT, R.; ARMITAGE, P.; WALDEN, R. **Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. 355 p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FRÉGEAU, C. J.; LECLAIR, B.; BOWEN, K.; PORELLE, F.; FOURNEY, R. The National DNA Data Bank of Canada: a laboratory bench retrospective on the first year of operation. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1239, p. 621-625, 2003.

LANGRIDGE, U.; SCHWALL, M.; LANGRIDGE, P. Squashes of plant tissue as substrate for PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 24, p. 6954, 1991.

LOOMIS, W. D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, New York, v. 31, p. 528-544, 1974.

LOUREIRO, J. O.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. A. O. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.

MCCLURE, M.; MCKAY, S.; SCHNABEL, R.; TAYLOR, J. Assessment of DNA extracted from FTA® cards for use on the Illumina iSelect BeadChip. **BMC Research Notes**, London, v. 2, n. 1, p. 107, 2009.

ROBERTS, A. V. The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen. **Cytometry Part A**, Hoboken, v. 71A, n. 12, p. 1039-1044, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3, 2368 p.

WEISING, K.; NYBOM, H.; KIRSTEN, W.; WIELAND, M. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322 p.

Capítulo 10

Análise de plantas transgênicas por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Júlio Carlyle Macedo Rodrigues
Maria Imaculada Conceição dos Santos Gama
Francisco José Lima Aragão

1 Introdução

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações em ciências biológicas, tanto em pesquisa básica como aplicada, tendo proporcionado a seu autor, Kary B. Mullis, no início da década de 1990, o prêmio Nobel de medicina. Por meio de PCR pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (MULLIS, 1990).

PCR pode ser definida como um método *in vitro* para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequências definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido desoxirribonucleico (DNA) (MULLIS; FALLOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). O número de fragmentos duplica-se a cada ciclo de reação, aumentando a quantidade de moldes disponíveis, o que faz a PCR ser um processo exponencial.

A reação de amplificação é catalisada pela enzima DNA polimerase, que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado oligonucleotídeo iniciador ou *primer*, que tem complementariedade à fita-molde (*template*) de DNA. A extensão da cadeia é feita pela adição, na extremidade 3' do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita molde. O fragmento amplificado é aquele compreendido entre as duas extremidades 3' de um segmento dúplice, complementares e incluindo os dois iniciadores utilizados

na reação. Os iniciadores são sintetizados artificialmente, sendo complementares a uma sequência conhecida de nucleotídeos, de maneira a delimitarem a região que se deseja amplificar. A PCR (Figura 1) é iniciada pela separação das fitas do DNA molde (desnaturação), por meio da elevação da temperatura da reação. A temperatura é então diminuída, para que haja anelamento dos iniciadores com o DNA molde, e aumentada novamente para que a polimerase possa atuar, estendendo um novo fragmento. O fragmento produzido servirá como molde para o ciclo seguinte. PCR envolve, portanto, ciclos repetidos de desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores com suas sequências complementares e extensão da fita complementar ao molde. Os segmentos de DNA são sintetizados em uma progressão geométrica, pois a cada ciclo origina-se um novo segmento a partir do inicial e de cada um dos segmentos já produzidos no ciclo anterior.

Inicialmente, a enzima utilizada para a reação de PCR era a DNA polimerase de *Escherichia coli*, fragmento Klenow DNA polimerase I (ERLICH et al., 1991; SLIGHTON et al., 1995), que, por ser termolábil, era adicionada a cada ciclo de reação, pois era destruída na etapa seguinte de desnaturação. Atualmente, é utilizada a DNA polimerase isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988) – por isso, chamada Taq DNA polimerase. Essa enzima permite a realização de múltiplos ciclos de reação, com uma única adição de enzima, o que possibilitou a automatização da reação, ampliando o seu uso. A Taq DNA polimerase suporta temperaturas de 95 °C e é mais ativa entre 70 °C e 75 °C, temperatura em que o pa-

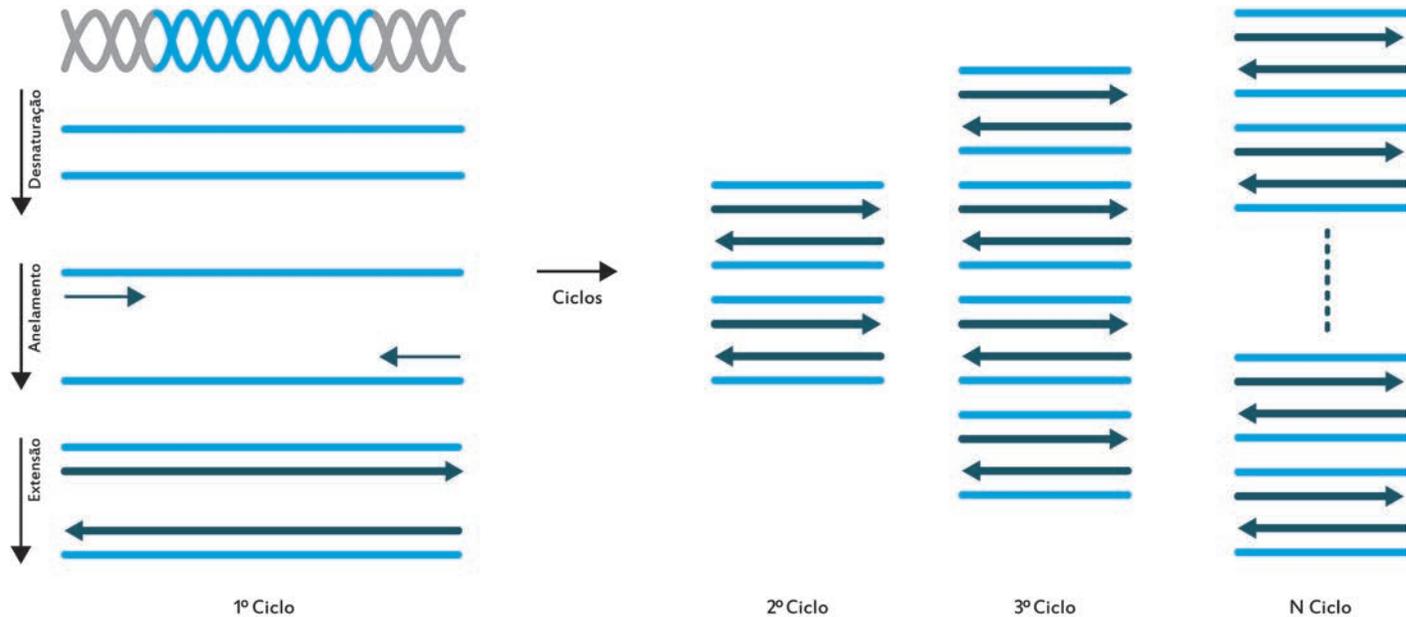


Figura 1. Representação esquemática de PCR. No primeiro ciclo estão detalhadas todas as etapas da reação que se inicia com a desnaturação do DNA em alta temperatura, seguida pelo anelamento dos iniciadores com a fita molde (em azul) com a diminuição da temperatura, e pela extensão da fita (seta) na extremidade 3' do iniciador (ponta da seta), pela DNA polimerase, na presença dos nucleotídeos trifosfato. Essas três etapas definem um ciclo, e a cada ciclo o número de segmentos de DNA é duplicado, pois, do segundo ciclo em diante, as fitas de DNA formadas servem de molde na reação seguinte. Assim, a partir de uma molécula de DNA molde, duas moléculas do fragmento delimitado pelos oligonucleotídeos são geradas ao final do primeiro ciclo. Após o segundo ciclo, quatro moléculas são geradas; após o terceiro ciclo, oito moléculas; e assim por diante em progressão geométrica, até o ciclo "n", no qual 2^n moléculas serão produzidas.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

reamento entre os iniciadores e o DNA é mais específico (estringente) do que a $37\text{ }^\circ\text{C}$, temperatura ótima para a polimerase de *E. coli* (SINGER; BERG, 1991). Atualmente, existem opções de enzimas de alta fidelidade, com taxas de incorporação de erros significativamente menores do que a Taq DNA polimerase (CLINE et al., 1996). A alta fide-

lidade dessas enzimas se deve à atividade exonucleásica 3'–5', que permite à enzima corrigir erros de incorporação (*proofreading*). Alguns produtos são fornecidos como misturas entre enzimas Taq e outras com *proofreading*; em outros casos, como no da Pfu DNA polimerase, isolada do organismo *Pyrococcus furiosus*, a própria enzima já possui

proofreading. Enzimas de alta fidelidade podem diminuir erros de incorporação em até 40 vezes, uma característica importante para clonagem e expressão de genes (CLINE et al., 1996).

Para uma reação de PCR, é necessária, portanto, uma amostra do ácido nucleico com o fragmento a ser amplificado (molde); a enzima capaz de estender uma nova fita de DNA; os iniciadores específicos para fornecer a extremidade OH para a DNA polimerase e indicar o ponto de início da extensão; os nucleotídeos que constituirão o novo fragmento; e os cofatores da reação, em tampão.

PCR tem a vantagem de necessitar quantidades muito pequenas do DNA a ser amplificado. É uma técnica tão sensível, que o DNA isolado de uma única célula (por exemplo, protoplastos vegetais) é suficiente para a detecção de sequências específicas de genes (BROWN et al., 1993). Além da detecção de fragmento (genes ou não) em uma amostra de DNA genômico, a PCR pode ser aplicada para clonagem de fragmentos de DNA; PCR inversa, usada para análise de sequências não conhecidas; RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que permite a análise genômica de indivíduos ou de populações (WILLIAMS et al., 1990); RT-PCR (PCR, usando como molde o produto da transcriptase reversa) (LIANG; PARDEE, 1992), que permite a análise da expressão gênica, mutagenese direta ou indireta, análise da estrutura de genoma, análise de interações DNA-proteína, evolução molecular, identificação de mutações, detecção de novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo, diagnóstico de

patógenos e de doenças hereditárias, e a identificação de anormalidades cromossômicas e mutações somáticas específicas (ERLICH, 1989; ERLICH et al., 1991; HAMILL et al., 1991; HULTEN et al., 2003; MULLIS et al., 1994; SYVANEN, 2001; WRIGHT; WYNFORD-THOMAS, 1990; YAMAMOTO, 2002).

Principais parâmetros da PCR

O resultado da amplificação de ácido desoxirribonucleico por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose, após coloração com brometo de etídio (Figura 2). O sucesso da amplificação depende das condições de reação, da pureza dos reagentes utilizados e dos diferentes parâmetros da reação. Tais parâmetros podem ser testados e otimizados para diferentes reações ou aplicações da reação e devem ficar dentro dos limites citados abaixo. Parâmetros fora desses limites podem afetar o sucesso da amplificação ou gerar produtos inespecíficos. Os parâmetros são:

- Quantidade da enzima: de 1 U a 2,5 U para reações com volumes de 25 μ L a 50 μ L ou 1 U a 4 U para um volume de 100 μ L.
- Concentração de nucleotídeos: os quatro deoxinucleotídeos devem estar na mesma concentração, para evitar incorporações erradas. A concentração de cada nucleotídeo deve ficar entre 20 μ M e 200 μ M (INNIS; GELFAND, 1990). Concentrações muito reduzidas de dNTPs, em relação ao magnésio livre na reação, levam a

resultados inconsistentes, com formação de artefatos (MULLIS et al., 1994).

- Concentração de iniciadores: de 100 nM a 500 nM.
- Concentração de magnésio no tampão: 0,5 mM a 2,5 mM acima da concentração total de nucleotídeos. Uma concentração inadequada deste íon pode afetar o anelamento dos iniciadores, a temperatura de desnaturação das fitas de DNA, a especificidade do produto e a atividade e especificidade da enzima (INNIS; GELFAND, 1990). A concentração de 1,5 mM é usualmente adequada, quando se usam 200 μ M de cada nucleotídeo. O tampão de reação é geralmente fornecido pelo fabricante, e alguns já contêm $MgCl_2$, enquanto outros fornecem o $MgCl_2$ separadamente.

Outros fatores podem também afetar o resultado da reação, como descrito a seguir:

- Pureza da preparação do DNA a ser amplificado: impurezas ou reagentes usados na preparação de DNA, como SDS, ureia, fenol ou formamida, podem inibir a ação da polimerase, provocando falsos negativos (Capítulo 11). Uma tentativa de resolver esse problema seria a diluição da preparação do DNA ou a purificação do DNA em colunas de sílica.
- Iniciadores: é um dos fatores mais importantes para o sucesso de uma reação. Seu tamanho pode estar entre 18 e 30 nucleotídeos, mas em geral

são usados iniciadores com 18 a 22 nucleotídeos (Tabela 1). Iniciadores muito pequenos têm baixa especificidade. Entre os parâmetros a serem considerados para o desenho de iniciadores, os mais importantes são: composição de GC dos iniciadores (deve ser de 50% a 60% do total de bases e evitando-se a presença de mais de 3 ou 4 Gs ou Cs seguidos, na extremidade 3'), tamanho dos iniciadores, temperatura de anelamento (depende do conteúdo GC e tamanho dos iniciadores). Não deve haver complementariedade entre os dois iniciadores, evitando-se sequências palindrômicas para prevenir a formação de dímeros dos iniciadores (INNIS; GELFAND, 1990). Existem vários programas eficientes disponíveis para o desenho de iniciadores, tanto pagos como gratuitos. Entre eles, um dos mais utilizados é o software gratuito Primer3¹ (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Também pode ser usada a ferramenta Primer-BLAST na plataforma do NCBI², que tem a vantagem de poder verificar o anelamento em regiões inespecíficas, nos casos em que se conhece o genoma completo de determinada espécie.

- Temperatura de desnaturação: deve estar entre 90 °C e 98 °C (ERLICH, 1989) – se for baixa, não há desnaturação. Uma variação de PCR comumente utilizada é o *hot start*, na qual se utiliza uma DNA

¹ Disponível em: <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>>.

² Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>.

polimerase associada a um anticorpo (KELLOGG et al., 1994) que inativa sua atividade. A elevação da temperatura a 95 °C durante o passo inicial de desnaturação degrada o anticorpo, liberando a atividade polimerásica. Esse procedimento evita o anelamento e extensão de produtos inespecíficos durante o preparo das reações de PCR, que geralmente é feito à temperatura ambiente. Pode-se também controlar a amplificação de produtos inespecíficos, evitando a atividade de extensão da polimerase durante o preparo das amostras, pela adição da enzima apenas quando a reação tiver a alta temperatura.

- Tempo de desnaturação: se for longo, poderá inativar a enzima.
- Temperatura de anelamento: deve estar entre 40 °C e 60 °C (ERLICH, 1989) e depende da composição de bases, do comprimento e da concentração dos iniciadores. A temperatura de anelamento depende da temperatura de desnaturação do iniciador (*melting temperature*, T_m). A maneira mais simples de calcular o T_m é por meio da fórmula $T_m = 4\text{ °C} \times (\text{número de Gs e Cs no iniciador}) + 2\text{ °C} \times (\text{número de As e Ts no iniciador})$. Empiricamente, a temperatura de anelamento é mais baixa (de 3 °C a 5 °C) do que o menor T_m do par de iniciador utilizado. Temperaturas muito baixas favorecem o anelamento não específico.

- Temperatura de alongamento: deve estar entre 70 °C e 75 °C (ERLICH, 1989). Se for baixa, há maior chance de aparecimento de produtos inespecíficos. Em condições ideais, podem ser incorporados 2.000 nucleotídeos em 1 minuto. Algumas enzimas de alta fidelidade têm atividade ótima a 68 °C, portanto é preciso consultar a recomendação de cada fabricante.
- Número de ciclos: não deve ser maior que 40. O aumento do número de ciclos não corresponde ao aumento da quantidade de produto, pois há um platô, resultante do aumento da concentração de fragmentos amplificados, que competem com os iniciadores no anelamento, acarretando um desequilíbrio entre a quantidade de enzima e de substrato. Com um número maior de ciclos, aumenta-se a probabilidade de aparecimento de produtos não específicos, como dímeros dos iniciadores, que são amplificados em concatenação.
- Tamanho do fragmento de DNA a ser amplificado: em geral deve estar entre 50 e 2.500 nucleotídeos. Fragmentos mais longos podem ser amplificados (ALLY et al., 1996; NATHAN et al., 1995), porém, com aumento na probabilidade de erros de incorporação. Misturas de polimerases, contendo DNA polimerases de alta processividade e fidelidade podem permitir a amplificação de produtos maiores, acima de 10.000 nucleotídeos.

A taxa de incorporações erradas de nucleotídeos pode ser reduzida a menos que 10^{-5} nucleotídeos por ciclo, em condições de reação de baixa concentração de dNTPs e $MgCl_2$, alta temperatura de anelamento e menor tempo de alongamento (ERLICH et al., 1991), e também pela utilização de enzimas de alta fidelidade. Enzimas de alta fidelidade possuem atividade exonucleásica 3'-5', ou são misturas entre a atividade polimerásica da Taq polimerase e a atividade 3'-5' exonucleásica de outra fonte. O resultado da incorporação da atividade exonucleásica na reação de PCR é o aumento da fidelidade em 10 a 100 vezes quando comparado com a Taq polimerase normal. Enzimas de alta fidelidade têm, de um modo geral, um custo mais elevado em relação às Taq polimerases comuns e, por essa razão, geralmente são utilizadas apenas quando a preservação da sequência é essencial, como no isolamento e caracterização da sequência de um gene-alvo ou na amplificação e expressão de um determinado gene.

A PCR aplicada a plantas transgênicas

A PCR é largamente utilizada em análise de plantas transgênicas, pois permite a detecção rápida de genes em DNA genômico e em um grande número de amostras. É possível automatizar a PCR, utilizando robôs e placas de 96 poços, permitindo assim uma alta escala de processamento. A técnica de PCR pode ser utilizada não só para detectar possíveis linhagens transformadas em laboratório, mas também para monitorar o fluxo de transgenes em condições de campo, uma preocupação

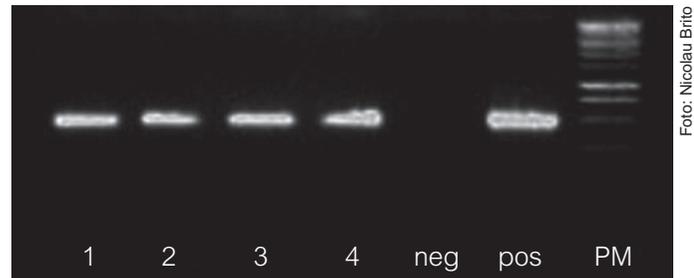


Foto: Nicolau Brito

Figura 2. Análises de amplificação por PCR por eletroforese em gel de agarose. Fragmentos de DNA corados com brometo de etídio, resultantes da amplificação do gene *gus*, a partir de DNA extraído de plantas de soja transformadas por bombardeamento de partículas (1 a 4), utilizando iniciadores para este gene, descritos na Tabela 1. Foi também incluído DNA de uma planta não transformada como controle negativo (neg) e DNA do plasmídeo utilizado para bombardeamento como controle positivo (pos). Fragmentos correspondentes ao tamanho esperado para os fragmentos amplificados podem ser visualizados nas quatro linhagens testadas. Foi usado como marcador de peso molecular (PM) 1 Kb Ladder (Invitrogen).

constante associada à biosegurança de plantas transgênicas (MESSEGUER, 2003; RIBEN et al., 2011).

A determinação de sequências das regiões genômicas flanqueadoras de inserções, sejam de T-DNA sejam transposons, é necessária para análises de genômica funcional e de desenvolvimento de plantas transgênicas. Na genômica funcional, sequências de T-DNA e transposons são frequentemente utilizados em experimentos de genética direta, em que mutações são geradas aleatoriamente e o fenótipo de interesse é descrito. Em seguida, o gene mutagenizado é mapeado e identificado.

No processo de liberação comercial de plantas transgênicas, a determinação da sequência de DNA da região de inserção do transgene faz parte das requisições. Várias técnicas foram descritas para esse fim, como resgate de plasmídeo, *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* (TAIL-PCR) e PCR inversa.

Para a detecção de genes introduzidos no genoma de plantas transgênicas, são necessárias:

- A seleção dos iniciadores para a região a ser amplificada.
- A determinação das condições e parâmetros da reação.
- A extração e quantificação de DNA genômico.

Rogers et al. (1996) testaram e compararam a eficiência, confiabilidade e tempo de execução de seis métodos de extração de DNA para PCR, usando folhas, raízes, sementes ou tubérculos. Dentre estes, destacaram-se o de Cheung et al. (1993), Edwards et al. (1991) e o de Wang et al. (1993). Uma pequena quantidade de DNA (20 ng a 200 ng por reação) é suficiente para uma reação de PCR. De acordo com o material do qual se quer extrair o DNA, podem ser utilizados diferentes métodos (Capítulo 9).

Para a identificação de regiões genômicas de integração de transgenes, pode-se utilizar a técnica de TAIL-PCR, que se baseia na utilização de três iniciadores específicos próximos (*nested primers*), complementares à região integrada, em conjunto com iniciadores de sequências randômicas que se ligarão arbitrariamente à região

genômica adjacente ao DNA integrado (LIU; WHITTIER, 1995; LIU et al., 1995). O princípio do método se baseia nas diferenças de T_m entre os iniciadores específicos e randômicos: os iniciadores específicos têm T_m alta, 60 °C a 65 °C, enquanto os iniciadores randômicos têm T_m baixa (40 °C a 45 °C). A programação de ciclos de PCR que alternam temperaturas de anelamento de maior estringência com temperaturas de menor estringência (PCR assimétrica) favorece a amplificação de produtos específicos em detrimento dos inespecíficos. Resumidamente, a metodologia de TAIL-PCR se inicia com uma reação de PCR primária e o primeiro oligonucleotídeo específico mais externo e a alternância de ciclos de alta estringência com baixa estringência. O produto da PCR primária é utilizado como molde para a PCR secundária, usando-se o oligonucleotídeo específico adjacente e mais interno ao utilizado na reação primária. De forma similar, a reação secundária é utilizada como molde na reação terciária, utilizando o oligonucleotídeo específico mais interno. Os produtos são separados por eletroforese em gel de agarose, clonados e sequenciados. Alterações nessa metodologia básica que combina TAIL-PCR e PCR supressão foram relatadas para aumentar a eficiência do método e favorecer o isolamento de fragmentos maiores, denominado *high efficiency TAIL-PCR* (hiTAIL-PCR) (LIU; CHEN, 2007).

A PCR inversa se baseia na utilização de iniciadores desenhados em direções opostas, porém, não delimitando o fragmento a ser amplificado dentro da sequência de DNA conhecida, ao contrário da PCR convencional, em que os iniciadores são desenhados em orientações opostas,

porém, delimitam a região a ser amplificada. Nessa técnica, o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição que não cortam a região de DNA genômico conhecida, ou que cortam apenas uma vez. Os fragmentos digeridos são religados, e duas rodadas de PCR são realizadas (Figura 3).

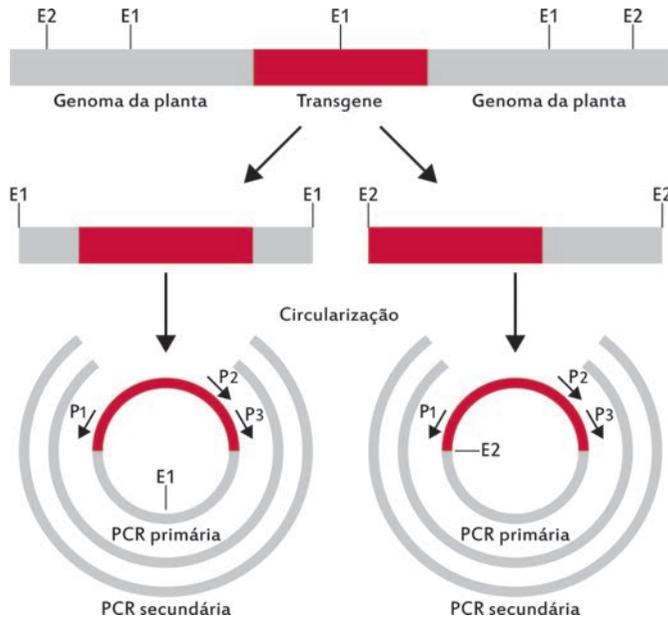


Figura 3. Representação esquemática da PCR inversa. Os iniciadores são desenhados na borda do transgene com direções opostas (P1, P2 e P3). O DNA é digerido com uma enzima de restrição que não tenha sítio no transgene (E1) ou que tenha apenas um sítio no transgene (E2). O DNA digerido é religado e submetido à reação de PCR primária (P1/P2) e posteriormente secundária (P1/P3). Os produtos de PCR são clonados e sequenciados para determinar a região de integração do transgene.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

A religação vai gerar fragmentos de DNA circulares contendo, entre várias combinações, o DNA conhecido e suas regiões flangeadoras. A partir dessa molécula circular, uma reação de PCR convencional utilizando iniciadores específicos à região conhecida é feita. Dessa forma, as regiões que flanqueiam o DNA conhecido são amplificadas e podem ser clonadas e sequenciadas normalmente. Inicialmente descrita em 1988 (OCHMAN et al., 1988), essa técnica tem sido utilizada para análise de inserção de elementos virais e retroelementos além da inserção de transgenes (SILVER; KEERIKATTE, 1989; TRIGLIA et al., 1988).

Neste capítulo, é apresentado um protocolo para PCR devidamente testado e com as condições da reação ajustadas para amplificação de fragmentos dos genes *nptII* e *gus* (ARAGÃO et al., 1996). Além disso, são apresentados protocolos para duas técnicas derivadas que permitem analisar as regiões de integração do gene exógeno em transgênicos: *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* (TAIL-PCR) e PCR inversa.

2 PCR e análise em gel de agarose

2.1 Material

- Cuba e fonte para eletroforese.
- DNA extraído do material a ser analisado (6 ng/μL a 10 ng/μL).

- Gel de agarose (0,8% a 1,0 % p/v) em tampão TBE 0,5X ou TAE 1X, com brometo de etídio (Apêndice 4).



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Iniciador A 10 μ M.
- Iniciador B 10 μ M.
- Mistura dos 4 nucleotídeos (dNTPs) a 4 mM cada um.
- Tampão de amostra para eletroforese 10X (Apêndice 4).
- Tampão para PCR 10X.
- Tampão TBE 0,5X (Apêndice 4).
- Taq DNA polimerase (Taq pol) (5 U/ μ L).
- Termociclador (*DNA Thermal cycler*).
- Transiluminador (ultravioleta).



A exposição à **radiação ultravioleta** pode causar danos à retina e à pele. Sua manipulação deve ser feita com óculos de proteção específicos para luz UV. Procurar não expor a pele, usando jaleco de mangas longas e luvas.

- Tubos para reação de PCR (novos e esterilizados por autoclavagem).

2.2 Procedimento

1. Preparar a mistura de reação, para 10 amostras, em tubo de microcentrífuga, novo e esterilizado por autoclavagem, conforme:

Componente	Concentração final	Volume para 1 amostra	Volume para 10 amostras
Tampão para PCR 10X	1X	2,5 μ L	25,0 μ L
Iniciador A 10 μ M	200 nM	0,5 μ L	5,0 μ L
Iniciador B 10 μ M	200 nM	0,5 μ L	5,0 μ L
dNTPs 4 mM cada	0,16 mM cada	1,0 μ L	10,0 μ L
Taq pol 5 U/ μ L	2,5 U	0,5 μ L	5,0 μ L
H ₂ O deionizada		18,0 μ L	180 μ L

Número de amostras = 10 (9 contendo DNA e 1 controle)

Volume de reação/tubo = 25 μ L

Volume final = (25 μ L x número de amostras) - (volume de DNA x número de amostras)

Volume final = (25 x 10) - (2 x 10) = 250 - 20 = 230 μ L

2. Adicionar e misturar em cada tubo de reação:

- 23 μ L da mistura de reação (25 μ L – volume de solução de DNA).
- 2,0 μ L DNA genômico (6 ng/ μ L a 10 ng/ μ L) (no tubo controle, adicionar o mesmo volume de H₂O deionizada).

Usar tubos compatíveis com o termociclador e identificar os tubos, numerando também as tampas.

- Colocar uma gota de óleo mineral sobre a mistura, para evitar evaporação durante a reação.

Dependendo do tipo de termociclador usado (com tampa aquecedora), este procedimento não é necessário.

- Colocar os tubos no termociclador.
- Programar a máquina conforme as seguintes condições:

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	95 °C	5 minutos
Ciclos (35)	95 °C	1 minuto (desnaturação)
	55 °C	1 minuto (anelamento)
	72 °C	2 minutos (alongamento)
Final	72 °C	7 minutos
	4 °C	Indeterminado

Essas condições são utilizadas em reações com os iniciadores para *gus* e *nptII* (Tabela 1).

- Dar início à reação.
- Ao término da reação, aplicar metade do volume das amostras em gel de agarose e fazer migrar o DNA por eletroforese (por 1 hora, com uma corrente de 100 V).

Acrescentar entre as amostras um marcador de peso molecular ao gel.

- Visualizar o DNA corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta.
- Analisar os resultados.

Para confirmar se os fragmentos amplificados correspondem ao esperado, realizar análise por *Southern blot* (Capítulo 12).

2.3 Observações

Como são sintetizadas milhões de cópias de DNA, a contaminação de amostras de reação por resíduos, em tubos usados em outras reações ou extrações, ou por outras fontes de contaminação, deve ser considerada e minimizada. Essa contaminação pode determinar o aparecimento de falsos positivos, gerando dados que não refletem o resultado da pesquisa. Para a detecção de possível contaminação, é necessária a inclusão de um ou mais tubos controle, sem adição de DNA, aconselhando-se também a inclusão de um controle com adição de DNA e sem adição de iniciadores. Para evitar contaminações, devem ser usados somente tubos e ponteiras novos, autoclavados, ponteiras com *plugs* micropipetas de uso exclusivo para PCR e capelas de fluxo laminar para preparação da reação. É importante também dividir previamente as soluções em alíquotas e pipetar cuidadosamente, evitando a formação de aerossol.

Quando houver suspeita de contaminações com proteases, a amostra deve ser aquecida a 95 °C por 1 a 2 minutos, antes de se adicionar a Taq polimerase.

As soluções estoques de 10 mM de dNTPs, quando preparadas, devem ser neutralizadas para pH 7,0, divididas em alíquotas e conservadas a -20 °C. Diluí-las para 4 mM quando forem usadas.

Para melhorar a eficiência da reação, isto é, a quantidade de DNA amplificado, ou eliminar falsos negativos, pode-se usar no tampão de reação 0,1% (v/v) de Triton

Tabela 1. Exemplos de iniciadores utilizados para análise de plantas transgênicas por PCR.

Gene	Posição	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento	Referência
<i>gus</i> (β-glucuronidase)	251 671c	TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT ATCACGCAGTTCAACGCTGAC	420 pb	Moore et al. (1992)
<i>neo</i> (neomicina fosfotransferase)	60 470	GAGGCTATTTCGGCTATGACTG TCGACAAGACCGGCTTCCATC	410 pb	Aragão et al. (1996)
<i>neo</i> (neomicina fosfotransferase)	151 941	ATGATTGAAGAAGATGGATTG GAAGAACTCGTCAAGAAGGCG	790 pb	Brown et al. (1993)
<i>epsps</i> (enol-piruvil- shiquimato- fosfato sintase)	1 654	ATGTCGCACGGTGCAAGCAG CGTCTCGACGGTAAGGTTGG	654 pb	Abud et al. (2007)
<i>bar</i> (fosfinotricina acetil transferase)	90 536	GGTCTGCACCATCGTCAACC CTGAAGTCCAGTGCCAGAA	527 pb	Aragão et al. (2002)
<i>ef1</i> ⁽¹⁾ (fator de elongação 1)	1 358	AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG	358 pb	Abreu e Aragão (2007)

⁽¹⁾ O par de iniciadores *ef1* pode ser usado como controle interno em várias espécies como feijão, soja, feijão-caupi, maracujá e milho.

Outros exemplos de iniciadores podem ser encontrados em (HAMILL et al., 1991; SLIGHTON et al., 1995).

X-100 ou surfactante polisorbato 20 a 0,1% (p/v) de gelatina ou 0,1 µg/µL de albumina de soro bovino (BSA) não acetilada. Para moldes ricos em GC, DMSO pode ser utilizado a uma concentração final de 2% a 5%, uma vez que interfere na formação de estruturas secundárias.

Se o motivo de insucesso em uma reação não for detectado, deve-se tentar produzir novos iniciadores,

movendo por algumas bases em qualquer direção do fragmento a ser amplificado.

PCR é um processo coberto por patente concedida à Hoffmann-La Roche. No Brasil, o uso de processos ou produtos patenteados é liberado para fins de pesquisa. Entretanto, se for utilizado para qualquer fim comercial, terá que ter licença do detentor da patente.

3 Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)

3.1 Material

- Água destilada, esterilizada por autoclavagem.
- DNA genômico de boa qualidade.
- Iniciadores degenerados [*arbitrary degenerate (AD) primers*] (LIU; WHITTIER, 1995).
- Iniciadores específicos P1, P2 e P3 a 10 µM.
- Kit para purificação de fragmentos de DNA de gel.
- Mistura de dNTPs a 4 mM cada.
- Tampão para PCR 10X.
- Taq DNA polimerase de alta fidelidade.
- Termociclador.
- Tubos de microcentrífuga de 1,7 mL e para PCR de 0,2 mL.
- Vetor para clonagem de produtos de PCR.

3.2 Procedimento

1. Após isolar DNA genômico, montar a reação de PCR primária com os seguintes componen-

tes (preparar uma reação para cada iniciador degenerado):

Componente	Concentração final	Volume para 1 amostra	Volume para 10 amostras
Tampão para PCR 10X	1X	5,0 µL	50,0 µL
MgSO ₄ 50 mM	2 mM	2,0 µL	20,0 µL
Iniciador específico P1 10 µM	100 nM	0,5 µL	5,0 µL
Iniciador degenerado 10 µM	100 nM	0,5 µL	5,0 µL
dNTPs 4 mM cada	248 nM cada	3,1 µL	31,0 µL
Platinum Taq High Fidelity 5 U/µL	1,5 U	0,3 µL	3,0 µL
DNA genômico (100 ng/µL)	100 ng	1,0 µL	
H ₂ O deionizada		37,6 µL	376 µL

2. Colocar os tubos de reação no termociclador programado da seguinte forma:

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	95 °C	1 minuto
	95 °C	1 minuto
Ciclos (5)	62 °C	1 minuto
	68 °C	2 minutos

Etapa	Temperatura	Tempo
Ciclos (1)	95 °C	1 minuto
	25 °C	3 minutos
	68 °C	3 minutos (<i>ramping</i>) ⁽¹⁾
	68 °C	2,5 minutos
Ciclos (15)	95 °C	30 segundos
	66 °C	1 minuto
	68 °C	2,5 minutos
	95 °C	30 segundos
	44 °C	1 minuto
	68 °C	2,5 minutos
	Ciclo final	68 °C

⁽¹⁾ *Ramping* refere-se à subida de temperatura de 25 °C a 68 °C ao longo de 3 minutos.

- Diluir a reação primária 50 vezes com água autoclavada e usar 1 µL para realizar a reação secundária usando os mesmos componentes da reação primária, o iniciador específico P2 e o mesmo iniciador degenerado utilizado na reação primária.
- Colocar os tubos de reação no termociclador e utilizar o mesmo programa da reação primária (etapa 2 deste item).
- Diluir a reação secundária 10 vezes com água e utilizar 1 µL para a reação terciária, utilizando os mesmos componentes, o iniciador específico P3 e o mesmo iniciador degenerado utilizado nas reações primária e secundária.

- Colocar os tubos de reação no termociclador utilizando o seguinte programa:

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	95 °C	1 minuto
	95 °C	30 segundos
	64 °C	1 minuto
Ciclos (12)	68 °C	2,5 minutos
	94 °C	30 segundos
	44 °C	1 minuto
	68 °C	2,5 minutos
Ciclo final	68 °C	5 minutos

- Analisar produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. Cortar fragmentos do gel, purificar usando kits comerciais e clonar em vetores para produtos de PCR.

4 PCR inversa (iPCR)

4.1 Material

- Água destilada, esterilizada por autoclavagem.
- DNA genômico de boa qualidade.
- Fenol:clorofórmio:álcool isoalmílico (25:24:1; Apêndice 4).



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Iniciadores específicos P1, P2 e P3 a 10 µM.
- Kit para purificação de DNA de gel de agarose.
- Mistura de dNTPs a 4 mM cada.
- T4 DNA Ligase.
- Tampão de reação 10X.
- Taq DNA polimerase de alta fidelidade.
- Termociclador.
- Tubos de microcentrífuga 1,7 mL e para PCR de 0,2 mL.
- Vetor para clonagem de produtos de PCR.

4.2 Procedimento

1. Digerir de 2 µg a 5 µg de DNA genômico com uma enzima de restrição apropriada durante 16 horas.

Usar a enzima de acordo com as especificações do fabricante, tendo o cuidado de que o volume de enzima utilizado não ultrapasse 10% do volume final da reação.

2. Inativar a enzima por aquecimento ou extração com fenol:clorofórmio:álcool isoalmílico 25:24:1.

Algumas enzimas são sensíveis ao calor, e aquecimento de 65 °C a 80 °C por 15 a 20 minutos é o suficiente para sua inativação; no entanto, outras são resistentes ao calor e requerem extração com solvente orgânico e posterior precipitação com etanol ou isopropanol.

3. Montar sistema de ligação com a T4 DNA ligase a 12 °C por 16 horas, de acordo com recomendações do fabricante.

Podem-se usar 100 µL de DNA digerido em um sistema de ligação com volume de 200 µL. Neste ponto, as moléculas circulares serão produzidas.

4. Preparar a PCR inversa com os seguintes reagentes:

Componente	Concentração final	Volume para 1 amostra	Volume para 10 amostras
Tampão para PCR 10X	1X	5,0 µL	50,0 µL
MgSO ₄ 50 mM	2 mM	2,0 µL	20,0 µL
Iniciador específico P1 10 µM	100 nM	0,5 µL	5,0 µL
Iniciador degenerado 10 µM	100 nM	0,5 µL	5,0 µL
Nucleotídeos 4 mM cada	248 nM cada	3,1 µL	31,0 µL
Platinum Taq High Fidelity 5 U/µL	1,5 U	0,3 µL	3,0 µL
Produto de ligação DNA		2,0 µL	
H ₂ O deionizada		36,6 µL	366 µL

5. Colocar as reações no termociclador utilizando o seguinte programa:

Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-ciclo	95 °C	3 minutos
Ciclos (35 a 40)	95 °C	30 segundos (desnaturação)
	55 °C	30 segundos (anelamento)
	68 °C	3 a 6 minutos (alongamento)
Ciclo final	68 °C	10 minutos

6. Para a segunda reação de PCR, utilizar 1 µL da primeira reação como molde com o iniciador interno P3 a uma temperatura de anelamento mais alta (> 60 °C). Utilizar as mesmas condições e o mesmo programa de PCR.
7. Analisar os produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. Cortar o fragmento de DNA amplificado do gel com bisturi, purificar utilizando um kit de purificação de gel de acordo com as recomendações do fabricante.
8. Clonar os fragmentos purificados em vetor de PCR apropriado. Sequenciar de 5 a 10 clones.

5 Referências

ABREU, E.; ARAGÃO, F. Isolation and characterization of a *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. **Annals of Botany**, London, v. 99, n. 2, p. 285-292, 2007.

ABUD, S.; SOUZA, P. I. M. de; VIANNA, G. R.; LEONARDECZ, E.; MOREIRA, C. T.; FALEIRO, F. G.; NUNES JÚNIOR, J.; MONTEIRO, P. M. F. O.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Gene flow from transgenic to non transgenic plants of soybean in the Cerrado region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 445-452, 2007.

ALLY, A.; SOLUS, J.; BLAKESLEY, R. PCR analysis of genomic DNA isolated from blood. **Focus**, Gaithersburg, v. 18, p. 19-22, 1996.

ARAGÃO, F.; BARROS, L.; BRASILEIRO, A.; RIBEIRO, S.; SMITH, F.; SANFORD, J.; FARIA, J.; RECH, E. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1/2, p. 142-150, 1996.

ARAGÃO, F.; VIANNA, G.; ALBINO, M.; RECH, E. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1298-1302, 2002.

BROWN, P.; LANGE, F.; KRANZ, E.; LÖRZ, H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 237, n. 3, p. 311-317, 1993.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insects suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 3, n. 1, p. 69-70, 1993.

CLINE, J.; BRAMAN, J.; HOGREFE, H. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 18, p. 3546-3551, 1996.

DREVET, C.; BRASILEIRO, A.; JOUANIN, L. Oncogene arrangement in a shooty strain of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 83-90, 1994.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 6, p. 1349, 1991.

ERLICH, H. (Ed.). **PCR technology: principles and applications for DNA amplification**. New York: M Stackton Press, 1989. 246 p.

ERLICH, H.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, DC, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, 1991.

HAMILL, J.; ROUNSLEY, S.; SPENCER, A.; TODD, G.; RHODES, J. The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 5, p. 221-224, 1991.

- HULTEN, M.; DHANJAL, S.; PERTL, B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 279-297, 2003.
- INNIS, M.; GELFAND, D. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSKI, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.
- KELLOGG, D.; RYBALKIN, I.; CHEN, S.; MUKHAMEDOVA, N.; VLASIK, T.; SIEBERT, P.; CHENCHIK, A. *TaqStart* Antibody: hot start PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against *Taq* DNA polymerase. **Biotechniques**, Natick, v. 16, n. 6, p. 1134-1137, 1994.
- LIANG, P.; PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, DC, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.
- LIU, Y.-G.; WHITTIER, R. F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, San Diego, v. 25, n. 3, p. 674-681, 1995.
- LIU, Y.-G.; CHEN, Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. **Biotechniques**, London, v. 43, n. 5, p. 649-650, 2007.
- LIU, Y.-G.; MITSUKAWA, N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R. F. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis-Thaliana T-Dna insert junctions by thermal asymmetric interlaced Pcr. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 457-463, 1995.
- MESSEGUER, J. Gene flow assessment in transgenic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 73, n. 3, p. 201-212, 2003.
- MOORE, G.; JACOMO, C.; NEIDIGH, J.; LAWRENCE, S.; CLINE, K. Agrobacterium-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 5/6, p. 238-242, 1992.
- MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MULLIS, K.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. (Ed.). **The polymerase chain reaction**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994.
- NATHAN, M.; MERTZ, L.; FOX, D. Optimizing long RT-PCR. **Focus**, Gaithersburg, v. 17, p. 78-80, 1995.
- OCHMAN, H.; GERBER, A.; HARTL, D. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. **Genetics**, Baltimore, v. 120, n. 3, p. 621-625, 1988.
- RIEBEN, S.; KALININA, O.; SCHMID, B.; ZELLER, S. L. Gene flow in genetically modified wheat. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29730, 2011.
- ROGERS, H.; BURNS, N.; PARKES, H. Comparison of small-scale methods for rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 14, n. 2, p. 170-183, 1996.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, DC, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.
- SILVER, J.; KEERIKATTE, V. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 63, n. 5, p. 1924-1928, 1989.
- SINGER, M.; BERG, P. **Genes & genomes**. California: University Science Books, 1991. 929 p.
- SLIGHTON, J.; DRONG, R.; CHEE, P. Polymerase chain reaction: gene detection, inverse PCR and genetic engineering. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-24.
- SYVANEN, A.-C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 2, n. 12, p. 930-942, 2001.
- TRIGLIA, T.; PETERSON, M.; KEMP, D. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 16, p. 8186, 1988.
- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 17, p. 4153-4154, 1993.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful

as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, P. A.; WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in

diagnosis and reasearch. **Journal of Pathology**, Chichester, v. 162, n. 2, p. 99-117, 1990.

YAMAMOTO, Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, DC, v. 9, n. 3, p. 508-514, 2002.

Capítulo 11

Preparação de sondas

Simone da Graça Ribeiro
Ana Claudia Guerra Araujo

1 Introdução

Sequências complementares de ácidos nucleicos têm a capacidade de se hibridizar, ou seja, as bases pareiam para formar uma estrutura em fita dupla. A capacidade de hibridização de duas moléculas de DNA e/ou RNA constitui, portanto, um teste de sua complementaridade. Assim, a hibridização de ácidos nucleicos é uma técnica amplamente empregada em biologia molecular, e várias etapas da clonagem, caracterização e análise de genes endógenos e transgenes em plantas envolvem sua utilização. O sucesso de técnicas de hibridização entre moléculas de DNA como *Southern blot* (Capítulo 12) e hibridização in situ por fluorescência (FISH), Capítulo 13, ou de RNA-DNA (*Northern blot* e hibridização in situ, Capítulos 14 e 16, respectivamente) depende de métodos que permitam a marcação de fragmentos de ácidos nucleicos utilizados como sondas. A sequência da sonda deve ser complementar à sequência do ácido nucleico-alvo, e a escolha do método de marcação da sonda depende principalmente da sensibilidade e resolução requeridas pelo experimento.

Sondas podem ser marcadas pela adição de nucleotídeos com moléculas radioativas ou não radioativas. Até o início da década de 1970, a marcação radioativa de ácidos nucleicos somente era possível por meio de reações metabólicas, nas quais precursores radioativos eram introduzidos em células que estavam sintetizando o DNA de interesse. Tais procedimentos envolviam a utilização de uma enorme quantidade de radioisótopos e de métodos muito trabalhosos de purificação do ácido nucleico

marcado. Além disso, as sondas obtidas apresentavam baixa atividade específica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Métodos mais rápidos e eficientes de síntese in vitro de ácidos nucleicos marcados radioativamente foram desenvolvidos posteriormente e permitiram a redução da quantidade de precursor radioativo, gerando sondas com maior atividade específica (BRAY-WARD, 2002; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A marcação de sondas com nucleotídeos radioativos, especialmente [$\alpha^{32}\text{P}$] ou [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP e dATP e [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, tem sido o método mais usado para a preparação de sondas altamente sensíveis. Entretanto, em razão de problemas gerados pela utilização de radioatividade (risco para a saúde, produção e descarte de lixo radioativo, além de meia-vida curta dos isótopos mais utilizados), métodos alternativos, que não empregam elementos radioativos, têm sido frequentemente preferidos (ACCOTTO et al., 1998).

A marcação não radioativa de sondas consiste na adição de nucleotídeos, preferencialmente uridina, associada, na maioria das vezes, a moléculas repórteres, como haptenos, fluoróforos (moléculas que emitem fluorescência quando excitadas) ou enzimas. Os haptenos mais comumente usados como moléculas repórteres são a digoxigenina (digoxigenina-11-dUTP) e biotina (14 ou 16-dCTP-biotina), enquanto o fluoróforo e a enzima mais utilizados são, respectivamente, a fluoresceína-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e a fosfatase alcalina.

A detecção da sonda não radioativa pode ser feita direta ou indiretamente. Quando nucleotídeos na sonda

estão marcados com um fluoróforo, os sítios de hibridização podem ser observados diretamente com auxílio de luz ultravioleta em microscópio epifluorescente ou com laser em microscópio confocal. Quando nucleotídeos da sonda estão marcados com haptenos ou enzimas, a detecção é feita indiretamente. Isso se dá por meio do reconhecimento dessas moléculas-repórter por anticorpos ou moléculas que tenham afinidade com os nucleotídeos e que estejam conjugados a fluoróforos ou a outros marcadores passíveis de detecção. Por exemplo, a detecção de sonda marcada com biotina pode ser feita usando avidina conjugada a um fluoróforo, e os sítios de hibridização podem ser detectados em microscópio de epifluorescência. Caso a molécula de avidina esteja conjugada à enzima fosfatase alcalina, é necessária a adição do substrato dessa enzima e de um agente que precipita o produto dessa reação (detecção com substrato colorimétrico NBT/BCIP – azul nitro de tetrazólio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil). Ainda, pode ser utilizado um anticorpo antibiotina conjugado a um fluoróforo ou a uma enzima. Sondas marcadas com digoxigenina são normalmente detectadas por anticorpo antidigoxigenina conjugado a um fluoróforo ou a uma enzima.

Sondas não radioativas apresentam algumas vantagens em relação àquelas radioativas, tais como período menor de tempo de exposição para detecção do sinal de hibridização, maior estabilidade e menor risco pela ausência de radioatividade. Entretanto, muitos experimentos utilizam sondas radioativas, pois são mais sensíveis (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A preparação de sondas (radioativas ou não) pode incluir procedimentos para marcação uniforme de cadeias longas de fita dupla (*random primer* e *nick translation*) ou fita simples (*riboprobes*); marcação de uma das extremidades (utilizando fragmento Klenow da DNA polimerase I, T4 DNA polimerase, T4 polinucleotídeo quinase ou terminal transferase) (RIBEIRO, 1998; SAMBROOK; RUSSEL, 2001); ou ainda, marcação de sondas por PCR (SABELLI; SHEWRY, 1995).

Os princípios de alguns desses métodos comumente utilizados para a marcação de sondas de ácidos nucleicos (*random primer*, *nick translation* e marcação de extremidades 5' com T4 polinucleotídeo quinase) serão apresentados a seguir e estão esquematizados na Figura 1.

Marcação de sondas por *random primer* (iniciadores randômicos)

A marcação de sondas por *random primer* (ou iniciadores randômicos – Figura 1A) é baseada no método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983, 1984), que utiliza sequências randômicas de hexa ou heptanucleotídeos, como iniciadores (*primers*). A síntese da sonda de DNA é realizada *in vitro* a partir de iniciadores randômicos que anelam em vários pontos da sequência de nucleotídeos do DNA-molde. A reação de polimerização dos nucleotídeos é catalisada pelo fragmento Klenow da enzima DNA polimerase I, com incorporação de dNTPs marcados e não marcados, fornecidos para a reação. A marcação é rápida (cerca de 1 hora) e realizada a 37 °C. A sonda resultante possui fita dupla, e seu tamanho é variável,

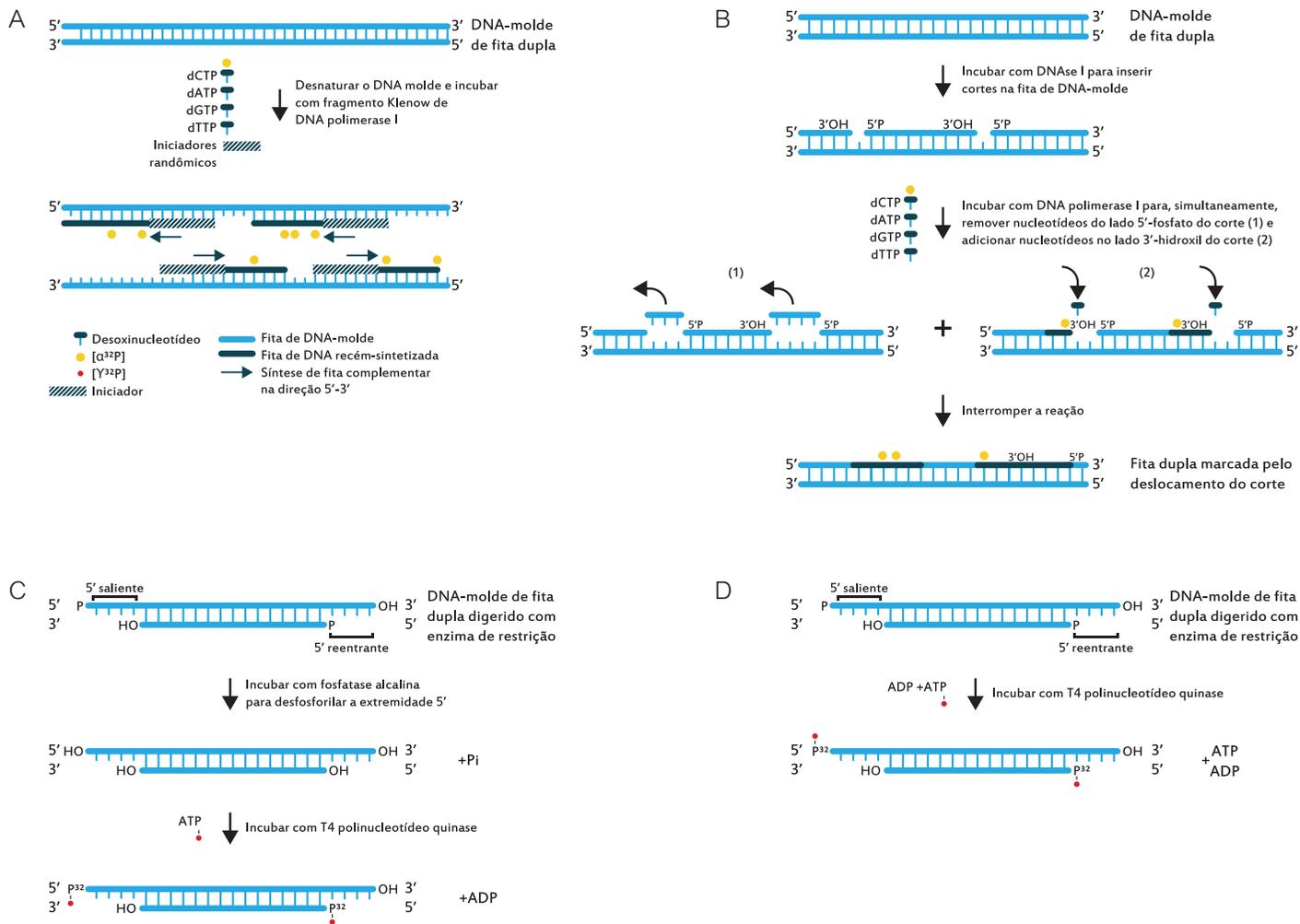


Figura 1. Esquemas de métodos para marcação de sondas de ácidos nucleicos: A) Marcação por *random primer* (iniciadores randômicos); B) Marcação por *nick translation* (deslocamento do corte); Marcação de extremidades 5' com T4 polinucleotídeo quinase por: C) reações com desfosforilação por fosfatase alcalina e D) reações por troca.

dependendo do tamanho do DNA-molde e da concentração dos iniciadores (sondas maiores são obtidas com menores concentrações de iniciadores). Diferentes dNTPs marcados podem ser utilizados na marcação por *random primer*, tais como [$\alpha^{32}\text{P}$] ou [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP ou dATP; digoxigenina 11-dUTP ou biotina-14 ou ainda 16-dUTP. Quando se utiliza dNTP radioativo, as sondas obtidas possuem alta atividade específica ($\sim 10^9$ cpm/ μg) (SABELLI; SHEWRY, 1995; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). No entanto, dNTPs não radioativos são mais seguros e estáveis.

A marcação de sondas por *random primer* pode ser feita com quantidade de DNA molde de 5 ng a 25 ng e tamanho ≤ 1.000 pb. Por essas características, esse tipo de marcação é comumente utilizado para obtenção de sondas para experimentos de FISH (Capítulo 13). Para DNA-moldes mais longos (> 1.000 pb), tais como DNA genômico ou aqueles oriundos de bibliotecas genômicas (YACs ou BACs), é importante que sejam fragmentados (entre 500 bp e 1.000 bp) por autoclavagem, sonicação, mecanicamente por passagem em seringa com agulha fina, hidrólise alcalina ou digestão com DNase (SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000) antes de sua marcação.

Marcação de sondas por *nick translation* (deslocamento do corte)

A marcação de sondas por *nick translation* (deslocamento do corte – Figura 1B) é baseada na atividade das enzimas DNase I e DNA polimerase I. A síntese da sonda é iniciada pelo tratamento do DNA-molde (fita dupla) com DNase I. Em condições controladas, esta nuclease

insere cortes aleatoriamente em uma das fitas do DNA. Em seguida, a DNA polimerase I, por meio de sua atividade exonucleásica na direção $5' \rightarrow 3'$, remove o nucleotídeo da extremidade 5'-fosfato onde foi feito o corte da fita do DNA-molde. Ao mesmo tempo, essa polimerase catalisa a adição de um nucleotídeo na extremidade 3'-hidroxila do corte. Assim, nucleotídeos são removidos e outros adicionados simultaneamente, havendo um deslocamento do corte (*nick translation*) ao longo da cadeia do DNA. Para adição de nucleotídeos, dNTPs marcados e não marcados são fornecidos para a reação (RIGBY et al., 1977). Da mesma forma que para marcação de sondas por *random primer*, diferentes tipos de dNTPs marcados podem ser utilizados para *nick translation*. Quando dNTPs radioativos são utilizados, as sondas resultantes têm tamanho variado, e a atividade específica é relativamente alta ($\sim 10^8$ cpm/ μg) (SABELLI; SHEWRY, 1995; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A marcação de sonda por *nick translation* utilizando dNTPs associados a haptenos tais como digoxigenina ou biotina é bastante empregada na obtenção de sondas para FISH (Capítulo 13). Entretanto, é necessária uma grande quantidade de DNA ($\geq 1 \mu\text{g}$) e, apesar de não necessário, recomenda-se fragmentar sequências mais longas de DNA (≥ 1 kb) antes da sua marcação.

Marcação de sonda nas extremidades 5' com T4 polinucleotídeo quinase

A obtenção de sondas marcadas por T4 polinucleotídeo quinase nas extremidades 5' de fragmentos de DNA (Figuras 1C e 1D) pode ser realizada por dois tipos de rea-

ção (CHACONAS; SANDE, 1980). No primeiro tipo (reações com desfosforilação por fosfatase alcalina, Figura 1C), a extremidade 5'-fosfato do DNA é desfosforilada pela enzima fosfatase alcalina. Em seguida, ocorre a transferência do fosfato marcado do $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP para a extremidade 5', catalisada pela enzima T4 polinucleotídeo quinase. O segundo tipo (reações por troca, Figura 1D) é realizado na presença de um excesso de $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP e ADP. Nessa reação ocorre uma transferência do fosfato da extremidade 5' do DNA para o ADP. A seguir, a extremidade 5' desfosforilada do DNA é novamente fosforilada pela T4 polinucleotídeo quinase, pela adição do $[\gamma^{32}\text{P}]$. Geralmente, a reação por troca não é tão eficiente quanto a primeira.

Apesar de praticamente todas as moléculas de DNA presentes na reação serem marcadas com a utilização desse método, somente um nucleotídeo por molécula é marcado, portanto, a sonda resultante tem baixa atividade específica (BERKNER; FOLK, 1977). Esse é o método mais utilizado para marcação de oligonucleotídeos.

Neste capítulo, são apresentados protocolos para marcação por *random primer* de sondas radioativas, utilizadas regularmente quando a sequência-alvo está imobilizada em membrana (seção 2); e não radioativas (digoxigenina ou biotina), utilizadas em cromossomos fixados em lâmina histológica pela técnica FISH (seções 4 e 5). A marcação de oligonucleotídeos utilizando a T4 polinucleotídeo quinase, bastante utilizada para detecção de miRNAs em *Northern blot*, também é apresentada (seção 3). Um teste para detectar a incorporação

de nucleotídeos marcados e para estimativa da concentração da sonda por *dot blot* é descrito na seção 6.

2 Marcação radioativa de sondas por *random primer* para hibridização em membranas

2.1 Material

- $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP (3.000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$).



A manipulação de **material radioativo** deve ser realizada com luvas cirúrgicas, óculos de proteção, jaleco de manga comprida e sempre utilizando uma proteção de acrílico. Deve-se checar a limpeza das bancadas e do material utilizado com um contador Geiger e proceder à limpeza, com água e sabão, caso sejam detectadas eventuais contaminações.

- DTT 1 M (Apêndice 4).
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Fragmento Klenow da DNA polimerase I.
- HEPES 1 M, pH 6,6 (Apêndice 4).
- Lã de vidro.
- Microcentrífuga.
- Mistura de dNTPs: 500 μM de cada dNTP não marcado.
- MgCl_2 1 M (Apêndice 4).
- Mistura de hexanucleotídeos randômicos.

- Solução de albumina de soro bovino (BSA) acetilada (sem nucleases) 10 mg/mL.
- Solução de DNA-molde (1 ng/ μ L a 25 ng/ μ L).
- Resina Sephadex G-50 ou Bio-Gel P-60.
- Tampão M 5X (1 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	250 μ L	250 mM
MgCl ₂ 1 M	25 μ L	25 mM
DTT 1 M	10 μ L	10 mM
HEPES 1 M, pH 6,6	1 μ L	1 mM
Mistura de hexanucleotídeos randômicos	Variável	26 A ₂₆₀ /mL ⁽¹⁾
H ₂ O	q.s.p. 1 mL	

⁽¹⁾ Uma unidade de A₂₆₀ de oligonucleotídeos de fita simples é aproximadamente igual a 20 μ g/mL.

- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tubos de microcentrífuga de 0,5 mL.

2.2 Procedimento

1. Aquecer o DNA por 5 minutos a 100 °C para desnaturação. Resfriar rapidamente em gelo, por, pelo menos, 5 minutos.
2. Centrifugar rapidamente à velocidade máxima em uma microcentrífuga.

A centrifugação momentânea é para que as gotículas formadas na parede e na tampa do tubo durante o aquecimento se concentrem no fundo.

3. Preparar a reação em um tubo de microcentrífuga, adicionando os componentes na seguinte ordem:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão M 5X	10 μ L	1X
Mistura de dNTPs (500 μ M)	2 μ L	20 μ M de cada dNTP
DNA-molde desnaturado	25 ng	500 ng/mL
BSA 10 mg/mL	2 μ L	400 μ g/mL
[α^{32} P] dCTP	5 μ L (50 μ Ci)	1 μ Ci/ μ L
Klenow	5 U	100 U/mL
H ₂ O	q.s.p. 50 μ L	

4. Misturar os componentes cuidadosamente, quatro a cinco vezes, com o auxílio de uma micropipeta, e incubar a 37 °C por 1 hora ou à temperatura ambiente por 2 a 5 horas.
5. Interromper a reação, adicionando 2 μ L de EDTA 500 mM (concentração final 20 mM).

O EDTA é um agente quelante que “sequestra” o magnésio da reação, que age como cofator para a polimerase, interrompendo o processo de polimerização.

6. Para remoção de nucleotídeos não incorporados, preparar tubo de microcentrífuga de 0,5 mL para abrigar a coluna para filtração da sonda. Perfurar o fundo do

tubo com uma agulha e inserir um pouco de lã de vidro no fundo para vedar o orifício (Figura 2).

7. Encher o tubo de microcentrífuga com a resina previamente homogeneizada.
8. Colocar o tubo de 0,5 mL com resina dentro de um tubo de 1,5 mL (Figura 2) e centrifugar a 3.000 rpm por 1 minuto, em uma microcentrífuga, para empacotar a coluna. Descartar o líquido acumulado no fundo do tubo.
9. Adicionar 200 μ L de TE à coluna e centrifugar novamente, por 1 minuto, a 3.000 rpm. Descartar o líquido.
10. Transferir o tubo de 0,5 mL com a coluna para novo tubo de 1,5 mL.
11. Adicionar 50 μ L de TE à reação de marcação, homogeneizar e aplicar a amostra no centro da coluna.
12. Tampar o tubo e centrifugar a 3.000 rpm por 3 minutos.
13. Recolher o líquido no fundo do tubo (sonda) e descartar a coluna contendo os nucleotídeos não incorporados.



Tomar muito cuidado para que a centrífuga e a área de trabalho não fiquem contaminadas com **radioatividade**. Trabalhar atrás do anteparo protetor de acrílico.

A coluna deve ser descartada em depósito de lixo sólido de ^{32}P .

14. Aquecer a sonda a 100 °C por 4 minutos para desnaturação. Resfriar imediatamente em gelo por 4 minutos e utilizar diretamente na reação de hibridização

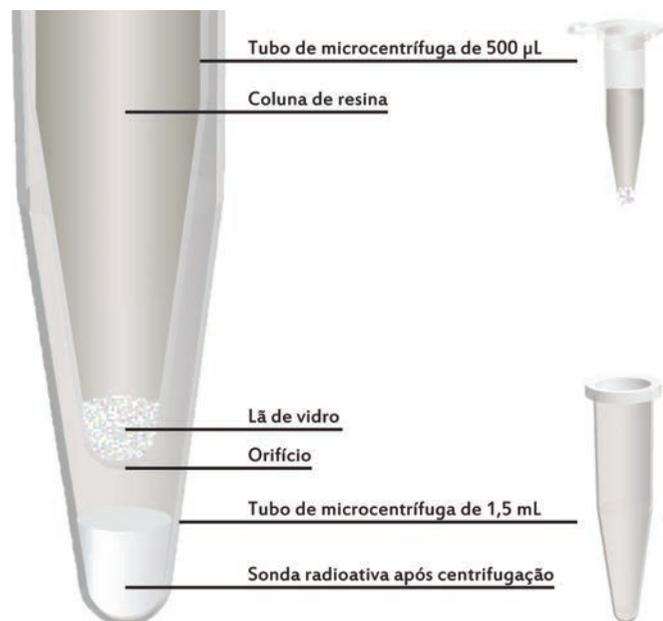


Figura 2. Coluna para separação de dNTPs não incorporados.

Fonte: Ribeiro (1998).

(Capítulos 12 e 14) ou armazenar a -20 °C para uso posterior.

A sonda marcada poderá ser utilizada em até 10 dias, sem perda evidente de sensibilidade.

2.3 Observações

Além de dCTP, outros nucleotídeos (dATP, dGTP ou dTTP) radioativos marcados com $[\alpha^{32}\text{P}]$ ou $[\alpha^{33}\text{P}]$ podem ser utilizados para a síntese de sondas.

Consultar as instruções do fabricante para estabelecer as quantidades de isótopos a serem utilizadas e as condições para a reação. Descartar corretamente o lixo sólido e líquido em recipientes para ^{32}P ou ^{33}P .

A técnica de *random primer* para marcação da sonda é um método muito eficiente e, geralmente, não há necessidade de separação dos nucleotídeos radioativos não incorporados. Entretanto, se a incorporação for baixa (menor que 50%), pode haver uma alta taxa de hibridização não específica (*background*) nas reações. Portanto, recomenda-se a remoção dos nucleotídeos radioativos não incorporados por filtração em gel, como descrito nas etapas de 6 a 13 deste item.

Kits comerciais fabricados por diversas empresas para marcação de sondas pelo método *random primer* estão disponíveis, assim como minicolunas pré-empacotadas para filtração da sonda.

3 Marcação radioativa de oligonucleotídeos por T4 polinucleotídeo quinase para hibridização em membranas

3.1 Material

- Enzima T4 polinucleotídeo quinase (T4PNK).

- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$; 3.000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$.



A manipulação de **material radioativo** deve ser realizada com luvas cirúrgicas, óculos de proteção, jaleco de manga comprida e sempre utilizando uma proteção de acrílico. Deve-se checar a limpeza das bancadas e do material utilizado com um contador Geiger e proceder à limpeza, com água e sabão, caso sejam detectadas eventuais contaminações.

- Oligonucleotídeo (5 μM).
- Resina Sephadex G-25 ou Bio-Gel P-6.
- Tampão da enzima T4 polinucleotídeo quinase (10X).

3.2 Procedimento

1. Preparar a reação em um tubo de microcentrífuga, misturando cuidadosamente os componentes com o auxílio de uma micropipeta, e incubar a 37 °C por 1 hora.

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão T4PNK 10X	2 μL	1X
Oligonucleotídeo (5 μM)	1 μL	0,25 μM
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ ATP}$	2,5 μL (25 μCi)	1,25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$
T4 PNK	5 U	250 U/mL
H ₂ O	q.s.p. 20 μL	

2. Adicionar 50 μL de água deionizada estéril à mistura e proceder à remoção dos nucleotídeos não incorporados, utilizando colunas de Resina Sephadex G-25 ou Bio-Gel P-6 como descrito no item 2.2 Procedimento, etapas 6 a 13.

3. Não é necessário aquecer e resfriar a sonda. Utilizar diretamente na reação de hibridização (Capítulos 14 e 15) ou armazenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

A remoção dos nucleotídeos não incorporados é altamente aconselhável para evitar hibridizações não específicas (*background*). A sonda marcada poderá ser utilizada em até 10 dias, sem perda significativa de sensibilidade.

3.3 Observação

Minicolunas previamente empacotadas de Resina Sephadex G-25 ou Bio-Gel P-6 para filtração da sonda podem ser adquiridas de diversas companhias.

4 Marcação com digoxigenina de sondas por *random primer* para FISH

4.1 Material

- β -mercaptoetanol 14,3 M.
- Disruptor de DNA ou sonicador.
- Digoxigenina 11-dUTP 1mM.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Exo-Klenow (40 U/ μL).
- Gel de agarose 1% (Apêndice 4).

- Incubadora ou banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.
- MgCl_2 1 M (Apêndice 4).
- Microcentrífuga.
- Mistura de dNTPs não marcados, contendo dTTP 2,5 mM, dCTP 2,5 mM, dATP 2,5 mM, dGTP 2,5 mM em Tris HCL 1 M e EDTA 0,1 mM, pH 8,0.

A mistura é adquirida pronta do fabricante dentro do kit de marcação. A solução-estoque para uso diário pode ser preparada em volumes de 800 μL divididos em tubos de microcentrífuga.

- Octâmeros randômicos 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Solução de DNA-molde (250 ng/ μL a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), purificado e diluído em água bidestilada estéril.
- Solução de iniciadores randômicos 2,5X.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Tris-HCL1M, pH 6,8 (Apêndice 4).

4.2 Procedimento

1. Para fragmentar o DNA, colocar 250-1.000 ng de DNA-molde, na concentração de 25-100 ng/ μL , no tubo de microcentrífuga, completando o volume para 120 μL com água bidestilada estéril, se necessário. Misturar imediatamente e manter o tubo no gelo.
2. Resfriar a cuba com água do sonicador, ajustar o tempo (entre 5 e 10 minutos) e intensidade para

fragmentação média e proceder à fragmentação por ultrassom.



Deve-se utilizar proteção para ouvidos, pois o som emitido pelo sonicador pode causar mal-estar ao usuário.

O tempo necessário de fragmentação deve ser testado experimentalmente, sugerindo-se tempos entre 5 e 10 minutos.

3. Avaliar a uniformidade do tamanho dos fragmentos em gel de agarose 1% utilizando 1 μ L a 2 μ L da solução de DNA fragmentado.

O DNA fragmentado deve formar, no gel de agarose, uma banda larga, com 800 pb de tamanho. Caso o tamanho exceda 800 pb, pode-se sonicar o DNA por mais tempo (2 a 3 minutos).

4. Colocar 23 μ L do DNA-molde fragmentado em um tubo de microcentrífuga e adicionar 20 μ L da solução de oligonucleotídeos randômicos 2,5X. Incubar a 95 °C por 5 minutos e resfriar imediatamente em gelo por 5 minutos.
5. Manter o tubo no gelo e adicionar 4 μ L da mistura de dNTPs não marcados, 2 μ L de digoxigenina 11-dUTP e 1 μ L de Exo-Klenow. Misturar cuidadosamente com auxílio da micropipeta, centrifugar durante 10 segundos a 3.000 rpm e incubar por 1 hora a 37 °C.
6. Adicionar 5 μ L de EDTA, misturar bem e colocar o tubo no gelo.
7. Proceder à remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando minicolunas previamente empacota-

das, como descrito no item 2.2. Procedimento, etapas 6 a 13, ou por precipitação etanólica (Capítulo 2).

8. Utilizar diretamente na reação de hibridização por FISH (Capítulo 13) ou armazenar a -20 °C para uso posterior.

4.3 Observações

Autoclavagem ou digestão com enzimas podem ser utilizados para fragmentação de DNA, entretanto, o ultrassom é o método mais recomendado, pois gera fragmentos com tamanhos mais uniformes, além de não adicionar enzimas nem sais à solução. Após 6 a 8 minutos em intensidade média no sonicador, por exemplo, 25 ng de DNA-molde com aproximadamente 1.100 pb de tamanho, diluído em 120 μ L de água, geram fragmentos entre 800 pb e 400 pb. Entretanto, dependendo do equipamento e das características do DNA, um tempo mais longo pode ser necessário.

Para FISH, o método *random primer* é adequado para marcar sondas de DNA a partir de fragmentos-molde mais curtos (<10.000 pb) e em quantidade limitada (< 200 ng/ μ L). A fragmentação do DNA torna-se necessária quando o DNA-molde tem mais que 1.000 pb.

Para marcar sondas com digoxigenina para FISH, também se pode utilizar o método *nick translation*, bastante conveniente quando se deseja marcar DNA genômico total ou insertos longos de DNA (> 10.000 pb). Nesse

caso, não há obrigatoriedade de fragmentar o DNA, mas necessita-se de 1 µg de DNA-molde.

Para marcar sondas de DNA com digoxigenina para FISH, apesar de ser possível adquirir os componentes separadamente, sugere-se o uso de kits comerciais.

5 Marcação com biotina de sondas por *random primer* para FISH

5.1 Material

- 14-dCTP-biotina 100 mM.
- Disruptor de DNA ou sonicador.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Fragmento Klenow da DNA polimerase I (40 U/µL).
- Incubadora ou banho-maria a 37 °C e 95 °C, respectivamente.
- MgCl₂ 1 M.
- Microcentrífuga.
- Mistura de dNTPs não marcados 4 mM, contendo: dTTP 1 mM, dCTP 1 mM, dATP 1 mM, dGTP 1 mM em Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

A mistura é adquirida pronta do fabricante, dentro do kit de marcação de RNA. Esta solução-estoque deve ser mantida a -20 °C. A solução

estoque para uso diário pode ser preparada em volumes de 800 µL divididos em tubos de microcentrífuga.

- Solução de oligonucleotídeos randômicos 2,5X (item 4.1. Material).
- Solução de DNA-molde (250 ng/µL a 1 µg/µL), purificado e diluído em água bidestilada estéril.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

5.2 Procedimento

1. Colocar 23 µL do DNA-molde fragmentado (item 4.2 Procedimento, etapas 1 a 3) em tubo de microcentrífuga e adicionar 20 µL da solução de iniciadores randômicos. Incubar por 5 minutos a 95 °C e resfriar imediatamente em gelo por 5 minutos.
2. Manter o tubo no gelo e adicionar 5 µL da mistura de dNTPs e 14-dCTP-biotina e 1 µL de Klenow. Misturar cuidadosamente com auxílio da micropipeta e centrifugar rapidamente. Incubar a 37 °C por 1 hora.
3. Adicionar 5 µL de EDTA para parar a reação, misturar bem e colocar o tubo no gelo.
4. Proceder à remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando minicolunas previamente empacotadas, como descrito no item 2.2 Procedimento (etapas 6 a 13), ou por precipitação etanólica (Capítulo 2).
5. Utilizar diretamente na reação de hibridização por FISH (Capítulo 13) ou armazenar a -20 °C para uso posterior.

5.3 Observação

Para marcar sondas de DNA com biotina para FISH, podem-se adquirir os componentes separadamente. Entretanto, assim como para marcação com digoxigenina, sugere-se o uso de kits comerciais, que podem ser utilizados com uma menor quantidade de DNA (até 10 ng), mas o DNA precisa estar fragmentado (recomendável que esteja entre 100 pb e 1.000 pb). Também para marcação de sonda com biotina, pode-se usar o método de *nick translation*, no qual o DNA não precisa estar fragmentado (≥ 10.000 pb), mas é necessário 1 μ g de DNA-molde para síntese da sonda.

6 Teste de incorporação e estimativa da concentração da sonda por *dot blot*

6.1 Material

- Anticorpo antidigoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (quando a marcação da sonda for com digoxigenina, seção 4) e/ou estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (quando a marcação da sonda for com biotina, seção 5).
- Filme plástico de PVC.
- Incubadora ou banho-maria a 60 °C com agitação.
- Membrana de náilon.
- MgCl₂ 1 M (Apêndice 4).
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Papel de filtro.
- Pinça plástica.
- Placa de Petri de poliestireno ou de vidro com 55 mm de diâmetro ou menor.
- Reagente de bloqueio.
- Solução de detecção: diluir a estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina no Tampão 1, na proporção 1:500, e/ou diluir o anticorpo antidigoxigenina conjugado com fosfatase alcalina em tampão 1 na proporção 1:1000.

Os dois reagentes de detecção (antidigoxigenina e estreptavidina conjugados com fosfatase alcalina) podem ser usados simultaneamente, caso se queira testar sondas com biotina e digoxigenina na mesma membrana.

- Solução de NBT/BCIP: diluir 35 μ L de NBT/BCIP em 5 mL de tampão 3.

A detecção da fosfatase alcalina conjugada com anticorpo ou estreptavidina é feita pelo substrato colorimétrico NBT/BCIP - azul nitro de tetrazólio/fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil. O NBT/BCIP pode vir em forma de pastilha ou líquida dissolvida em 10 mL de água.

- Tampão 1:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M	10 mL	100 mM
NaCl 5 M	0,3 mL	15 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tampão 2: dissolver 0,05 g do reagente de bloqueio em 10 mL de tampão 1, concentração final 0,5% (p/v), aquecendo a solução a 60 °C por 1 hora.

Pode-se armazenar o tampão 2 por até 3 a 4 meses, a 16 °C.

- Tampão 3:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M	10 mL	100 mM
NaCl 5 M	2 mL	100 mM
MgCl ₂ 1 M	5 mL	50 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Apêndice 4).

6.2 Procedimento

1. Cortar uma membrana de náilon medindo 3,0 cm x 2,0 cm, imergir na placa de Petri contendo 3 mL de tampão 1 e incubar por 5 minutos. Remover a membrana da placa e secar entre papéis de filtro.

Utilizar pinça plástica para manuseio da membrana.

2. Aplicar 0,5 µL de cada sonda com suas diluições (1:10, 1:100, 1:1000) com uma micropipeta sobre a membrana e aguardar o DNA ser adsorvido pela membrana (5 a 10 minutos).

Deve-se aplicar também um controle positivo (marcado com digoxigenina ou biotina) com concentração conhecida para estimar a concentração das diluições da sonda.

Podem-se incluir, na mesma membrana, sondas com digoxigenina e biotina, pois a detecção pode ser simultânea.

Identificar as posições de cada sonda utilizando lápis.

3. Colocar novamente 5 mL de tampão 1 na placa de Petri e imergir a membrana por 1 minuto. Descartar o tampão 1, adicionar 5 mL de tampão 2 e incubar por 30 minutos com agitação leve.
4. Descartar o tampão 2 e distribuir 500 µL da solução contendo anticorpo antidigoxigenina conjugada com fosfatase alcalina e/ou estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina sobre a membrana. Cobrir com um pedaço de filme plástico estéril e incubar por 30 minutos a 37 °C, com agitação leve.

Se o teste *dot blot* incluiu sondas com digoxigenina e biotina, utilizar uma mistura 1:1(v/v) dos reagentes de detecção (anticorpo antidigoxigenina para sondas com digoxigenina e estreptavidina para sondas com biotina).

5. Remover cuidadosamente o plástico, adicionar 5 mL de tampão 1 à placa e incubar por 10 minutos, à temperatura ambiente. Trocar por 5 mL de tampão 3 e incubar por 5 minutos, à temperatura ambiente.
6. Remover o tampão 3, aplicar 5 mL de solução de NBT/BCIP sobre a membrana e incubar no escuro (com papel alumínio em volta da placa de Petri) por 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente.
7. Lavar a membrana com água corrente e deixar secar.

8. Estimar a concentração das sondas com nucleotídeos marcados incorporadas, comparando a intensidade da marca marrom da sonda com aquela do DNA-controle. Sondas marcadas devem gerar pontos marrons arroxeados na membrana.

6.3 Observações

É altamente recomendável verificar por *dot blot* se os nucleotídeos marcados foram incorporados na sonda antes de proceder à hibridização por FISH (Capítulo 13). Pode-se fazer uma série de diluições da sonda na membrana (por exemplo, 1:10, 1:100) para se estimar a concentração da sonda, juntamente com um DNA-controle (com concentração já determinada).

Além de estreptavidina, pode-se usar avidina ou neutravidina conjugada com fosfatase alcalina para detecção em membrana de sondas marcadas com biotina.

Anticorpo antidigoxigenina conjugado com fosfatase alcalina pode ser adquirido comercialmente, como também a estreptavidina ou avidina conjugada com fosfatase alcalina; membrana de náilon; filme plástico de PVC, e reagente de bloqueio.

7 Referências

ACCOTTO, G. P.; VAIRA, A. M.; NORIS, E.; VECCHIATI, M. Using non-radioactive probes on plants: a few examples. **Journal of**

Bioluminescence and Chemiluminescence, Chichester, v. 13, n. 5, p. 295-301, 1998.

BERKNER, K. L.; FOLK, W. R. Polynucleotide kinase exchange reaction: quantitative assay for restriction nuclease-generated 5 γ -phosphoryl termini DNAs. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, p. 3176-3183, 1977.

BRAY-WARD, P. FISH probes and labeling techniques. In: BEATTY, B.; MAI, S.; SQUIRE, J. (Ed.). **FISH: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 5-28. (Practical Approach Series, n. 260).

CHACONAS, G.; SANDE, J. H. van de. 5 γ -³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. **Methods in Enzymology**, New York, v. 65, n. 1, p. 75-85, 1980.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 132, n. 1, p. 6-13, 1983.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 137, n. 1, p. 266-267, 1984.

RIBEIRO, S. G. Preparação de sonda. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 191-202.

RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 113, n. 1, p. 237-251, 1977.

SABELLI, P. A.; SHEWRY, P. R. Northern analysis and nucleic acid probes. In: JONES, H. (Ed.). **Plant gene transfer and expression protocols**. Totowa: Humana Press, 1995. p. 213-229. (Methods in Molecular Biology, v. 49).

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. **Practical in situ hybridization**. New York: Springer-Verlag, 2000. 203 p.

Capítulo 12

Análise da integração
de transgenes pela
técnica de *Southern blot*

Eduardo Romano
Giovanni Rodrigues Vianna

1 Introdução

A técnica de *Southern blot* permite detectar fragmentos de DNA específicos em amostras de DNA de composição complexa como DNAs genômicos. Essa técnica baseia-se na hibridização de sequências complementares específicas e foi concebida por Edwin M. Southern em 1975 (SOUTHERN, 1975), e ainda é utilizada sem alterações essenciais desde sua primeira descrição (SOUTHERN, 2006).

Entre suas diversas aplicações, a técnica de *Southern blot* permite detectar sequências de DNAs exógenos que tenham sido integradas no genoma vegetal por qualquer sistema de transformação genética. O procedimento consiste, basicamente, das seguintes etapas: a) o DNA da planta geneticamente modificada é extraído e digerido com uma ou mais enzimas de restrição; b) os produtos obtidos pela digestão do DNA são separados de acordo com o tamanho desses fragmentos, utilizando a eletroforese em gel de agarose; c) o DNA, ainda no gel, é desnaturado e transferido para uma membrana de náilon ou nitrocelulose; d) o DNA é fixado à membrana por luz ultravioleta ou por alta temperatura (80 °C), dependendo do tipo de membrana utilizada; e) o DNA é hibridizado contra uma sonda de DNA ou RNA que possui homologia com a sequência de interesse; f) os fragmentos homólogos à sonda são visualizados por autorradiografia ou autofluorescência, dependendo do tipo de sonda e da forma de detecção utilizados.

A importância da técnica de *Southern blot* em experimentos de transformação genética de plantas reside no fato de ela ser considerada uma prova molecular da integração de genes exógenos no genoma vegetal. A técnica da reação da polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction* – PCR) (Capítulo 10) também pode ser utilizada para tal fim. No entanto, sua confiabilidade é menor em razão, principalmente, da sua alta sensibilidade, o que pode levar a falsos positivos por possibilitar a amplificação de quantidades mínimas de DNAs contaminantes contendo o gene analisado. Outra vantagem da técnica de *Southern blot* em relação à PCR é que os iniciadores (*primers*) utilizados na PCR normalmente amplificam regiões internas do transgene. Isso dificulta ainda mais a diferenciação entre o DNA exógeno integrado e potenciais contaminantes, pois ambos resultam na amplificação de fragmentos de tamanhos idênticos. Além disso, a técnica da PCR, quando utiliza iniciadores que amplificam uma região interna do DNA exógeno, pode ser utilizada somente para detectar a presença ou ausência do transgene, mas não permite determinar o número de cópias inseridas no genoma vegetal. No entanto, a técnica de *Southern blot*, dependendo das enzimas e da sonda utilizadas na análise, pode, além de prover evidência molecular da integração de uma sequência específica, estimar o número de cópias do transgene que foi introduzido no genoma vegetal. Mais recentemente, tem-se também utilizado, eficientemente, a técnica da PCR em tempo real (Capítulo 15) na determinação do número de cópias

do transgene integradas no genoma vegetal, visando à caracterização de plantas geneticamente modificadas. Isso é feito pela comparação do genoma vegetal com um gene endógeno que tenha um número de cópias no genoma previamente conhecido (OMAR et al., 2008; SHEPHERD et al., 2009).

Digestão do DNA total

Algumas considerações são importantes para que ocorra a digestão completa do DNA a ser aplicado no gel.

A quantidade de DNA a ser digerida está diretamente relacionada com o tamanho do genoma, isto é, quanto menor o genoma, menos DNA é necessário (SABELLI; SHEWRY, 1995). Por exemplo, para *Arabidopsis thaliana* (genoma haploide = $1,45 \times 10^8$ pb), 5 µg de DNA total podem ser suficientes para a detecção de pelo menos uma cópia do transgene, enquanto em genomas maiores, como o de batata (*Solanum tuberosum*) (genoma haploide = $1,8 \times 10^9$ pb), a quantidade deve ser de, pelo menos, 10 µg. O uso de quantidades maiores de DNA facilita a detecção de cópias únicas e, portanto, para plantas com genomas maiores que o da batata, devem-se usar de 15 µg a 30 µg. Entretanto, quanto maior a quantidade de DNA, mais ineficiente é a digestão. Em geral, para a maioria das espécies vegetais, têm-se utilizado quantidades de 5 µg a 15 µg de DNA total para a obtenção de resultados satisfatórios.

A quantidade de enzima de restrição a ser utilizada deve ser entre 10 U/µg e 15 U/µg de DNA. Nunca devem ser adicionados mais do que 10% de volume da enzima de restrição em relação ao volume total de reação de digestão. Isso se deve ao fato de as enzimas de restrição comerciais frequentemente conterem 50% de glicerol. Concentrações de glicerol acima de 5% (v/v) em reações de restrição podem afetar a especificidade de reconhecimento das enzimas pelos seus sítios de restrição (atividade de estrela) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O volume final de reação pode ser variável. Se possível, a digestão deve ser realizada em um volume que caiba no poço do gel de agarose (~50 µL). No entanto, frequentemente é necessário que a reação ocorra em volumes maiores (100 µL a 500 µL). Esse é um artifício que permite diluir contaminantes provenientes da extração de DNA que podem interferir com a ação da enzima de restrição. No caso de reações em grandes volumes, o DNA deve ser precipitado após a reação utilizando-se etanol absoluto (item 2.2 Procedimento), e dissolvido em um volume menor, compatível com a capacidade do poço do gel de agarose.

A homogeneidade do DNA na reação é um fator importante para uma ação eficaz das enzimas de restrição. A formação de aglomerados de DNA impede o acesso das enzimas de restrição aos seus respectivos sítios de clivagem. Isso é especialmente importante quando as preparações do DNA estão contaminadas com polissacarídeos.

Pré-hibridização e hibridização

As sondas utilizadas para hibridização na técnica de *Southern blot* podem ser marcadas com radioisótopos (^{32}P , ^{33}P , ^3H e ^{35}S), fluorocromos (rodamina ou fluoresceína) ou com substratos quimioluminescentes (digoxigenina e biotina). As sondas não radioativas são mais seguras para o usuário; no entanto, são menos sensíveis que as sondas radioativas (Capítulo 11) e, por isso, são menos utilizadas para detecção de transgenes em plantas.

Uma pré-hibridização é realizada antes da hibridização, para impedir que a sonda se ligue inespecificamente à membrana. Ambas as etapas podem ser realizadas em garrafas próprias para tal fim, em sacos de hibridização ou em vasilhas rasas. É importante garantir que haja tampão de hibridização suficiente para manter a membrana sempre imersa.

As temperaturas de hibridização variam de acordo com a solução utilizada e, normalmente, utiliza-se 65 °C com a solução descrita por este manual. Em formamida 50%, a temperatura deve ser 42 °C. Quando se utiliza uma solução oriunda de um kit comercial, deve-se utilizar a temperatura recomendada pelo fabricante. Vários tipos de reagentes podem ser utilizados para bloquear a ligação inespecífica da sonda à superfície da membrana, e a solução de Denhardt (DENHARDT, 1966) tem sido mais frequentemente utilizada. DNAs heterólogos, como DNA

de esperma de salmão, também são utilizados como agentes de bloqueio.

Quanto maior a concentração da sonda, maior será a cinética de hibridização; no entanto, altas concentrações de sonda podem resultar em hibridizações inespecíficas. É aconselhável que a concentração da sonda fique entre 1 ng/mL e 5 ng/mL de solução de hibridização. Por vezes, sulfato de dextrano ou polietilenoglicol (PEG) são incluídos na solução de hibridização, a uma concentração de 10% (p/v). Tal procedimento acelera a cinética de hibridização, já que os ácidos nucleicos são excluídos do volume de solução ocupado por esses polímeros, o que faz com que a concentração efetiva da sonda aumente.

Após a hibridização, são realizadas lavagens para remoção de moléculas de sondas ligadas inespecificamente à membrana e ao DNA. A concentração de sal da solução de lavagem é menor a cada lavagem, enquanto a temperatura é maior, o que faz com que a estringência de lavagem aumente, progressivamente. Quanto maior a homologia da sequência alvo com a sonda, maior deve ser a estringência da lavagem (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Neste capítulo, serão descritas as etapas necessárias para a análise da integração do DNA exógeno no genoma de plantas transgênicas pela técnica de *Southern blot*.

2 Digestão do DNA total e separação em gel de agarose

2.1 Material

- Acetato de sódio 3 M, pH 5,2 (Apêndice 4).
- Brometo de etídio 1% (p/v) (Apêndice 4).



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Cuba e fonte de eletroforese.
- DNA extraído da planta a ser analisada (Capítulo 9).
- Enzima de restrição e tampão específico de reação 10X (comerciais).
- Etanol absoluto.
- Etanol 70% (v/v).
- Gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio em tampão TAE ou TBE 1X (Apêndice 4).
- Sistema de fotodocumentação com lâmpada ultravioleta (UV) para gel de eletroforese.



A exposição à **radiação ultravioleta** pode causar danos à retina e à pele. Sua manipulação deve ser feita com óculos de proteção específicos para luz UV. Procurar não expor a pele, usando jaleco de mangas longas e luvas.

- Tampão de amostra para eletroforese 10X (Apêndice 4).

- Tampão TE, pH 8,0 (Apêndice 4).
- Tampão TBE ou TAE 1X (Apêndice 4).

2.2 Procedimento

1. Preparar a reação segundo a tabela abaixo e incubar a 37 °C, por 4 a 16 horas.

Componente	Quantidade
DNA	x µL (10 µg)
Tampão de reação 10X	5 µL
Enzima de restrição	5 µL (20 U/µL)
H ₂ O	q.s.p. 50 µL

Se o volume de reação for maior do que a capacidade do poço do gel, aumentar proporcionalmente a quantidade dos componentes da tabela acima e, ao término da reação, precipitar o DNA da seguinte forma: adicionar 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto. Homogeneizar cuidadosamente e deixar por, pelo menos, 2 horas a -20 °C. Centrifugar em microcentrífuga à velocidade máxima (12.000 rpm a 14.000 rpm) durante 30 minutos. Lavar o precipitado com etanol 70% (v/v). Secar o precipitado e dissolver em um volume menor de TE de acordo com o volume do poço do gel (aproximadamente 50 µL).

2. Adicionar 5 µL de tampão de amostra 10X ao DNA, homogeneizar e aplicar a amostra em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio.

É conveniente analisar uma alíquota da reação de digestão por eletroforese em um minigel de agarose para verificar se houve a digestão total antes de parar a reação. Caso não tenha ocorrido a digestão total, adicionar mais enzima de restrição e incubar a reação por mais tempo.

- Fazer migrar, vagorosamente, as amostras por eletroforese em gel de agarose utilizando de 1 V/cm a 3 V/cm (distância entre os polos), o que leva entre 6 e 20 horas dependendo do tamanho do gel.

É necessário que um marcador de DNA de peso molecular conhecido seja aplicado no gel. Controles importantes incluem: plasmídeo contendo o gene a ser identificado (controle positivo) e DNA de uma planta não transformada (controle negativo), digerido com a mesma enzima usada nas alíquotas das plantas potencialmente transgênicas.

- Após a eletroforese, fotografar o gel sob luz ultravioleta com uma régua graduada fluorescente ao lado do marcador de DNA de peso molecular conhecido (com o zero na altura dos poços) (Figura 1).

2.3 Observações

Em vez de adicionar toda a enzima de restrição de uma só vez no início da reação de digestão, é recomendável que o volume total da enzima seja adicionado em alíquotas distribuídas ao longo de todo o período de digestão.

A maior parte das reações de digestão com enzimas de restrição é realizada a 37 °C; no entanto, algumas enzimas apresentam temperaturas ótimas diferentes (por exemplo, *SmaI*, 25 °C; *BclI*, 50 °C) e, portanto, a temperatura de reação de digestão deve ser verificada nas instruções do fabricante.

Muitas vezes faz-se necessário utilizar mais de uma enzima de restrição na análise do DNA e, nesse caso, deve-se optar por enzimas que tenham tampões compatíveis

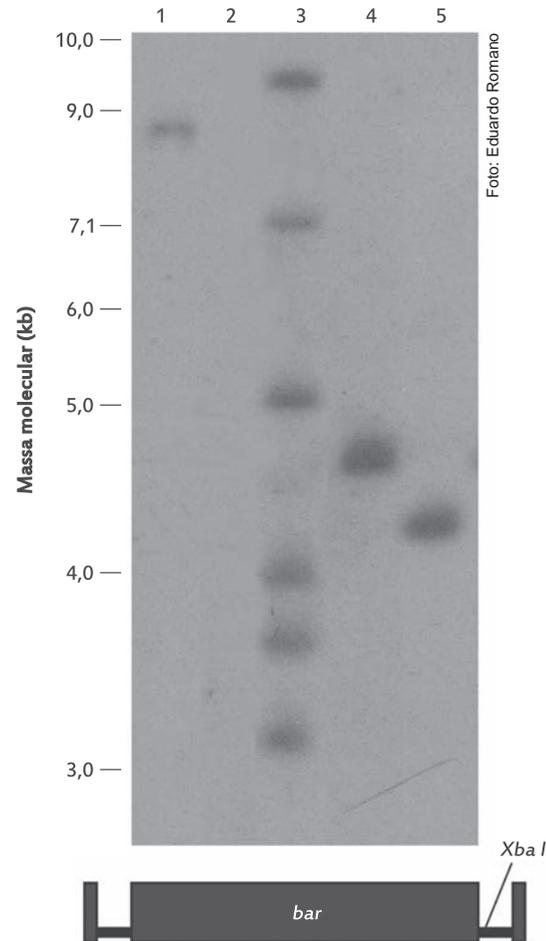


Figura 1. Autorradiografia obtida pela técnica *Southern blot* para determinação do número de cópias de T-DNA em plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*). DNA total das plantas foi digerido com *XbaI*, e a sonda utilizada foi preparada com um fragmento do gene *bar* demonstrado no T-DNA abaixo da autorradiografia: 1) controle positivo; 2) planta não transgênica; 3) planta com seis cópias de T-DNA; 4) planta com uma cópia de T-DNA; 5) planta com uma cópia de T-DNA.

de uso. Algumas enzimas apresentam atividade ótima em tampões com alta concentração de sais, o que pode inibir completamente a atividade de outras enzimas.

3 Transferência e fixação do DNA à membrana

3.1 Material

- Agitador do tipo plataforma orbital com controle de velocidade.
- Filme plástico do tipo PVC.
- Folhas de papel-toalha.
- HCl 0,25 N (Apêndice 4).
- Membrana de náilon.
- NaOH 10 N (Apêndice 4).
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Papel de filtro.
- Solução de desnaturação:

Componente	Quantidade	Concentração final
NaOH 10 N	25 mL	0,5 N
NaCl 5 M	150 mL	1,5 M
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	

- Solução de neutralização:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 7,2	250 mL	0,5 M
NaCl 5 M	150 mL	1,5 M
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	

- SSC 20X ou SSPE 20X (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1 M, pH 7,2 (Apêndice 4).

3.2 Procedimento

A organização do sistema de transferência de DNA para membrana por capilaridade encontra-se esquematizada na Figura 2.

1. Após a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese, transferir o gel de agarose para um reservatório de plástico ou vidro. Sob luz ultravioleta, cortar e retirar, com o auxílio de uma lâmina de bisturi e uma régua, as partes do gel que não foram usadas.

Manipular o gel cuidadosamente sobre um suporte (por exemplo, uma placa de vidro) para evitar que ele se quebre.



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

2. Incubar o gel em HCl 0,25 N com agitação suave, por 10 minutos, para que ocorra a hidrólise das bases purinas e lavar, rapidamente, com água destilada. Esta etapa só é necessária se os fragmentos de DNA a

serem identificados possuírem mais que 10 Kb; caso contrário, passar para a etapa 3.

Nesta etapa, o DNA é parcialmente hidrolisado, por depurinação (hidrólise das bases purinas), o que facilita a transferência dos fragmentos maiores que 10 Kb para a membrana.

3. Incubar o gel em solução de desnaturação, com agitação suave, por 30 minutos.

Nesta etapa, o alto pH da solução de desnaturação faz com que as ligações de hidrogênio entre a dupla fita do DNA se rompam, deixando o DNA na forma de fita simples.

4. Lavar, rapidamente, o gel com água destilada e incubar em solução de neutralização, com agitação suave, por 30 minutos. Lavar o gel, rapidamente, com água destilada.

Nesta etapa, ocorre o restabelecimento do pH para próximo da neutralidade, mantendo as fitas de DNA desnaturadas.

5. Encher uma vasilha com SSC 20X. Fazer uma plataforma e cobri-la com uma ponte feita de três folhas de papel de filtro, embebidas em SSC 20X.
6. Colocar, cuidadosamente, o gel sobre a ponte. Retirar qualquer bolha de ar que fique entre o gel e o filtro. Colocar filme plástico do tipo PVC em volta do gel.

Podem-se usar pedaços de filmes de raios X em vez de plástico do tipo PVC. Esse procedimento impede que o tampão de transferência seja absorvido diretamente pelo papel-toalha que ficará acima do gel. Para uma transferência mais eficiente, o gel deve ser colocado invertido (com a abertura dos poços em contato com as folhas de papel filtro), já que no momento da aplicação das amostras no gel, o DNA assenta-se no fundo do poço, fazendo com que esteja mais próximo da parte inferior do gel, que ficará, assim, em contato com a membrana.

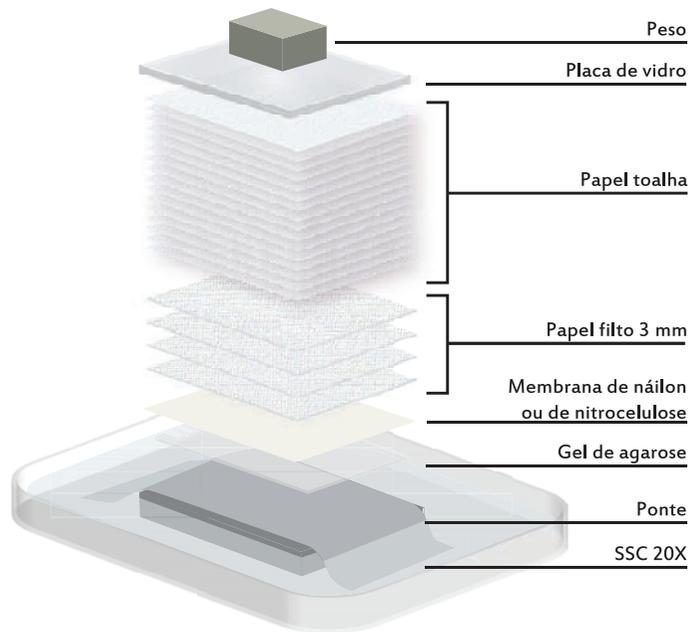


Figura 2. Esquema de transferência de DNA para membrana por capilaridade segundo a técnica de *Southern blot*.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

7. Cortar um pedaço da membrana de náilon exatamente do tamanho do gel, embeber em SSC 20X e colocar em cima do gel, retirando qualquer bolha de ar que fique entre o gel e a membrana. Fazer um corte na membrana (por exemplo, no canto esquerdo superior) para posterior orientação.

Sempre manusear a membrana com luvas para impedir a contaminação com DNAsés presentes na derme.

Se houver bolhas de ar entre a membrana e o gel, não haverá transferência de DNA nessa região.

8. Cortar três folhas de papel de filtro do tamanho do gel, embeber em SSC 20X e colocar em cima da membrana. Retirar qualquer bolha de ar que fique entre a membrana e os papéis de filtro.
9. Colocar uma camada de papel-toalha de, aproximadamente, 10 cm sobre as folhas de papel de filtro.
10. Colocar uma placa de vidro sobre a camada de papel-toalha e um peso de, aproximadamente, 1 kg sobre a placa de vidro. Deixar transferir por 12 a 16 horas à temperatura ambiente.
11. Após a transferência, desmontar o sistema cuidadosamente. Antes de remover o gel, marcar a posição dos poços na membrana utilizando um lápis.

Não utilizar canetas, pois podem manchar a membrana.

12. Retirar a membrana com o auxílio de uma pinça e lavar rápida e cuidadosamente com SSC 2X para remover qualquer resíduo de agarose possivelmente aderido à membrana.
13. Deixar a membrana secar por 1 hora à temperatura ambiente.
14. Proteger a membrana em um pedaço de papel de filtro. Fixar o DNA à membrana por incubação, a 80 °C, por 2 horas ou por exposição direta à luz ultravioleta.

O DNA também pode ser fixado à membrana por luz ultravioleta, com equipamentos chamados UV *crosslinker*. No entanto, a intensidade da luz (120.000 microjoules/cm²) e o tempo de exposição (25 a 50 segundos) devem ser ajustados e controlados para se obter uma fixação eficiente. A maioria dos aparelhos UV *crosslinker* são equipados com um fotodetector

interno que compensa o desgaste das lâmpadas com o aumento do tempo de exposição, quando utilizados no modo automático.

15. Proceder à hibridização.

3.3 Observações

O método de transferência aqui descrito é essencialmente semelhante ao descrito originalmente por Southern (1975). No entanto, outras formas de transferência já foram descritas, como o uso de tampões de transferência alcalinos (REED; MANN, 1985), pressão positiva ou negativa (OLSZEWSKA; JONES, 1988), eletrotransferência (ISHIHARA; SHIKITA, 1990; SMITH et al., 1984) e transferência por capilaridade para baixo (CHOMCZYNSKI, 1992; LICHTENSTEIN et al., 1990). Todos os métodos têm vantagens e desvantagens, e alguns podem ser mais rápidos que o método de transferência aqui descrito; no entanto, podem necessitar de equipamentos específicos e são aconselhados quando há necessidade de se analisarem muitas amostras.

Existem aparelhos que permitem a eletrotransferência semiseca de DNA, bem como de RNA e proteínas, de uma maneira rápida e eficiente, por meio da aplicação de uma voltagem no sentido transversal do gel, que faz com que o DNA migre em direção à membrana em poucos minutos. Para minigéis (até 70 cm²), a transferência ocorre durante 15 a 30 minutos a 10 V a 15 V. Para géis maiores, a transferência ocorre durante 30 a 60 minutos, a 15 V a 25 V.

Existem vários tipos de membranas disponíveis comercialmente e, para *Southern blot*, as membranas de

náilon são as mais utilizadas em detrimento das de nitrocelulose por serem menos quebradiças e por terem maior capacidade de retenção de DNA quando comparadas às de nitrocelulose. Entretanto, as membranas de nitrocelulose permitem a obtenção de resultados com menos ligações inespecíficas (*background*).

Após a fixação do DNA à membrana e sua secagem, esta pode ser armazenada envolvida em papel filtro e à temperatura ambiente para uso posterior.

4 Pré-hibridização e hibridização

4.1 Material

- Contador Geiger.
- Cassete com telas intensificadoras.
- Filme plástico do tipo PVC.
- Filme de raio X.
- Forno de hibridização com controle de temperatura e agitação.
- Papel de filtro.
- SDS 20% (p/v) (1 L) (Apêndice 4).
- SSC 20X (1 L) (Apêndice 4).
- Solução-estoque de DNA de esperma de salmão 10 mg/mL (Apêndice 4).

- Solução de Denhardt 50X (Apêndice 4).
- Solução de lavagem I:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	50 mL	2X
SDS 20%	2,5 mL	0,1%
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	

- Solução de lavagem II:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	25 mL	1X
SDS 20%	2,5 mL	0,1%
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	

- Solução de lavagem III:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	2,5 mL	0,1X
SDS 20%	2,5 mL	0,1%
H ₂ O	q.s.p. 500 mL	

- Solução de pré-hibridização:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	12,5 mL	5X
Solução Denhardt 50X	5,0 mL	5X
SDS 20%	1,25 mL	0,5%
DNA de esperma de salmão 10 mg/mL ⁽¹⁾	100 µL	20 µg/mL
H ₂ O	q.s.p. 50 mL	

⁽¹⁾ A solução de DNA de esperma de salmão deve ser adicionada por último. Antes da adição, ferver por 5 minutos, incubar imediatamente no gelo e, somente então, adicionar à solução de pré-hibridização imediatamente antes do uso.

- Sonda de DNA ou RNA marcada radioativamente (Capítulo 11).



A manipulação de **material radioactivo** deve ser realizada com luvas cirúrgicas, óculos de protecção, jaleco de manga comprida e sempre utilizando uma protecção de acrílico. Deve-se checar a limpeza das bancadas e do material utilizado com um contador Geiger e proceder à limpeza, com água e sabão, caso sejam detectadas eventuais contaminações.

4.2 Procedimento

1. Posicionar a membrana em um reservatório de plástico ou uma garrafa própria para hibridização. Colocar um volume pequeno de solução de pré-hibridização (20 mL/100 cm²) aquecida a 65 °C (temperatura na qual será realizada a hibridização). Incubar por, pelo menos, 2 horas em agitação suave em forno de hibridização a 65 °C.

O tempo de 2 horas geralmente é suficiente para uma pré-hibridização eficiente, mas pode-se estender por mais tempo, até 16 horas, sem prejuízo para o experimento.

2. Após a pré-hibridização, desnaturar a sonda marcada radioativamente (Capítulo 11) por aquecimento a 100 °C por 5 minutos, e colocá-la imediatamente no gelo.

No caso de sondas de RNA, essas já estão em fita simples. Portanto, o procedimento de desnaturação é desnecessário. A concentração de sonda é importante quando se procura detectar sequências não repetitivas em DNA total. Uma concentração de 1 ng/mL a 5 ng/mL é aconselhável. Mais do que 50 ng/mL poderão resultar em hibridizações inespecíficas.



ATENÇÃO! A partir desta etapa, tomar todos os cuidados necessários na manipulação de **material radioactivo**,

3. Adicionar a sonda desnaturada à solução de pré-hibridização. Incubar o sistema por 12 a 16 horas, sob agitação suave, em forno de hibridização a 65 °C.

A temperatura ótima de pré-hibridização e hibridização deve ser a mesma, sendo determinada empiricamente. Porém, a temperatura de 65 °C, com sondas com homologia próximas a 100%, permite bons resultados. Se as sequências do transgene em estudo possuírem menor homologia com a sonda utilizada, a temperatura de hibridização deverá ser mais baixa. Quanto menor a homologia entre a sonda e o transgene, menor deve ser a temperatura de hibridização. Porém, temperaturas de hibridização muito abaixo de 65 °C podem resultar em ligações inespecíficas.

4. Lavar a membrana duas vezes com solução de lavagem I, por 15 minutos, à temperatura ambiente.

As etapas 4, 5 e 6 são realizadas para remover moléculas de sonda que se ligaram inespecificamente ao DNA. Após cada lavagem, é recomendável que se monitore a membrana com um contador Geiger. As lavagens podem ser interrompidas em qualquer etapa, a partir do momento em que sejam encontrados sinais radioativos somente em pontos específicos da membrana, onde se espera que estejam as bandas correspondentes aos transgenes e aos controles positivos.

5. Lavar a membrana uma vez com solução de lavagem II, por 15 minutos, em agitação suave em forno de hibridização a 65 °C.
6. Lavar a membrana uma vez com solução de lavagem III, por 15 minutos, em agitação suave em forno de hibridização a 65 °C.

A última lavagem é de alta estrigência e deve ser omitida se a sequência do transgene em estudo não possuir homologia total com a sonda utilizada. Após essa lavagem, regiões da membrana sem DNA

não deverão apresentar sinal radioativo, enquanto regiões com homologia à sonda apresentarão sinal, normalmente, bastante fraco (de 2 a 5 contagens por segundo no contador Geiger). É possível que regiões com homologia não apresentem sinal detectável, o que não significa que a hibridização não tenha ocorrido.

7. Retirar o excesso de solução de lavagem III, e secar a membrana com papel de filtro. Expor a membrana ligeiramente úmida, envolvida com filme plástico do tipo PVC, a um filme de raios X em um cassete com telas intensificadoras a -80°C .

A montagem do cassete contendo a membrana envolta em filme plástico do tipo PVC e o filme de raio X deverá ser realizada em câmara completamente escura por causa da sensibilidade do filme de raio X à luz branca.

8. Após 1 a 7 dias de exposição, revelar a autorradiografia dentro de uma sala escura, utilizando as soluções reveladoras e fixadoras.

Se for necessário reutilizar a membrana, deve-se lavá-la 1 a 2 vezes com uma solução fervente de SDS 0,1% (p/v) até a retirada total do sinal radioativo.

4.3 Observações

A membrana deve ficar ligeiramente úmida para permitir que a sonda seja posteriormente removida e que a membrana possa ser, novamente, hibridizada contra outra sonda.

A exposição a -80°C com intensificador aumenta a intensidade do sinal. Isso ocorre porque, a baixas temperaturas, os intensificadores, quando recebem partículas β ,

emitem fótons e, assim, aumentam o sinal emitido pela sonda. No entanto, as bandas se tornam menos definidas, além de ser necessário um freezer a -80°C . No caso de exposição à temperatura ambiente, o uso das telas intensificadoras é dispensável; entretanto, a detecção do sinal é mais lenta, e o sinal, mais fraco.

Se, após a terceira lavagem, na provável localização do transgene na membrana, houver sinal detectável ao contador Geiger, uma exposição de 24 horas deve ser suficiente para visualização das bandas. No entanto, se esses locais não apresentarem sinal detectável, pode-se expor a membrana com dois filmes de raios X simultaneamente. Após 48 horas, revelar o filme mais externo; se não for possível visualizar as bandas positivas, manter o outro filme exposto até completar 7 dias.

Outra maneira de visualizar o resultado é expor a membrana marcada a uma placa de armazenamento de fósforo (*phosphor imaging plate*), sensível aos sinais radioativos emitidos pela sonda marcada. O sinal radioativo é revelado por digitalização em *scanner* a laser, normalmente após um período de 24 a 96 horas de exposição à temperatura ambiente, gerando uma imagem similar à de um filme de raios X. As placas de armazenamento de fósforo podem ser dessensibilizadas por exposição à luz visível durante 10 minutos e reutilizadas.

5 Determinação do número de cópias do transgene

A técnica de *Southern blot* pode ser utilizada não somente para comprovar a integração do DNA exógeno no genoma vegetal, mas também para estimar o seu número de cópias inseridas no genoma da planta de interesse. Com essa finalidade, o DNA da planta transgênica é digerido com uma ou mais enzimas de restrição, estrategicamente escolhidas, e um experimento de *Southern blot* é realizado, usando como sonda um fragmento do transgene (por exemplo, um fragmento do T-DNA, quando a transformação é realizada por *Agrobacterium spp.*).

A escolha da(s) enzima(s) de restrição utilizada(s) para digestão do DNA é um fator muito importante na estimativa do número de cópias. Serão exemplificadas nesse capítulo análises com plantas transformadas por *Agrobacterium spp.*, mas os mesmos procedimentos de digestão do DNA e de interpretação de resultados são válidos para qualquer outra metodologia de transformação genética de plantas. Duas possibilidades de digestão do DNA são sugeridas, levando a resultados e interpretações distintos.

5.1 Digestão do DNA da planta com uma enzima que corte duas vezes dentro do T-DNA

Neste caso, a digestão do DNA fornecerá um fragmento interno de tamanho conhecido (duas enzimas

distintas que gerem um fragmento interno também podem ser usadas). A sonda utilizada deverá ser obtida de um plasmídio que contenha o T-DNA que foi introduzido na provável planta transformada. Esse plasmídio deve ser digerido com enzima(s) que gere(m) um fragmento do T-DNA que seja exatamente o fragmento interno gerado pela digestão do DNA da planta (nesse caso, as mesmas enzimas serão utilizadas) ou por enzimas que gerem um fragmento menor, mas que fique compreendido entre os dois sítios de restrição que geraram o fragmento interno. Dessa forma, uma única banda no *Southern blot* é esperada como resultado da hibridização. Esse tipo de digestão leva a um resultado em que somente a presença (ou ausência) do transgene é comprovada, e seu número de cópias pode ser estimado pela intensidade do sinal das amostras em relação a um padrão conhecido (Figuras 3 e 4).

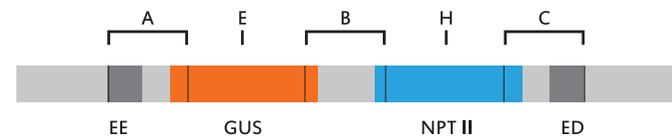


Figura 3. Representação esquemática de vetor binário hipotético, destacando-se os fragmentos que podem ser utilizados como sonda. A = sonda A; B = sonda B; C = sonda C; E = sítio de restrição de *EcoRI*; H = sítio de restrição de *HindIII*; EE = extremidade esquerda; ED = extremidade direita; GUS = gene que codifica para a enzima β -glucuronidase, sob controle do promotor e do terminador do 35SCaMV; NPT II = gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, sob o controle do promotor e do terminador do gene da nopalina sintase (*nos*).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

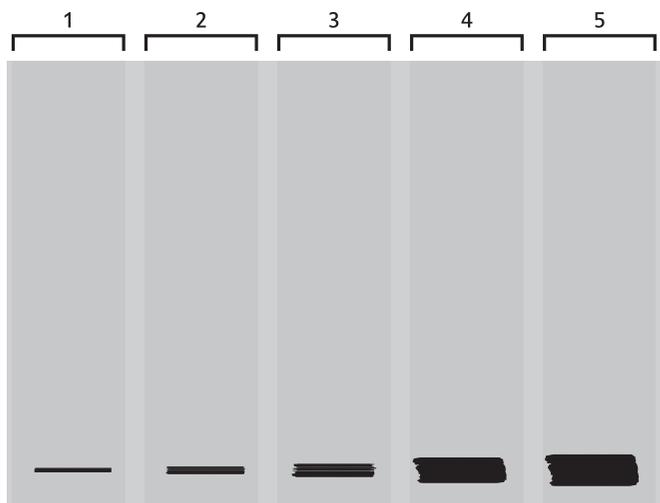


Figura 4. Análise do número de cópias do T-DNA inserido no genoma da planta de interesse por comparação da intensidade das bandas de referência e genômica utilizando a técnica de *Southern blot*. Todos os DNAs foram digeridos com *Hind*III e *Eco*RI e hibridizados contra sonda B (Figura 3). Linha 1: DNA plasmidial equivalente a uma cópia; linha 2: DNA de planta transgênica contendo uma cópia do T-DNA; linha 3: DNA de planta transgênica contendo três cópias do T-DNA; linha 4: DNA de planta transgênica contendo cinco cópias do T-DNA; linha 5: DNA plasmidial equivalente a cinco cópias. Observar que, independentemente do número de cópias de T-DNAs inserido, o resultado esperado é sempre um único fragmento do mesmo tamanho. Apenas a intensidade do sinal varia, sendo diretamente proporcional ao número de cópias de T-DNA.

Fonte: Romano (1998).

5.2 Digestão do DNA da planta com uma enzima que corte o T-DNA somente uma vez

Neste caso, a sonda utilizada deve ser um fragmento interno do T-DNA que esteja localizado fora do local de corte da enzima escolhida no DNA a ser analisado, do lado direito ou esquerdo do sítio de corte. Com tal procedimento, é esperado que exista uma relação direta entre o número de bandas obtidas após hibridização e o número de cópias do T-DNA (Figuras 3 e 5). É possível que uma banda contenha mais de uma cópia do T-DNA, o que deve ser determinado pela comparação da intensidade das bandas. Fragmentos de restrição contendo mais de uma cópia de T-DNA são frequentemente observados quando T-DNAs estão integrados de forma concatenada (em série) (Figuras 3, 6 e 7) (SABELLI; SHEWRY, 1995).

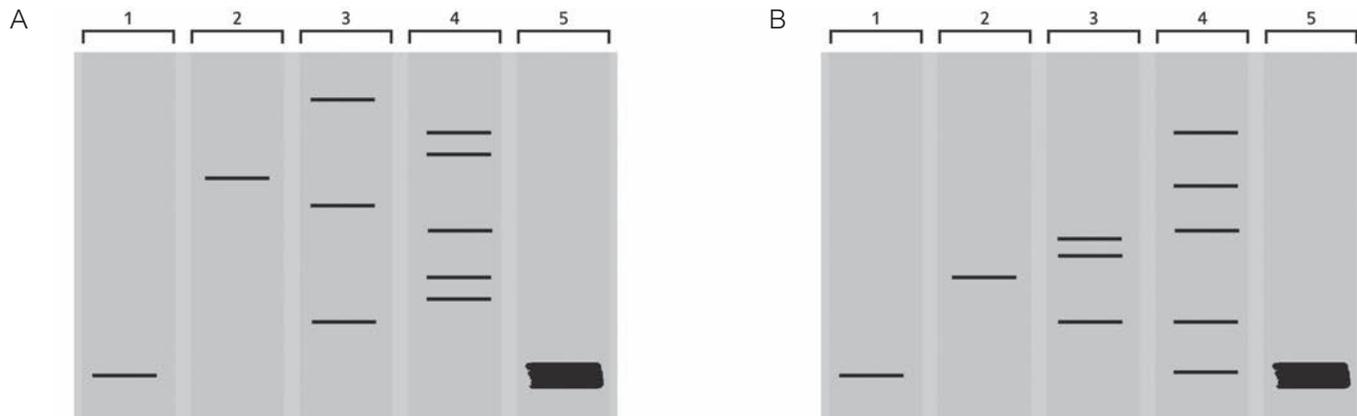


Figura 5. Análise do número de fragmentos do transgene inseridos no genoma da planta de interesse utilizando a técnica de *Southern blot*. Nesse caso, os T-DNAs foram integrados ao genoma vegetal em sítios distintos. A) Todos os DNAs foram digeridos com *EcoRI* e hibridizados contra sonda A (Figura 3); B) Todos os DNAs foram digeridos com *HindIII* e hibridizados contra sonda C (Figura 3). Linha 1: DNA plasmidial equivalente a uma cópia; linha 2: DNA de uma planta transgênica contendo uma cópia do T-DNA; linha 3: DNA de uma planta transgênica contendo três cópias do T-DNA; linha 4: DNA de uma planta transgênica contendo cinco cópias do T-DNA; linha 5: DNA plasmidial equivalente a cinco cópias. Observar que, no caso de os T-DNAs integrarem-se ao genoma da planta de interesse em locais distintos, e não em série, o número de bandas corresponde ao número de cópias do T-DNA. A diferença entre as letras A e B é apenas o tamanho dos fragmentos de restrição.

Fonte: Romano (1998).

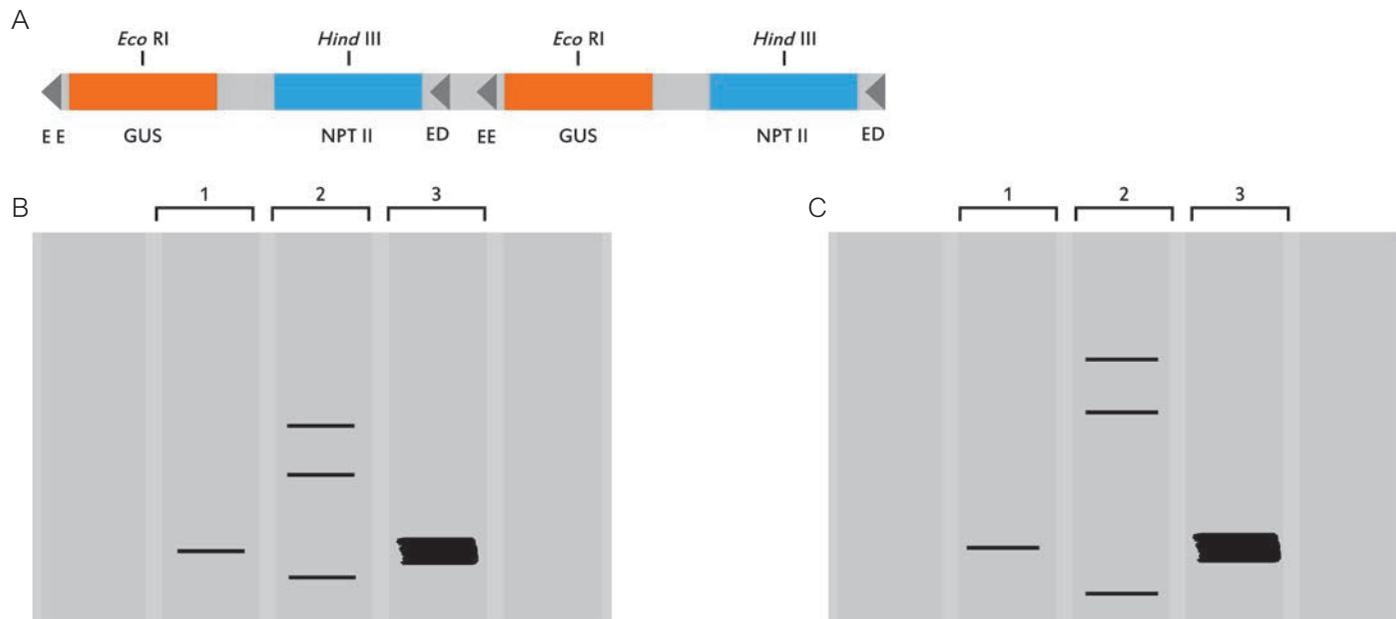


Figura 6. Análise pelo número de bandas. Nesse caso, três cópias do T-DNA foram integradas ao genoma vegetal, das quais duas foram inseridas em série e na mesma direção (A), como no esquema apresentado. B) Todos os DNAs foram digeridos com *EcoRI* e hibridizados contra a sonda A (Figura 3). C) Todos os DNAs foram digeridos com *HindIII* e hibridizados contra a sonda C (Figura 3). Linha 1: DNA plasmidial equivalente a uma cópia; linha 2: DNA de uma planta transgênica contendo três cópias do T-DNA; linha 3: DNA plasmidial equivalente a cinco cópias.

Fonte: Romano (1998).

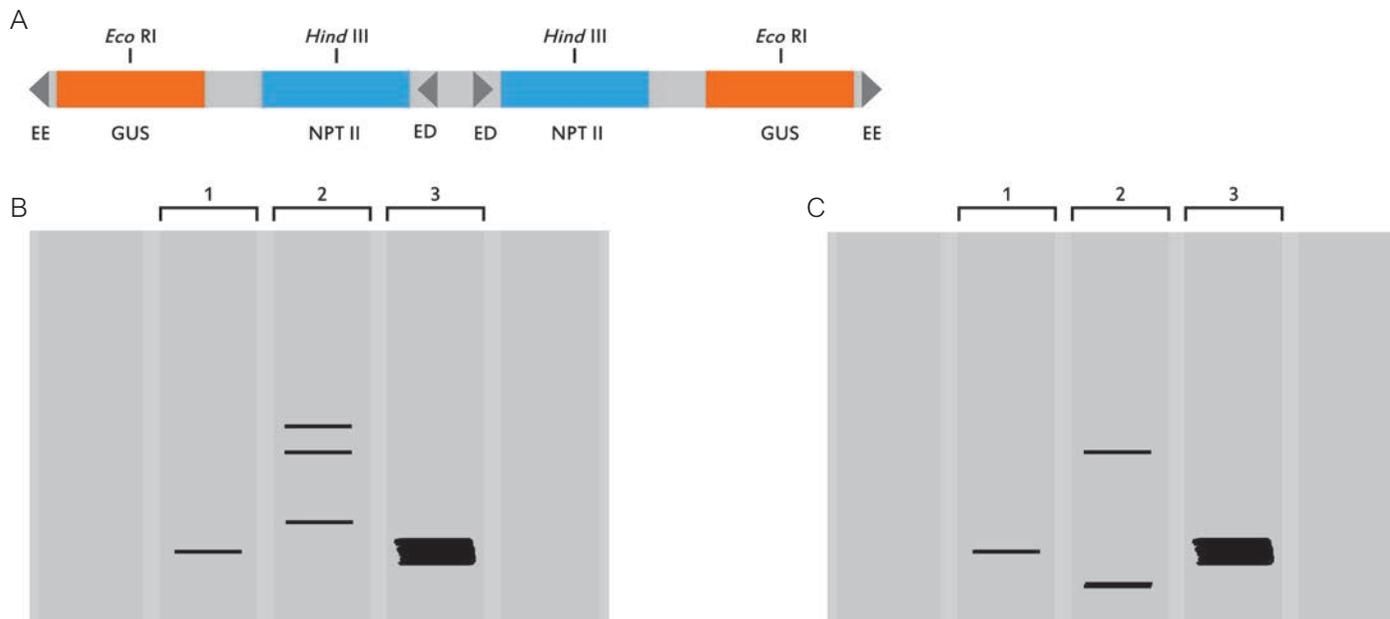


Figura 7. Análise do número de fragmentos do T-DNA inseridos no genoma da planta de interesse utilizando a técnica de *Southern blot*. Nesse caso, três cópias do T-DNA foram integradas ao genoma vegetal, das quais duas foram inseridas em série e em sentidos opostos (A), como no esquema apresentado. B) Todos os DNAs foram digeridos com *EcoRI* e hibridizados contra sonda A (Figura 3). C) Todos os DNAs foram digeridos com *HindIII* e hibridizados contra sonda C (Figura 3). Linha 1: DNA plasmidial equivalente a uma cópia; linha 2: DNA de uma planta transgênica contendo três cópias do T-DNA; linha 3: DNA plasmidial equivalente a cinco cópias. Observar que, nesse caso, a mesma planta pode apresentar números de fragmentos diferentes, com intensidades diferentes, dependendo da enzima de restrição e da sonda utilizada nos experimentos de *Southern blot*.

Fonte: Romano (1998).

6 Referências

- CHOMCZYNSKI, P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 201, n. 1, p. 134-139, 1992.
- DENHARDT, D. T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 23, n. 5, p. 641-646, 1966.
- ISHIHARA, H.; SHIKITA, M. Electroblotting of double-stranded DNA for hybridization experiments: DNA transfer is complete within 10 minutes after pulsed-field gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 184, n. 2, p. 207-212, 1990.
- LICHTENSTEIN, A. V.; MOISEEV, V. L.; ZABOIKIN, M. M. A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 191, n. 1, p. 187-191, 1990.
- OLSZEWSKA, E.; JONES, K. Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 4, n. 4, p. 92-94, 1988.
- OMAR, A. A.; DEKKERS, M. G. H.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. Estimation of transgene copy number in transformed citrus plants by quantitative multiplex real-time PCR. **Biotechnology Progress**, New York, v. 24, n. 6, p. 1241-1248, 2008.

REED, K. C.; MANN, D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, n. 20, p. 7207-7221, 1985.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica *Southern blot*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 205-222.

SABELLI, P. A.; SHEWRY, P. R. Gene characterization by southern analysis. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 49, p. 161-180, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3, 2368 p.

SHEPHERD, C. T.; LAUTER, A. N. M.; SCOTT, M. P. Determination of transgene copy number by real-time quantitative PCR. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 526, p. 129-134, 2009.

SMITH, M. R.; DEVINE, C. S.; COHN, S. M.; LIEBERMAN, M. W. Quantitative electrophoretic transfer of DNA from polyacrylamide or agarose gels to nitrocellulose. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 137, n. 1, p. 120-124, 1984.

SOUTHERN, E. Southern blotting. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 2, p. 518-525, 2006.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

Hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Ana Claudia Guerra Araujo
Rosana Falcão
Guy de Capdeville

1 Introdução

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é utilizada para a localização de sequências de DNA em preparações citológicas contendo cromossomos, que se ligam às regiões com as quais possuem complementaridade. A detecção se dá pela observação da fluorescência no local onde a sonda de DNA marcada hibridiza com o DNA complementar, permitindo a localização física da sequência-alvo no cromossomo. A FISH é considerada atualmente sinônimo de hibridização *in situ* de DNA em cromossomos. O desenvolvimento da FISH foi fundamental na evolução da citogenética clássica para a era da citogenética molecular e genômica.

A técnica de hibridização de DNA-DNA foi inicialmente descrita em 1961 (SCHILDKRAUT et al., 1961) e logo estendida para preparações citológicas (JOHN et al., 1969; PARDUE; GALL, 1969), em que o DNA-alvo era desnaturado *in situ*, antes da hibridização e, assim, estabelecida a hibridização *in situ* (ISH).

A introdução do sistema biotina-estreptavidina ou boitina-avidina e a produção de nucleotídeos biotinilados (deoxiuridina trifosfato-dUTP), no início da década de 1980 (LANGER et al., 1981), permitiram a substituição de sondas radioativas pelas não radioativas. Vários análogos de nucleotídeos estão hoje disponíveis, entre eles, a digoxigenina-dUTP. Quando esses análogos estão associados a um fluoróforo, a detecção da hibridização é feita de forma direta, por meio da observação do fluoróforo incor-

porado à sonda, usando a microscopia de fluorescência. A detecção mais comumente feita é de forma indireta, por meio de moléculas ou anticorpos específicos que possuem afinidade ao análogo do nucleotídeo na sonda e que estão conjugados com fluoróforos (Capítulo 11).

A aplicação da FISH é bastante ampla e inclui o ordenamento (mapeamento) físico de sequências de DNA nos cromossomos permitindo a detecção de clones quiméricos; a identificação e caracterização de cromossomos ou segmentos endógenos ou exógenos; e fornece indicativos de rearranjos e abundância de sequências no genoma. Essas informações auxiliam na compreensão dos mecanismos e formas de evolução, desenvolvimento, relações filogenéticas do organismo, entre outros (JIANG; GILL, 2006). Assim, fornecem conhecimento mais amplo e complexo da estrutura, função, organização e evolução de genes e genomas. As informações obtidas via FISH facilitam o estabelecimento de relações estreitas entre a biologia celular, citogenética convencional e molecular, filogenia, evolução e genômica.

Além de ser uma técnica rápida e *in situ*, a FISH apresenta alta resolução, contraste, sensibilidade, não utiliza radioisótopos e permite a observação simultânea de mais de um tipo de DNA-alvo por meio do uso de diferentes sistemas de marcação-deteção (DEVI et al., 2005). A observação dos sítios de hibridização é feita em microscópio de epifluorescência, onde o espécime é iluminado por uma radiação com baixo comprimento de onda (luz ultravioleta, gerada por lâmpada de mer-

cúrio), selecionada por um filtro (excitação) específico para as moléculas fluorescentes no espécime (Figura 1). A radiação é absorvida, e o fluoróforo emite radiação. Para observação, a luz emitida passa por filtros separadores de raios dicromáticos e, então, é separada da luz de excitação (absorção) por um filtro de barreira. A imagem fluorescente é então formada contra um fundo escuro de alto contraste para ser observada no microscópio (Figura 1).

As sondas utilizadas na FISH podem ser de tamanhos que variam desde 15 pb a 1 Mpb, dependendo do tipo de DNA-alvo, mas geralmente possuem de 200 pb a 300 pb. Ainda, pode-se utilizar um conjunto de várias sondas marcadas diferentemente, e assim cobrir uma grande extensão do DNA-alvo. Para detecção de sequências repetitivas no genoma, as sondas podem, por exemplo, ser oriundas de ampliações por reação da polimerase em cadeia (PCR, Capítulo 10) de parte de elementos repetitivos de DNA, ou, ainda, oligonucleotídeos sintéticos. Para detecção de DNA-alvo com loci únicos, as sondas podem ter como origem DNAs complementares (cDNAs) ou fragmentos clonados de DNA genômico. Para detecção de regiões cromossômicas, podem-se utilizar, por exemplo, sequências de bibliotecas genômicas ou de cDNA (por exemplo, ESTs, YAC ou BAC). Clones BAC são comumente utilizados para detecção de sequências já mapeadas em regiões específicas dos cromossomos e presentes no clone.

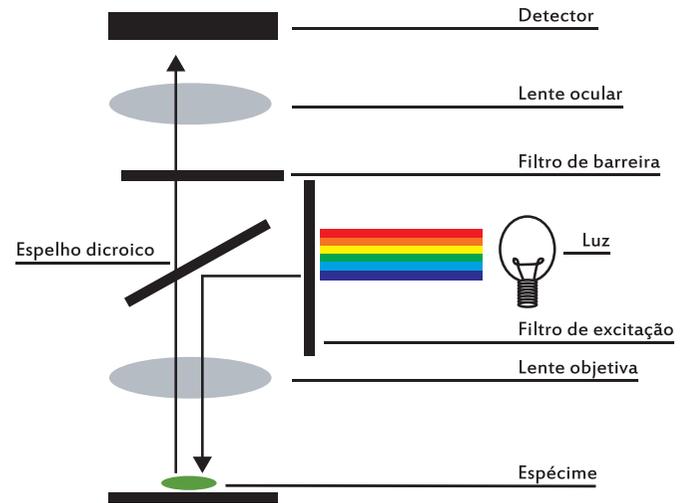


Figura 1. Esquema do caminho óptico de iluminação do microscópio de epifluorescência.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

A resolução da FISH para cromossomos metafásicos é de 5 Mb a 10 Mb de distância entre alvos adjacentes, enquanto para cromossomos prometafásicos, é de apenas 2 Mb (JIANG; GILL, 2006). Para cromossomos meióticos, a resolução é de aproximadamente 1 Kb (DE JONG et al., 1999).

O uso da FISH em plantas teve início em 1985 e tornou-se rotina em diversas áreas como, por exemplo, mapeamento genômico, incluindo mapeamento físico de sequências repetitivas de DNA e de famílias multigênicas (JIANG; GILL, 1994). Essa técnica traz também contribuições para detecção de variações somaclonais resultantes

de cultura de tecidos, nas quais o número e posição de sequências de DNA específicas podem ser comparados entre plantas regeneradas *in vitro* e aquelas que não passaram pela cultura de tecidos (DEVI et al., 2005).

A FISH tornou-se também estratégica no estudo de plantas transgênicas: a) na determinação da posição de inserção de transgenes em regiões específicas do cromossomo; b) nas análises de expressão gênica e hereditariedade (SCHWARZACHER, 2009); c) na confirmação do tipo de integração (completa, parcial ou concatenada) (SOMERS; MAKAREVITCH, 2004); d) na avaliação da estabilidade do transgene no genoma hospedeiro (VAIN et al., 2002); e) na interpretação do efeito da posição do transgene que traz implicações na sua expressão em diferentes gerações e linhagens transgênicas (MATZKE; MATZKE, 1998); f) na identificação de sítios preferenciais (*hot spots*) para a integração de transgenes (TAGASHIRA et al., 2005).

Neste capítulo, são apresentados procedimentos experimentais da técnica FISH em uso no laboratório de microscopia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, com algumas adaptações, de Capdeville et al. (2009) e Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). Variações e etapas experimentais adicionais, que possam ser necessárias, dependendo do tipo de amostra ou da sequência a ser detectada, podem ser encontradas na literatura disponível.

2 Limpeza de lâminas histológicas

2.1 Material

- Cuba de vidro para coloração de oito lâminas, com tampa.
- Detergente neutro 5% (v/v).
- Lâminas histológicas com borda fosca (76 mm x 26 mm).
- Lenço de papel.
- Solução de etanol 70% (v/v).

2.2 Procedimento

1. Colocar lâminas histológicas na cuba, contendo detergente neutro, por pelo menos 2 horas.
2. Descartar o detergente, enxaguar com água corrente por 10 a 15 minutos até que todo o detergente seja removido e colocar água destilada por 1 hora.
3. Descartar a água e colocar solução de etanol 70% por 12 horas, com a tampa, para evitar evaporação.
4. Quando for utilizar, remover a lâmina da cuba e escorrer o excesso de etanol sobre lenço de papel, sem esfregar ou arrastar.

Esfregar fortemente o papel na lâmina pode causar ranhuras visíveis ao microscópio de fluorescência, que poderão refletir luz e interferir na imagem após a hibridização *in situ*.

2.3 Observação

O sucesso da FISH depende de um conjunto de características que envolvem, na etapa inicial, a boa qualidade da lâmina. Lâminas com superfície irregular, engorduradas, arranhadas e empoeiradas não devem ser utilizadas. Existem no mercado lâminas de alta qualidade, aderentes e resistentes a solventes, ideais para uso em FISH.

3 Obtenção de meristema radicular e preparação de cromossomos mitóticos

3.1 Material

- Ácido cítrico monoidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 100 mM: dissolver 2,1 g de ácido cítrico em 100 mL de água destilada.
- Banho-maria ou incubadora a 37 °C.
- Bico de Bunsen.
- Bisturi.
- Citrato trissódico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 100 mM: pesar 2,94 g de citrato trissódico e completar para 100 mL com água destilada.
- Estilete.
- Gelo seco ou nitrogênio líquido.
- Lamínulas (18 mm x 18 mm).

- Lâminas histológicas limpas (item 2.1 Material).
- Lápis com ponta de diamante.
- Microscópio com contraste de fase.
- Microscópio de epifluorescência.
- Microscópio estereoscópico.
- Pinça com ponta fina.
- Placa de Petri (48 mm x 12 mm).
- Solução de ácido acético 45% ou 60% (v/v).
- Solução de DAPI (dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) 200 µg/mL: dissolver 2 mg de DAPI em 10 mL de água estéril e armazenar a -20 °C.



DAPI é considerado um agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Solução de enzimas I (10 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão citrato trissódico 10X	1 mL	1X
Enzima celulase Onozuka R10 <i>Thricoderma viride</i> 0,96 U/mg	0,02 g	0,2%
Enzima celulase <i>Thricoderma</i> sp. 4,7 U/mg	0,18 g	1,8%
Enzima pectinase <i>Rhizopus</i> sp. 3,5 U/g	0,30 g	3,0%
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

Colocar 1 mL do tampão, adicionar as enzimas e completar o volume com água. Misturar por inversão em tubo e armazenar a -20 °C.

- Solução de etanol 70% (v/v).
- Solução de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) 2 mM: pesar 0,29 g de 8-hidroxiquinolina e completar para 1.000 mL com água destilada.



8-HQ é uma substância tóxica por ser inibidora de divisão celular. Sua manipulação deve ser feita com luvas em capela de exaustão.

- Solução fixadora: etanol: ácido acético, 3:1 (v:v).
- Solução fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 200 mM: diluir 200 mL de Na_2HPO_4 1M (Apêndice 4) em 800 mL de água destilada.
- Suporte vertical (estante) para lâminas.
- Tampão citrato trissódico 10X (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Ácido cítrico monoidratado 100 mM	40 mL	40 mM
Citrato trissódico dihidratado 100 mM	60 mL	60 mM

A mistura ácido-base na proporção indicada resultará em solução com pH 4,6. Armazenar a 4 °C.

- Tampão McIlvaine pH 7,0:

Componente	Quantidade	Concentração final
Na_2HPO_4 200 mM	82 mL	164 mM
Ácido cítrico monohidratado 100 mM	18 mL	18 mM

A mistura ácido-base na proporção indicada resultará em solução com pH 7,0. Armazenar a 4 °C.

Na_2HPO_4 200 mM: pesar 28,4 g e completar o volume para 1 L de água destilada.

- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL ou frascos com tampa.

3.2 Procedimento

1. Retirar de 5 mm a 10 mm da ponta da raiz, onde está o meristema radicular, com auxílio de pinça. Coletar 5 a 10 pontas de raízes, que estejam mais esbranquiçadas, túrgidas e firmes.

É necessário determinar o horário em que a divisão celular esteja intensa para coleta da ponta de raiz, para cada espécie em estudo. Para plantas de *Brachiaria* spp. mantidas em casa de vegetação em Brasília, por exemplo, grande número de células em metáfase mitótica é encontrado por volta de 9h30; já para *Arachis* spp., o horário ideal é 12h00.

2. Imergir imediatamente as pontas de raízes coletadas em frasco com tampa contendo solução de 8-HQ 2 mM, por 2 horas, à temperatura ambiente. Recomenda-se trocar por nova solução e colocar por mais 2 horas a 4 °C.

O volume da solução deve corresponder a, no mínimo, cinco vezes o volume ocupado pelas amostras. A temperatura para inibição de metáfase recomendada é a mesma temperatura em que as raízes crescem, pois permite que o ciclo mitótico continue até o estágio de metáfase, no qual deverá ocorrer a inibição. O tempo de incubação na 8-HQ varia de acordo com o material. Por exemplo, experimentos com *Arachis* spp. indicaram ótimos resultados após 2 horas de pré-tratamento à temperatura ambiente, seguidas por 1 hora a 4 °C, enquanto, em *Brachiaria* spp., o tempo mais adequado é de 1 a 2 horas à temperatura ambiente. Amostras de outras espécies podem ser incubadas por 12 horas a 4 °C. Existem outros agentes antimitóticos que podem ser utilizados, tais como colchicina, bromouracila, bromonaftaleno, etc.

3. Retirar a solução de 8-HQ do frasco e acrescentar a solução fixadora recém-preparada por 2 a 24 horas a

4 °C, trocando a solução por uma fresca após a primeira hora.

Após fixação, as amostras podem ficar armazenadas em etanol 70%, a 4 °C, por 2 a 3 meses até sua utilização. Entretanto, o tempo de armazenamento vai depender da amostra e deve ser determinado experimentalmente.

4. Aquecer a solução de enzimas I a 37 °C por 15 minutos.
5. Selecionar cinco a dez pontas de raízes não oxidadas, túrgidas, intactas e colocar em placa de Petri contendo tampão citrato trissódico 1X por 5 minutos. Repetir o procedimento mais duas vezes.

Amostras não devem sofrer dessecação. Para tanto, as trocas de soluções devem ser rápidas, e sempre em volume maior do que aquele ocupado pelas amostras.

6. Remover cuidadosamente o tampão da placa com auxílio de pipeta e adicionar a solução de enzimas I pré-aquecida, até cobrir completamente as amostras. Incubar a 37 °C por 30 a 90 minutos.

Experimentos conduzidos com *Arachis* spp. e *Brachiaria* spp. indicaram ótimos resultados após incubação por 45 minutos. O tempo de digestão e a composição da solução de enzimas I dependerão dos componentes e estrutura das paredes celulares da espécie em estudo, e deverão ser determinados experimentalmente.

7. Remover cuidadosamente a solução de enzimas I com auxílio de pipeta, adicionar tampão citrato trissódico 1X, pré-resfriado a 4 °C, até cobrir completamente as amostras, e lavar por 5 minutos. Repetir a lavagem com tampão por três vezes. Selecionar as pontas de raízes íntegras em microscópio estereoscópico.

Após digestão da parede celular vegetal, as pontas de raízes ficam frágeis e quebradiças e, portanto, é necessário muito cuidado para remoção de soluções e manuseio das raízes. A solução enzimática utilizada pode ser guardada a -20 °C para reutilização, resguardando-se o risco de contaminação entre materiais. Sugere-se manter um frasco de enzima para cada material biológico.

8. Depositar uma gota com 50 µL de ácido acético 45% ou 60% no centro da lâmina e transferir uma ponta de raiz digerida para a gota. Isolar a região meristemática (1 mm a 3 mm da extremidade) com auxílio de pinça e bisturi, em microscópio estereoscópico, descartando tecidos adjacentes.

As células meristemáticas radiculares normalmente se soltam apenas com uma leve pressão na região da coifa.

9. Separar cuidadosamente as células meristemáticas com movimentos circulares na superfície da gota utilizando o estilete. Cobrir com lamínula e fazer leve pressão para espalhar as células.

Recomenda-se o uso de lamínula com dimensão de 18 mm x 18 mm para reduzir a área de espalhamento das células. Pode-se utilizar a ponta de uma pinça para bater levemente sobre a lamínula ou utilizar o próprio dedo polegar com um papel de filtro sobre a lamínula para fazer a pressão. Deve-se tomar cuidado para não deslizar a lamínula sobre a lâmina de forma a não danificar os cromossomos.

10. Observar a lâmina em microscópio com contraste de fase e verificar o espalhamento das células. Se necessário, refazer o esmagamento com maior pressão.

Caso sejam observados diferentes planos de foco para o mesmo conjunto de cromossomos, aquecer rapidamente a lâmina em chama de bico de Bunsen para auxiliar na expansão da área celular e hidrólise de elementos do citoplasma, facilitando o melhor espalhamento e adesão dos cromossomos à superfície da lâmina.

Em caso de dificuldade para observação dos cromossomos em microscopia de fase, pode-se tratar uma ou duas lâminas com 70 μL de DAPI 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μL de DAPI em 10 mL de tampão McIlvaine), colocar uma lamínula e observar em microscópio de epifluorescência após 10 a 20 minutos na solução (Figura 2). Caso nenhuma metáfase seja observada na lâmina, repetir as etapas 8 a 10 deste item com outra amostra e assim sucessivamente, até que se encontrem lâminas com boas metáfases.

11. Caso a lâmina observada (em microscopia de fase ou de epifluorescência com DAPI) tenha material com boa qualidade (metáfases bem espalhadas), colocar a lâmina diretamente sobre uma superfície de gelo seco por 2 minutos ou mergulhar a lâmina em nitrogênio líquido lentamente, por 5 a 10 segundos,

com auxílio de pinça. Retirar a lâmina do ambiente frio e remover imediatamente a lamínula com auxílio de bisturi. Marcar as bordas da área onde estava a lamínula (ou seja, área onde os cromossomos foram espalhados) usando lápis de diamante.

12. Deixar lâminas selecionadas secarem horizontalmente em uma estante, à temperatura ambiente, por 12 horas e refinar a seleção de lâminas em microscópio com contraste de fase (sem necessidade de utilizar lamínula). As lâminas devem ter, pelo menos, cinco preparações com alta qualidade, ou seja, cinco

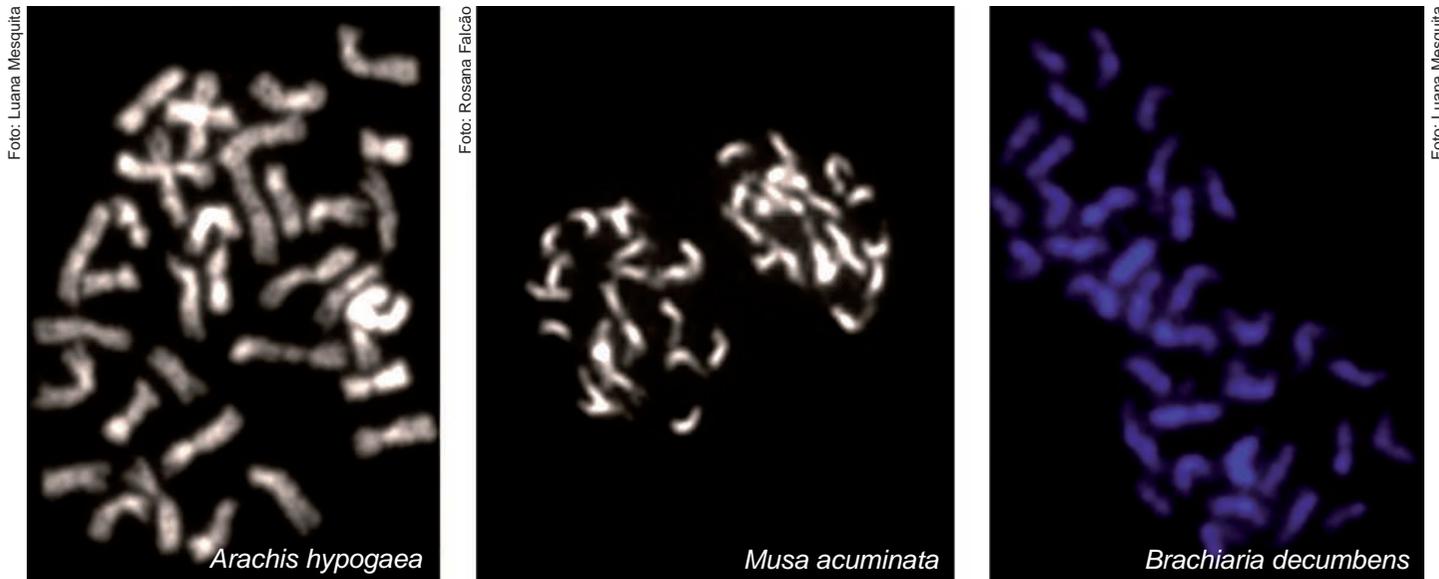


Figura 2. Cromossomos pré-metafásicos tratados com DAPI, observados em microscópio de epifluorescência e fotodocumentados em preto e branco ou cor.

metáfases completas (todos os cromossomos), bem espalhadas e sem restos celulares.

13. Prosseguir com as lâminas selecionadas diretamente para hibridização in situ [ir para o item 7 Hibridização in situ por fluorescência (FISH)] ou armazená-las a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caixa selada contendo sílica gel para evitar hidratação até a utilização.

3.3 Observações

Para obtenção de células mitóticas, os melhores materiais vegetais são meristemas radiculares jovens. O momento de maior atividade mitótica de uma determinada espécie vegetal depende de fatores como temperatura, fotoperíodo e época do ano. A determinação dos picos mitóticos (quando ocorre maior atividade mitótica no meristema radicular) é essencial para uma boa preparação de lâminas.

Para uma boa digestão enzimática, as enzimas, e sua concentração, devem ser determinadas experimentalmente.

Aqui estão descritos reagentes e métodos testados com sucesso em *Brachiaria brizantha* e *Arachis hypogaea* (NIELEN et al., 2010a, 2010b, 2011).

A seleção rigorosa de lâminas contendo boas metáfases é absolutamente necessária para o sucesso da FISH.

4 Obtenção de microsporócitos e preparação de cromossomos em paquíteno

4.1 Material

- Banho-maria ou incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Bisturi.
- Corante carmim acético:

Componente	Quantidade	Concentração final
Carmim	1 g	1%
Ácido acético glacial	45 mL	45%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Armazenar à temperatura ambiente em vidro escuro.



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Corante fucsina ácida em lactofenol:

Componente	Quantidade	Concentração final
Fucsina ácida	1 g	1%
Ácido acético glacial	1 mL	1%
Solução de lactofenol	50 mL	50%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Enzima citohelicase (*Helix pomatica*) 1%: dissolver 0,1 g em 10 mL de tampão citrato trissódico 1X (item 3.1 Material).
- Enzima celulase Onozuka R10 1% (dissolver 0,1 g em 10 mL de tampão citrato trissódico 1X; item 3.1 Material).
- Enzima pectoliase (*Aspergillus japonicus*) 1%: dissolver 0,1g (0,94 U/mg) em 10 mL de tampão citrato trissódico 1X (item 3.1 Material).
- Estilete ou agulha com ponta grossa.
- Lâminas histológicas.
- Lamínulas (18 mm x 18 mm).
- Microscópio de luz.
- Microscópio estereoscópico.
- Pinça com ponta fina.
- Pipeta com ponta fina.
- Placa aquecedora a 55 °C.
- Solução de ácido acético 60% (v/v).
- Solução de DAPI (item 3.1 Material).



DAPI é considerado um agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Solução de etanol 70% e 90% (v/v).

- Solução de enzimas II:

Componente	Quantidade	Concentração final
Enzima celulase Onozuka R10 1%	1 mL	0,3%
Enzima citohelicase 1%	1 mL	0,3%
Enzima pectoliase 1%	1 mL	0,3%

Misturar por inversão em tubo até a completa homogeneização.

- Solução fixadora: etanol: ácido acético; 3:1 (v:v).
- Solução de lactofenol:

Componente	Quantidade	Concentração final
Fenol	10 mL	20%
Ácido láctico	10 mL	20%
Glicerina	20 mL	40%
H ₂ O	q.s.p.50 mL	

Armazenar à temperatura ambiente em vidro escuro.



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão McIlvaine (item 3.1 Material).
- Tampão citrato trissódico 10X (item 3.1 Material).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL ou frascos com tampa.

4.2 Procedimento

Um esquema geral do procedimento para isolamento de cromossomos paquítenicos pode ser encontrado na Figura 3A.

1. Isolar flores com comprimentos variados, em fases de desenvolvimento anteriores à antese, e colocar cada flor em um frasco contendo solução fixadora recém-preparada, à temperatura ambiente, por 1 hora. Trocar a solução fixadora por uma nova e manter a 4 °C por mais 24 horas.
2. Remover o fixador, adicionar etanol 70% e manter a 4 °C por, pelo menos, mais 12 horas.
3. Isolar as anteras de cada flor, em uma placa contendo etanol 70%. Observar em microscópio estereoscópico a dimensão, cor e estrutura das anteras, para estimar a etapa de divisão meiótica correspondente (Figura 3B).
4. Colocar apenas uma antera em uma gota de fucsina ácida, de carmim acético ou de DAPI sobre uma lâmina histológica. Manter as demais anteras em etanol 70%.

Corantes como fucsina e carmim têm um custo baixo e podem ser observados em microscopia de luz, permitindo uma noção geral da célula e dos cromossomos. Já DAPI só pode ser observado em microscópio de epifluorescência.

5. Macerar a antera na gota sobre a lâmina com auxílio de estilete, cobrir com uma lamínula e fazer leve pressão com movimentos circulares para liberar os microsporócitos da antera. Remover o excesso de corante com lenço de papel.
6. Examinar a lâmina com a única antera macerada em microscópio com contraste de fase (fucsina ou carmim) ou epifluorescência (DAPI) e confirmar se a antera possui microsporócitos em estágio paquíteno,

com cromossomos espalhados parecendo fios alongados (Figura 3C).

Para *Musa acuminata*, por exemplo, uma das cinco anteras presentes na flor é usada para preparação de seis lâminas com cromossomos paquítenicos, enquanto para *Phaseolus vulgaris*, uma flor é utilizada para cada lâmina.

7. Transferir para tubo de centrifuga as demais anteras mantidas em etanol 70% (item 4 desta seção) que correspondam àquela na qual foi observada a presença de cromossomos em paquíteno (etapa 6 deste item). Lavar as anteras por 5 minutos em água deionizada. Remover a água com auxílio de pipeta e lavar duas vezes com tampão citrato trissódico 1X por 5 minutos.
8. Remover o tampão e incubar as anteras em 1 mL de solução de enzimas II por 2 horas a 37 °C. Colocar o tubo no gelo, retirar a solução enzimática e desidratar sequencialmente as anteras em solução de etanol 70%, 90% e etanol absoluto por 5 minutos em cada vez.

O número de unidades enzimáticas a ser utilizado na preparação da solução de enzimas II, bem como tempo de digestão, dependerá do tipo de amostra e deverá ser determinado experimentalmente.

9. Remover o etanol, adicionar de 50 µL a 100 µL de solução fixadora e macerar as anteras com auxílio de estilete ou agulha com ponta grossa até obter suspensão homogênea de células.
10. Umedecer a lâmina com vapor de água, colocando-a sobre um béquer com água destilada em ebulição.

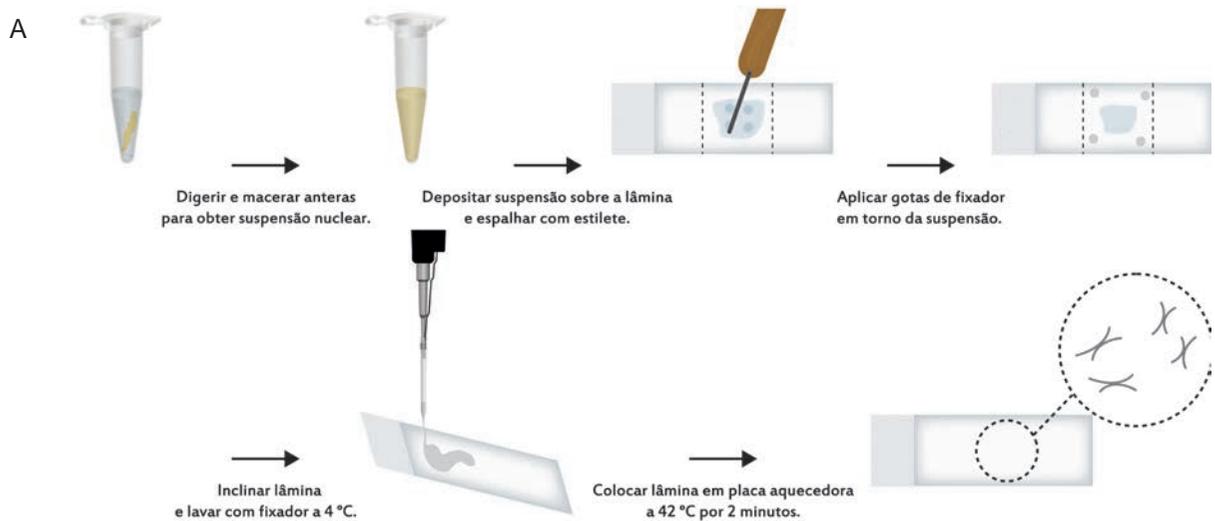


Foto: Tomas Felipe Costa do Rego

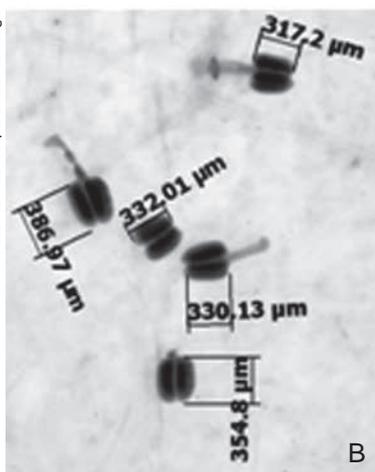


Foto: Marcelo Picaço de Farias

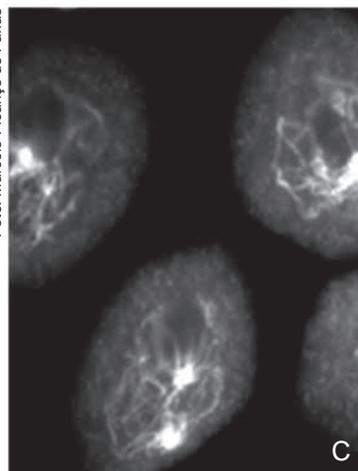


Foto: Rosana Falcão

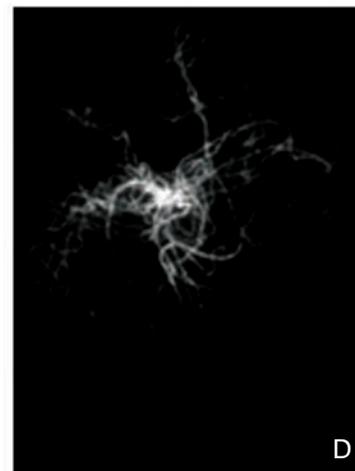


Figura 3. Obtenção de cromossomos em paquíteno. A) Esquema das etapas de preparação de lâminas contendo cromossomos em paquíteno. B) Anteras isoladas de *Phaseolus vulgaris* em microscópio estereoscópico com suas dimensões assinaladas. C) Microsporócitos de *Elaeis guineensis* com cromossomos em paquíteno tratados com DAPI em microscópio de epifluorescência. D) Cromossomos de *Musa acuminata* em paquíteno tratados com DAPI em microscópio de epifluorescência.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

Umedecer a lâmina permite o melhor espalhamento da amostra sobre a superfície. Deve-se segurar a lâmina com auxílio de uma pinça longa.

É importante manter a área de espalhamento da gota restrita ao centro da lâmina histológica para impedir que o material se disperse por toda a superfície. Este procedimento facilitará a busca de cromossomos, bem como economia de solução, durante a hibridização *in situ*.

11. Colocar 20 μL da suspensão homogênea de células (etapa 9 deste item) no centro da lâmina umedecida. Colocar a lâmina na placa aquecedora a 55 °C e, rapidamente, adicionar 60 μL de ácido acético 60% à amostra, espalhando a solução com auxílio de estilete ou agulha por 2 minutos, sem que a agulha toque na lâmina.
12. Quando a quantidade da amostra adicionada de ácido acético atingir metade do volume inicial em razão da evaporação, adicionar 40 μL de solução fixadora resfriada a 4 °C em gotas ao redor da amostra. Em seguida, retirar a lâmina da placa e lavar com solução fixadora resfriada a 4 °C para remover excesso de resíduos. Deixar a lâmina na placa a 55 °C por 1 a 2 minutos para secar.
13. Retirar a lâmina da placa e analisar a qualidade dos cromossomos em microscópio com contraste de fase (sem necessidade de montar com lamínula) ou epifluorescência (após tratamento com solução de DAPI e montagem com lamínula). Selecionar lâminas contendo cromossomos paquitênicos bem espalhados e sem restos celulares, como aqueles ilustrados na Figura 3D.

4.3 Observações

Deve-se determinar o tamanho dos botões florais para coleta para cada espécie vegetal em estudo. As coletas devem anteceder à antese, com pétalas e sépalas ainda fechadas. Botões de *Phaseolus vulgaris* com 3 mm de comprimento contêm, por exemplo, cinco anteras de 1,5 mm a 2,0 mm de comprimento. Botões de *Musa acuminata* com 2 cm de comprimento, presentes em camadas internas das brácteas, possuem anteras de 0,9 cm a 1,2 cm de comprimento (CAPDEVILLE et al., 2009).

Durante a divisão celular meiótica, os cromossomos têm conformações típicas para cada etapa, que podem ser identificadas em microscopia de contraste de fase ou de luz após coloração.

O estágio de paquíteno (prófase I) é caracterizado por cromossomos pareados, em sinapse e com filamentos espessos.

5 Fixação de preparações contendo cromossomos

5.1 Material

- Cloreto de magnésio 1 M (MgCl_2 1 M; Apêndice 4).
- Cuba para coloração com tampa.
- Etanol absoluto a -20 °C.

- Solução de etanol 70% e 90% (v/v).
- Solução de formaldeído 1,48%:

Componente	Quantidade	Concentração final
Formaldeído PA ≥ 37%	4,0 mL	1,48%
MgCl ₂ 1 M	5,0 mL	50 mM
Tampão PBS 10X	10,0 mL	1X
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	



Formaldeído é considerado provável agente mutagênico e altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão fosfato salina – PBS 10X (Tampão PBS 10X; Apêndice 4).

5.2 Procedimento

Opção 1: fixação com formaldeído

1. Colocar oito lâminas contendo cromossomos na cuba. Reidratar sequencialmente os cromossomos com etanol absoluto, 90% e 70%, por 5 minutos em cada solução.
2. Remover o etanol e adicionar solução de formaldeído a 1,48% por 10 minutos, em capela de exaustão.

3. Remover a solução de formaldeído e adicionar água bidestilada à cuba. Repetir o processo de lavagem em água por três vezes (etapas 1 a 3 deste item), por 5 minutos cada vez. Retirar lâminas, colocar em estante para secar horizontalmente à temperatura ambiente.

Opção 2: fixação com etanol absoluto

1. Colocar oito lâminas na cuba contendo etanol absoluto por 12 a 24 horas a -20 °C.
2. Retirar as lâminas e deixar secar horizontalmente à temperatura ambiente.

5.3 Observações

Em razão das inúmeras lavagens e tratamentos a que as lâminas são submetidas durante o experimento, é necessário fixar os cromossomos nas lâminas de forma que os cromossomos não sejam removidos ou morfológicamente alterados.

Deve-se ter atenção ao colocar a última lâmina, voltando sua face contendo cromossomos para o interior da cuba, evitando, assim, o arraste da amostra.

A fixação com formaldeído pode apresentar melhores resultados na preservação dos cromossomos quando comparada à fixação com etanol. Entretanto, a manipulação do formaldeído deve ser mais cautelosa, em razão de sua toxicidade.

6 Pré-hibridização

6.1 Material

- Ácido clorídrico (HCl) 0,01N: diluir 4 mL de HCl 2,5 N (Apêndice 4) em 1.000 mL de água destilada.



Ácido clorídrico é um ácido forte, altamente tóxico e corrosivo. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Câmara úmida (para mais detalhes, ver Capítulo 16).
- Cloreto de magnésio 1 M ($MgCl_2$ 1 M; Apêndice 4).
- Estufa a 65 °C e 37 °C.
- Etanol absoluto.
- Lamínula plástica: filme plástico do tipo PVC (24 mm x 50 mm) para cobrir a lâmina.
- Pepsina a 500 mg/mL: diluir 0,5 g de pepsina em q.s.p. 1 mL de HCl 0,01N.
- Pepsina a 10 µg/mL: diluir 4 µL de pepsina a 500 mg/mL em q.s.p. 200 mL de HCl 0,01 N.
- RNase A 100 µg/mL: diluir 5 µL de RNase A 10 mg/mL (sem DNase) (Apêndice 4) em 495 µL de tampão SSC 2X (Apêndice 4).
- Solução de etanol 70% e 90% (v/v).
- Solução de formaldeído 1,48% (item 5.1 Material).

- Tampão fosfato salina 10X (Tampão PBS 10X; Apêndice 4).
- Tampão SSC 20X (Apêndice 4).

6.2 Procedimento

1. Colocar lâminas previamente fixadas (seção 5) a 65 °C por 30 minutos e, em seguida, a 37 °C por 2 ou 12 horas à temperatura ambiente.
2. Posicionar as lâminas horizontalmente sobre um suporte e adicionar 100 µL/lâmina de RNase A sobre a área demarcada na lâmina contendo cromossomos. Colocar uma lamínula plástica para cobrir a área cuidadosamente (sem arraste) e incubar a 37 °C durante 1 hora em câmara úmida.

O plástico para cobrir a lâmina histológica durante as etapas de pré-hibridização pode ser cortado (24 mm x 50 mm), pois tem menor peso que laminulas de vidro. A posição horizontal das lâminas para incubação permite a utilização de menor quantidade de solução, e a cobertura plástica garante uma distribuição geral e uniforme.

3. Transferir as lâminas para cuba e lavar três vezes com tampão SSC 2X por 5 minutos cada vez. Remover a lamínula plástica sem arraste.
4. Remover o tampão e incubar em HCl 0,01 N por 2 minutos. Remover as lâminas da cuba e escorrer excesso no papel.
5. Posicionar as lâminas horizontalmente, adicionar imediatamente 200 µL/lâmina de pepsina a 10 µg/mL e

cobrir com lamínula plástica. Incubar por 1 a 10 minutos a 37 °C, dependendo do material.

A ação da pepsina deve ser periférica aos cromossomos (resto citoplasmático e proteínas associadas ao DNA), pois visa a facilitar a penetração dos componentes da solução de hibridização. A ação da pepsina pode ser prejudicial aos cromossomos menos compactados, causando danos em sua estrutura. Portanto, a necessidade do tratamento enzimático, bem como o tempo adequado, devem ser experimentalmente determinados.

6. Colocar as lâminas com água bidestilada na cuba, removendo as lamínulas com cuidado.
7. Remover o excesso de água e incubar em solução de formaldeído 1,48% por 10 minutos.
8. Remover excesso de formaldeído e incubar três vezes em tampão SSC 2X por 5 minutos cada vez.
9. Remover o tampão e desidratar sequencialmente as lâminas em etanol 70%, 90% e etanol absoluto por 3 minutos em cada vez.

6.3 Observações

Lâminas contendo preparações citológicas devem ser tratadas antes da hibridização, visando eliminar restos citoplasmáticos, manter a estrutura dos cromossomos e aumentar a acessibilidade dos componentes da reação de hibridização.

Após colocar a cobertura plástica sobre a lâmina, sugere-se inverter as lâminas (de cabeça para baixo) durante as incubações para evitar precipitação de reagentes.

Para *Brachiaria* e *Arachis* spp., em vez de utilizar formaldeído, utiliza-se paraformaldeído 4% pois esse é mais puro e, portanto, traz menos contaminação à amostra.

7 Hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Um esquema geral com as principais etapas da FISH é apresentado na Figura 4.

7.1 Material

- Câmara úmida (para mais detalhes, ver Capítulo 16).
- Formamida PA.
- Incubadora a 37 °C.
- Lamínula (24 mm x 24 mm).
- Lamínulas plásticas (item 6.1 Material).
- Mistura de hibridização (20 µL/lâmina):

Componente	Quantidade	Concentração final
Solução de sulfato de dextrana 20% em HB50	10 µL	10%
Sonda 50 ng/µL	4 µL	200 ng
Tampão HB50	q.s.p. 20 µL	

Preparar para até 10 lâminas (200 µL). A essa mistura podem ser adicionados EDTA 1,25mM e SDS 0,125%, desde que o tampão fosfato de sódio 1 M do HB50 seja trocado por quantidade similar de H₂O.

- Placa aquecedora a 60 °C ou 80 °C.

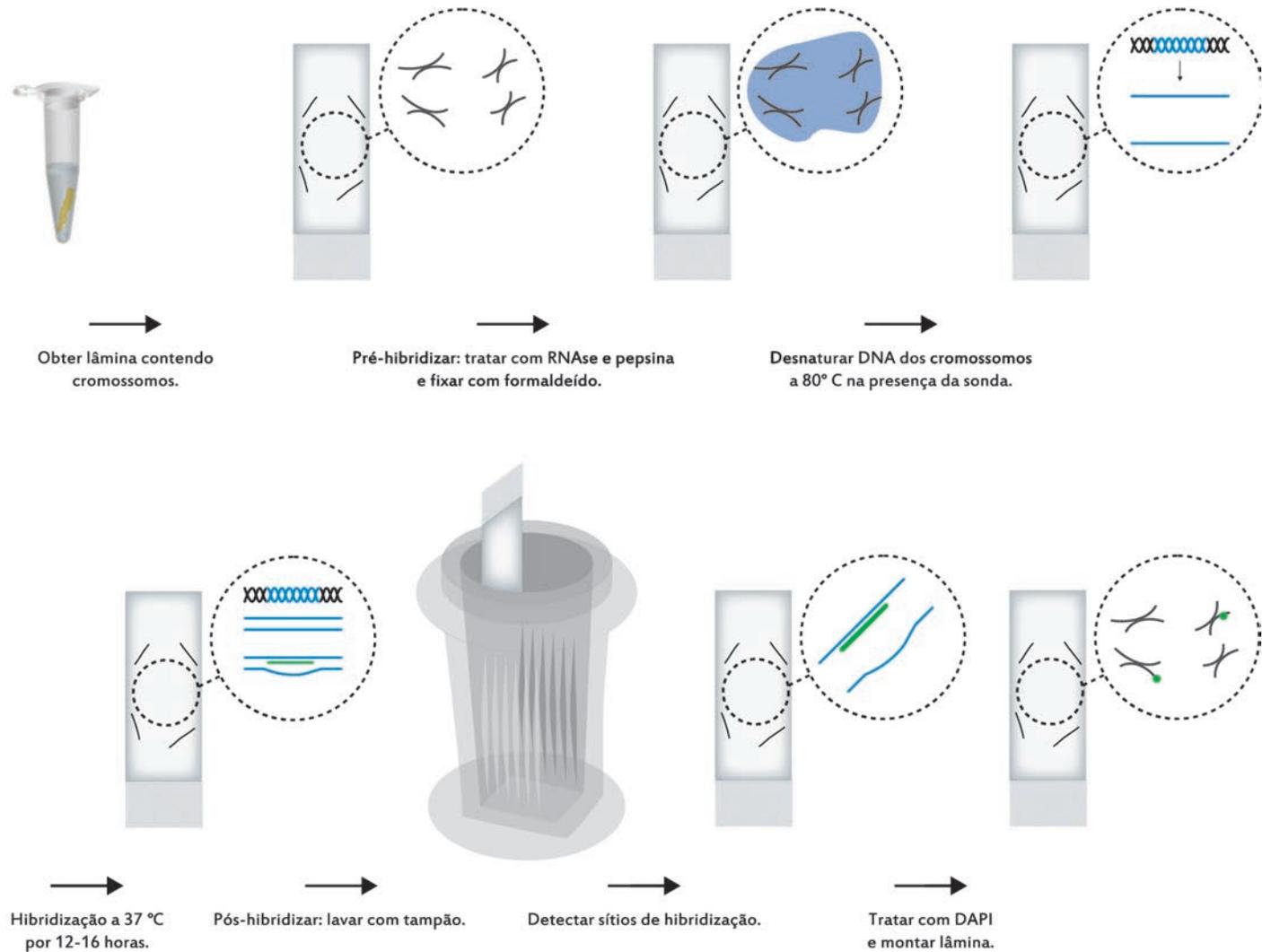


Figura 4. Esquema com etapas de hibridização in situ por fluorescência (FISH).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

- Solução de sulfato de dextrana 20%:

Componente	Quantidade	Concentração final
Sulfato de dextrana	2 g	20%
Tampão HB50	q.s.p. 10 mL	

Aquecer a solução por 3 horas a 70 °C para dissolver a dextrana. Armazenar a -20 °C em alíquotas de 1 mL em tubos de microcentrífuga.

- Sonda a 50 ng/μL (Capítulo 11).
- Tampão fosfato de sódio 1 M (Apêndice 4).
- Tampão HB50:

Componente	Quantidade	Concentração final
Formamida PA	5,0 mL	50%
Tampão SSC 20X	1,0 mL	2X
Tampão fosfato de sódio 1 M	0,5 mL	50 mM
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	



Formamida é altamente tóxica por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão SSC 20X (Apêndice 4).

7.2 Procedimento

1. Preparar a mistura de hibridização com a sonda e aquecê-la por 10 minutos a 92 °C em banho-maria para desnaturação da sonda. Após o aquecimento, resfriá-la em gelo imediatamente.

A mistura de hibridização deve ser preparada imediatamente antes do uso, em um tubo de microcentrífuga. A concentração final da sonda deve ser estabelecida experimentalmente, mas sugere-se iniciar por aproximadamente 200 ng/lâmina.

2. Adicionar 20 μL da mistura de hibridização a cada lâmina, colocar lamínula de vidro e depositar lâmina sobre placa aquecedora a 80 °C por 2 minutos e meio, ou a 60 °C por 6 minutos, para desnaturação do DNA nos cromossomos.

Caso haja diferentes sondas, numerar cada tubo contendo a mistura de hibridização de acordo com a sonda adicionada e numerar cada lâmina de forma a corresponder ao tubo com a sonda a ser adicionada.

Diferentes combinações de tempo e temperatura para desnaturação de cromossomos devem ser testadas, visando garantir a acessibilidade dos componentes da mistura de hibridização aos cromossomos, sem comprometer a integridade de sua estrutura.

Nesta etapa, faz-se necessário o uso de lamínula de vidro ou plástica resistente à incubação em alta temperatura.

3. Retirar lâminas da placa aquecedora, colocar em câmara úmida e incubar a 37 °C por 12 a 16 horas.

7.3 Observação

Recomenda-se sempre o uso de sondas, tais como para DNA ribossômico 45S ou 5S teloméricas ou DNA de cromossomos conhecidos, como controle positivo do experimento. Caso seja necessário um controle negativo, deve-se proceder à hibridização in situ sem adicionar a sonda à mistura de hibridização, o que informará sobre ocorrência de autofluorescência, bem como ausência de especificidade dos agentes de detecção.

8 Lavagem pós-hibridização

8.1 Material

- Banho-maria a 42 °C com agitação.
- Cuba de vidro para oito lâminas.
- Solução de formamida 50%: adicionar 20 mL de tampão SSC 20X (Apêndice 4) a 50 mL de formamida. Completar para 100 mL com água destilada.



Formamida é altamente tóxica por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão SSC 20X (Apêndice 4).

8.2 Procedimento

1. Retirar as lâminas da câmara úmida após hibridização e colocar em cuba contendo tampão SSC 2X a 42 °C por 2 minutos, removendo as lamínulas. Trocar por nova solução de SSC 2X a 42 °C e incubar por mais 10 minutos. Em seguida, adicionar novo tampão e incubar por 5 minutos adicionais. Recomenda-se agitar suavemente a cuba durante a incubação.
2. Incubar as lâminas em solução de formamida 50%, a 42 °C, três vezes por 5 minutos cada uma [estringência equivalente a 82%, segundo Schwarzscher e Heslop-Harrison (2000)].

3. Incubar lâminas em SSC 2X a 42 °C por 10 minutos e, em seguida, em SSC 2X à temperatura ambiente por 10 minutos adicionais.

8.3 Observação

Dependendo da complementaridade entre as sequências da sonda e do DNA-alvo, é necessário determinar qual a estringência necessária durante as lavagens, de forma a permitir que apenas as sequências complementares da sonda permaneçam hibridizadas às sequências complementares do DNA-alvo dos cromossomos. Por exemplo, para aumentar a estringência, pode-se usar tampão SSC 1X com formamida 50% a 42 °C, cuja estringência equivale a 90%. Essa estringência confere estabilidade de híbridos DNA-DNA que têm 90% ou mais de complementaridade entre sequências. Uma tabela com as estringências estimadas das soluções de lavagens está disponível em Schwarzscher e Heslop-Harrison (2000).

9 Detecção dos sítios de hibridização

9.1 Material

- Albumina de soro bovino (BSA) para biologia molecular.
- Anticorpo antidigoxigenina, fragmento FAB – conjugado com FITC, por exemplo (200 µg/mL).

- Avidina conjugada com fluoróforo vermelho (por exemplo, Texas Red 2 mg/mL).
- Câmara úmida (para mais detalhes, ver Capítulo 16).
- Cuba de vidro.
- Incubadora ou banho-maria a 37 °C e 42 °C.
- Lamínula (24 mm x 32 mm).
- Lamínula plástica (item 6.1 Material).
- Meio de montagem antidevanescimento.
- Mistura de detecção para digoxigenina e/ou biotina para oito lâminas:

Componente	Quantidade	Concentração final
Anticorpo antidigoxigenina/ FITC	4 µL	800 ng
Avidina – Texas Red	3,2 µL	6,4 µg
Tampão de bloqueio	q.s.p. 400 µL	

Usar 50 µL/lâmina. Centrifugar rapidamente a solução contendo o anticorpo antes de colocar sobre a lâmina, para evitar a presença de precipitados.

O anticorpo antidigoxigenina, conjugado com FITC, deve ser usado na mistura de detecção quando for usada na hibridização uma sonda contendo dig-11-dUTP (Capítulo 11). Quando a sonda contiver biotina, deve ser usada na mistura de detecção a avidina conjugada a Texas Red (Capítulo 11). Caso as duas sondas sejam usadas simultaneamente, deve-se adicionar tanto o anticorpo quanto a avidina à mistura de detecção.

- Solução de DAPI (item 3.1 Material).



DAPI é considerado um agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Tampão de bloqueio:

Componente	Quantidade	Concentração final
BSA	0,5 g	5%
Tampão de detecção	6 mL	
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

Misturar bem e armazenar a 4 °C por até um mês.

- Tampão de detecção:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tween 20	0,2 mL	0,2%
Tampão SSC 20X	20 mL	4X
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tampão McIlvaine (item 3.1 Material).
- Tampão SSC 20X (Apêndice 4).

9.2 Procedimento

1. Incubar as lâminas hibridizadas em tampão de detecção por 5 minutos na cuba. Retirar as lâminas e escorrer o excesso de solução em papel.
2. Colocar as lâminas em suporte horizontal, aplicar 40 µL/lâmina de tampão de bloqueio, cobrir com lamínula plástica e incubar por 1 hora a 37 °C na câmara úmida. Retirar as lâminas, remover a lamínula plástica cuidadosamente, escorrer excesso de solução em papel.

3. Colocar novamente as lâminas em suporte horizontal, aplicar 40 μL /lâmina de mistura de detecção para digoxigenina e/ou biotina, cobrir com lamínula e incubar por 1 hora a 37 °C na câmara úmida.
 4. Transferir as lâminas para cuba contendo tampão de detecção a 42 °C, por 2 minutos, e remover a lamínula plástica.
 5. Colocar novo tampão de detecção a 42 °C e incubar lâminas mais duas vezes, por 10 minutos cada vez.
 6. Remover o excesso do tampão, aplicar 100 μL /lâmina da solução de DAPI, colocar a lamínula plástica sobre a lâmina e incubar por 10 a 20 minutos, no escuro.
 7. Lavar as lâminas na cuba com tampão de detecção e remover a lamínula plástica.
 8. Escorrer o excesso de solução com papel e aplicar 40 μL /lâmina de meio de montagem na área demarcada pelo lápis de diamante (etapa 12 do item 3.2 Procedimento).
 9. Montar a lamínula (24 mm x 32 mm) e, entre papéis de filtro, remover um pouco do excesso de meio de montagem. Proceder à observação das lâminas após 12 horas.
- Deve-se evitar a formação de bolhas ao pipetar o meio de montagem e aguardar por pelo menos 12 horas antes da observação ao microscópio para que o DAPI e os fluoróforos estejam mais estáveis.
10. Armazenar as lâminas horizontalmente, sem umidade, no escuro a 4 °C.

9.3 Observações

O método mais comumente empregado para detecção dos sítios de hibridização é o indireto, no qual sondas com biotina são detectadas pela avidina, estreptavidina, extra-avidina ou anticorpo contra biotina conjugado com um fluoróforo. Já aquelas sondas com digoxigenina são comumente detectadas por anticorpo antidigoxigenina, conjugado com fluoróforo. Os fluorocromos mais comumente utilizados são isocianato de fluoresceína (FITC), com excitação azul a 495 nm e fluorescência de emissão verde a 523 nm, rodamina, Texas Red ou Cy3.5 (com excitação verde a 560 nm e fluorescência de emissão vermelha a 580 nm).

As lâminas devem ser montadas utilizando meio que reduza o desvanecimento para estabilizar os fluoróforos. As soluções devem ser estéreis para evitar contaminação, principalmente bacteriana.

As lâminas podem ficar armazenadas a 4 °C por anos após a FISH, se necessário, mas ocorre o desvanecimento da fluorescência. Muitas vezes, a coloração com DAPI pode ser recuperada por novo tratamento. Aquece-se a lâmina a 37 °C lava-se em tampão de detecção para remoção da lamínula e do meio de montagem e faz-se novo tratamento com DAPI, seguido de nova montagem.

10 Análises em microscopia de fluorescência e captação de imagens

10.1 Material

- Câmera CCD ou câmera digital monocromática.
- Filtros de fluorescência.
- Lâminas com amostra hibridizada.
- Microscópio de epifluorescência com opções de objetivas (20, 40, 63, 100X).
- Óleo de imersão.
- Papel de filtro.
- Programa para captação e análise de imagens.

10.2 Procedimento

1. Ligar a lâmpada ultravioleta e aguardar por 3 a 5 minutos para estabilização do feixe de luz.
 2. Abrir o programa de captação de imagens no modo de importação de imagens.
 3. Pegar a lâmina a ser observada, remover o excesso do meio de montagem entre a lâmina e a lamínula e inserir na platina do microscópio. Colocar filtro de fluorescência para DAPI (absorção 359 nm e emissão 461 nm) e objetiva de pequeno aumento (20X) para percorrer a lâmina e selecionar a área de interesse.
 4. Aumentar para objetiva 40X com óleo de imersão (confirmar se é necessário uso de óleo) e focalizar os núcleos interfásicos, cromossomos metafásicos ou paquitênicos.

Atenção, verificar se as objetivas são para uso com óleo de imersão. A maioria das objetivas dessa classe tem a indicação oi/ ou uma faixa preta na ponta.
 5. Alterar para objetiva 63X ou 100X, centralizar a área de interesse e focalizar os cromossomos usando ocular do microscópio.
 6. Fechar a passagem de iluminação fluorescente, alterar filtro de fluorescência para aquele correspondente ao fluorocromo a ser observado.
- Captação de imagens (por exemplo, com o programa Adobe Photoshop)**
7. Abrir passagem de iluminação fluorescente e escolher a área e objetiva para foto documentação e focalizar no monitor.
 8. Selecionar FILE → IMPORT → WIA SUPPORT.
 9. Determinar o tempo de exposição para captação da imagem azul (expresso em milissegundos) no quadro importação de imagens.

O tempo de exposição para captação da imagem em azul é de aproximadamente 2.000 milissegundos.

10. Ativar captação de imagens.
11. Alterar o filtro de fluorescência para fluorocromo verde, rever o foco e determinar o tempo de exposição para a captação de imagem (4 a 8 segundos). Ativar a captação de imagem novamente.
12. Alterar o filtro de fluorescência para o fluorocromo vermelho, rever o foco e determinar o tempo de exposição para captação (entre 0,5 e 2 segundos). Ativar a captação de imagens.
13. Fechar a passagem de iluminação para fluorescência e salvar cada imagem individualmente.

As imagens devem ser salvas com extensão TIFF ou PSD, descrevendo o experimento FISH.

14. Proceder à montagem das três imagens (azul, vermelha e verde) utilizando a imagem azul como base: selecionar toda a imagem vermelha (tecla CTRL+A), copiar (CTRL+C), e colar sobre azul (CTRL+V), que está no outro quadro.
15. Ativar o modo LAYERS e, no quadro abaixo, selecionar modo SCREEN no quadro de controle de camadas, canais e caminhos (*layers, channels e paths*, respectivamente).
16. Selecionar toda a imagem verde (tecla CTRL + A), copiar (CTRL + C), e colar sobre azul (CTRL + V), que está no outro quadro, já associada à imagem vermelha.
17. Ativar o modo LAYERS e, no quadro abaixo, selecionar modo SCREEN no quadro de controle de

camadas, canais e caminhos (*layers, channels e paths*, respectivamente).

18. Ativar o modo LAYER no menu principal, selecionar NEW ADJUSTMENT LAYER → LEVELS → OK para *Levels 1*.
19. Ajustar excesso de interferência (*background*) para o vermelho, selecionando RED no quadro que se abre imediatamente após o comando CHANNEL, e deslizar a seta branca do OUTPUT LEVELS toda para esquerda.
20. Repetir procedimento para o verde, selecionando GREEN no quadro (como na etapa 19 deste item) e salvar a imagem.

Imagens sobrepostas devem ser salvas em TIFF ou PSD, descrevendo o experimento FISH e que se trata da sobreposição de imagens dos diferentes canais.

21. Ativar *Levels 1*, selecionando com toque duplo no gráfico à esquerda no quadro de controle de camadas, canais e caminhos (*layers, channels e paths*).
22. Selecionar CHANNEL em RED e ajustar, com as três setas abaixo do gráfico, a melhor imagem vermelha, considerando a interferência (*background*) e a marcação fluorescente.
23. Repetir a etapa 22 para CHANNEL em GREEN e em BLUE.
24. Salvar nova imagem processada.

Lembrar-se de fazer uma cópia de segurança das imagens regularmente.

Captação de imagens (por exemplo, com software AxioVision, Zeiss)

25. No menu superior, selecionar ACQUISITION → SELECT CAMERA → AXIOCAM MRM (Mr3). Abrir WORK AREA → MULTIDIMENSIONAL ACQUISITION e optar pela subpasta MULTIDIMENSIONAL AQUISITION.

Uma janela abaixo da WORK AREA abrirá controles para aquisição de imagens em multicanais.

26. Na aba EXPERIMENT, escrever o nome do experimento em IMAGE NAME, incluindo, por exemplo, o tipo de amostra, sonda usada e outros descritores desejados. Selecionar SHOW PREVIEW AT START.

27. Selecionar aba C no painel de controles, selecionar o fluoróforo desejado da lista predefinida com seta ao lado do campo DYE.

Pode-se mudar a cor atribuída ao fluoróforo, para cores RGB puras, selecionando a seta em COLOR ou na palheta de cores.

28. Digitar o nome do canal escolhido em NAME (preferencialmente digitar o nome do fluorocromo em observação).

29. Para novo canal, selecionar DUPLICATE e repetir as etapas 28 e 29 deste item, para configurar um novo fluoróforo.

Adicionar o número de canais necessários para a observação, repetindo as etapas 28 e 29 deste item. Para salvar as configurações adicionadas, volte à aba EXPERIMENT e, no campo EXPERIMENT, selecione a opção SAVE. Para usar configurações salvas, selecione a opção REUSE.

30. Abrir a passagem de iluminação fluorescente e selecionar LIVE no *menu* superior. Quando a janela *pop-up* abrir com a imagem ao vivo, focalizar e/ou selecionar EXPOSE para ajuste da iluminação para cada objetiva.

31. Ajustar o brilho e o contraste da imagem utilizando os ícones inferiores de MAX/MIN, LINEAR ou BEST-FITE. Selecionar a objetiva e a câmera que estão sendo utilizadas no campo PIXEL (exemplo, 100X Mrm Axiop).

32. Na aba C, selecionar o canal 1, correspondente a DAPI.

33. No campo EXPOSE, marcar câmera e selecionar MEASURE. Uma janela *pop-up* se abrirá, mostrando tempo de exposição sugerido.

34. Focalizar mais uma vez os cromossomos no monitor. Ao selecionar OK, a janela se fechará.

Em geral, os valores automáticos são suficientes para capturar corretamente a imagem. Entretanto, podem-se alterar os valores de tempo de exposição manualmente, usando o cursor apresentado no campo.

35. Selecionar SNAP, no campo SETTINGS à esquerda, e a imagem será capturada.

36. Trocar o filtro de fluorescência do microscópio, selecionar o próximo canal na aba C (correspondente ao segundo fluoróforo a ser visualizado) no quadro à esquerda.

37. Repetir as etapas 34 a 36 deste item, para aquisição da imagem para cada fluoróforo a ser observado.

Cuidado para não alterar a posição na platina (eixos x e y), nem a focalização da amostra entre os canais.

38. Fechar passagem de ultravioleta no microscópio, fechar janelas LIVE e verificar a sobreposição das imagens selecionando ON no canto inferior da imagem adquirida.
39. Selecionar FILE → EXPORT no menu principal e SAVE IN da janela EXPORT da pasta de arquivos para salvar imagens. Selecionar CREATE PROJECT FOLDER e, no campo CHANNEL SELECTION, selecionar as opções GENERATE MERGED IMAGE(S), USE COLOR FOR CHANNEL IMAGES e USE CHANNEL NAMES.
40. Selecionar ALL no campo MODEL e *TIFF no campo FILE TYPE. Selecionar APPLY DISPLAY MAPPINGS, BURN-IN ANNOTATIONS, START e, depois, CLOSE.
41. No menu principal, selecionar FILE → SAVE AS e localizar a pasta criada com EXPORT da imagem para abrir. Selecionar *ZVI (AxioVision Image) no campo SAVE AS TYPE e SAVE.

Quando se salva na opção ZVI, todas as informações sobre a imagem ficam disponíveis. Porém, esse arquivo só abre no programa AxioVision da Zeiss, que pode ser baixado gratuitamente na versão LE no sítio da empresa.

Lembrar-se de fazer uma cópia de segurança das imagens regularmente.

10.3 Observações

Para definição dos filtros e fluorocromos, sugerem-se alguns endereços na internet: Chroma Technology Corp¹; Carl Zeiss do Brasil Ltda²; ou Leica Microsystems³.

¹ Disponível em: <<http://www.chroma.com>>.

² Disponível em: <<http://www.zeiss.de>>.

³ Disponível em: <<http://www.leica-microsystems.com>>.

Sítios de hibridização devem ser localizados em microscópio de epifluorescência, com lâmpada de vapor de mercúrio de 100 W. Diferentemente de DAPI, outros fluoróforos podem ser observados em fluorescência com lâmpada de halogênio. Filtros de fluorescência devem ser selecionados de acordo com os fluoróforos utilizados (consultar fabricante), e cada cor deve ser analisada separadamente. Câmeras CCD refrigeradas acopladas ao microscópio, juntamente com computador, são altamente recomendadas. Podem-se também utilizar câmeras CCD não refrigeradas ou câmeras fotográficas com negativo 35 mm, ASA/ISO 400 ou preto e branco. Veja exemplos de imagens de cromossomos após hibridização in situ na Figura 5.

É fundamental repetir o experimento e que todas as lâminas sejam avaliadas, pois pode ocorrer variação de sinais de hibridização entre lâminas que possuem preparações celulares distintas.

A presença de sítios de hibridização deve ser interpretada como presença de sequências de DNA-alvo com 80% a 90% de homologia com a sequência da sonda e presença de número suficiente de cópias naquela região do cromossomo que permita a visualização em microscopia. Já a ausência de sítios de hibridização não deve ser interpretada como inexistência da sequência complementar nos cromossomos, mas sim como ausência de detecção.

Processamentos excessivos de imagens devem ser evitados. A manipulação digital da imagem com a adição de interferência (*paint out*) ou qualquer outra mudança

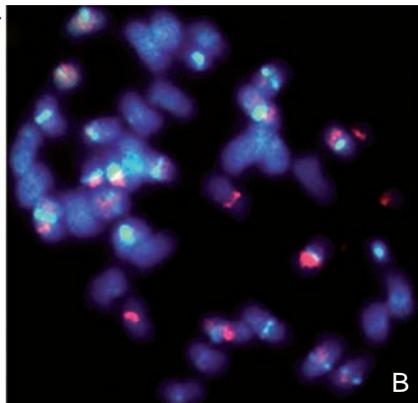
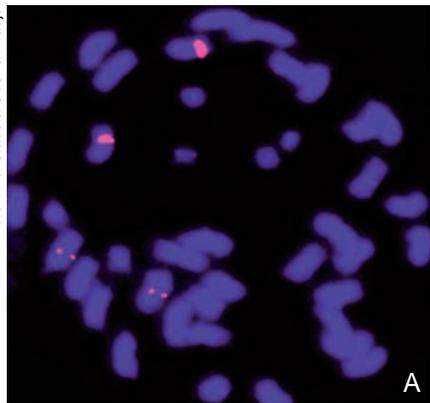


Figura 5. Micrografias de cromossomos após FISH. A) FISH em cromossomos metafásicos de *Arachis hypogaea*, usando sonda para hibridização com sítios de DNA ribossômico 45S (vermelho) em microscópio de epifluorescência. Cromossomos tratados com DAPI (azul). B) FISH em cromossomos metafásicos de *A. hypogaea*, usando duas sondas, clones da biblioteca BAC de *A. duranensis*: ADH0066I24 (verde) e ADH0063P06 (vermelho). Cromossomos tratados com DAPI (azul). Agradecimentos a Pat Heslop-Harrison e sua equipe do laboratório de citogenética da Universidade de Leicester, Inglaterra, onde essas imagens foram obtidas. C) FISH em cromossomos meióticos (paquíteno) de *Musa sp.*, usando duas sondas oriundas dos clones BAC MA4_11/M06 (vermelho) e MBP_32/N20 (verde).

(brilho/contraste, cor e filtros) deve ser aplicada em toda a imagem, uniformemente.

A utilização de microscópio confocal de varredura a laser é bastante interessante para análises de FISH, pois permite observação tridimensional da amostra, espessa ou inteira, com definição e sem efeito de desfoque.

11 Referências

CAPDEVILLE, G. D.; SOUZA JÚNIOR, M. T.; SZINAY, D.; DINIZ, L. E. C.; WIJNKER, E.; SWENNEN, R.; KEMA, G. H. J.; DE JONG, H. The potential of high-resolution BAC-FISH in banana breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, n. 3, p. 431-443, 2009.

DE JONG, H.; FRANSZ, P.; ZABEL, P. High resolution FISH in plants: techniques and applications. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, n. 7, p. 258-263, 1999.

DEVI, J.; KO, J. M.; SEO, B. B. FISH and GISH: modern cytogenetic techniques. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 4, p. 307-315, 2005.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 9, p. 1057-1068, 2006.

JIANG, J.; GILL, B. S. Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. **Genome**, Ottawa, v. 37, n. 5, p. 717-725, 1994.

JOHN, H. A.; BIRNSTIEL, M. L.; JONES, K. W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, London, v. 223, n. 5206, p. 582-587, 1969.

LANGER, P. R.; WALDROP, A. A.; WARD, D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC, v. 78, n. 11, p. 6633-6637, 1981.

MATZKE, A. J.; MATZKE, M. A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 2, p. 142-148, 1998.

NIELEN, S.; ALMEIDA, L. M.; CARNEIRO, V. T.; ARAUJO, A. C. G. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 23, n. 1, p. 45-51, 2010a.

NIELEN, S.; CAMPOS-FONSECA, F.; LEAL-BERTIOLI, S.; GUIMARÃES, P.; SEIJO, G.; TOWN, C.; ARRIAL, R.; BERTIOLI, D. FIDEL-a retrovirus-like retrotransposon and its distinct evolutionary histories in the A- and B-genome components of cultivated peanut. **Chromosome Research**, [London], v. 18, n. 2, p. 227-246, 2010b.

NIELEN, S.; VIDIGAL, B. S.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; RATNAPARKHE, M.; PATERSON, A. H.; GARSMEUR, O.; D'HONT, A.; GUIMARÃES, P. M.; BERTIOLI, D. J. *Matita*, a new retroelement from peanut: characterization and evolutionary context in the light of the *Arachis* A-B genome divergence. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 287, p. 21-38, 2011.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC, v. 64, n. 2, p. 600-604, 1969.

SCHILDKRAUT, C. L.; MARMUR, J.; DOTY, P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 3, n. 5, p. 595-617, 1961.

SCHWARZACHER, T. Fluorescent in situ hybridization to detect transgene integration into plant genomes. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 478, p. 227-246, 2009.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hybridization**. Oxford: The Genetical Society of Great Britain, 2000. v. 85, 203 p.

SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 2, p. 126-131, 2004.

TAGASHIRA, N.; PLADER, W.; FILIPECKI, M.; YIN, Z.; WIŚNIEWSKA, A.; GAJ, P.; SZWACKA, M.; FIEHN, O.; HOSHI, Y.; KONDO, K.; MALEPSZY, S. The metabolic profiles of transgenic cucumber lines vary with different chromosomal locations of the transgene. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Warsaw, v. 10, n. 4, p. 697-710, 2005.

VAIN, P.; JAMES, A.; WORLAND, B.; SNAPE, W. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6/7, p. 878-889, 2002.

Capítulo 14

Análise de RNA total e RNA interferente pela técnica *Northern blot*

Patrícia Messenberg Guimarães
Isabel Cristina Bezerra
Francisco José Lima Aragão

1 Introdução

A técnica *Northern blot* visa a detectar moléculas específicas de RNA em amostras complexas (ALWINE et al., 1977). Recebeu esse nome em referência à sua similaridade com a técnica de análise de DNA, *Southern blot* (Capítulo 12), previamente desenvolvida pelo cientista Edwin Southern (SOUTHERN, 1975). A técnica *Northern blot* é muito utilizada na análise da expressão de RNA de genes específicos em amostras de tecido ou tipo de célula em particular, na determinação do tamanho de um determinado mRNA transcrito, na detecção de variantes funcionais e/ou transcritos oriundos de *splicing* alternativos e, mais recentemente, na detecção de micro RNAs (VÁLÓCZI et al., 2004). A técnica também é amplamente utilizada na detecção e no monitoramento da expressão gênica de transgenes em plantas geneticamente modificadas (WU et al., 2009). Atualmente, análises de *Northern blot* têm sido muito empregadas na detecção de pequenos fragmentos de RNA interferentes (siRNA) em plantas geneticamente modificadas, visando ao silenciamento de genes endógenos ou de genes de microrganismos que interagem com a planta (BONFIM et al., 2007). Neste último caso, a técnica *Northern blot* pode ser utilizada tanto para detectar siRNA nas plantas, quanto nos organismos associados a estas, que apresentam silenciamento de genes endógenos ou mesmo de transgenes (TINOCO et al., 2010).

Apesar da existência de técnicas mais modernas e sensíveis como RT-qPCR (transcrição reversa do RNA por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo

real; Capítulo 15) e arranjos de DNA (Capítulo 16), a detecção e quantificação de mRNAs específicos pela técnica *Northern blot* ainda é amplamente utilizada, principalmente devido a seu baixo custo, praticidade e possibilidade de comparação da abundância de determinado mRNA entre diferentes amostras em uma única membrana (STREIT et al., 2009). Além disso, a hibridização por *Northern blot* é extremamente versátil, utilizando-se sondas radioativas ou não isotópicas, que podem ser compostas por oligonucleotídeos, e ter homologia total ou parcial com as amostras imobilizadas (por exemplo, cDNA de uma espécie diferente ou fragmentos genômicos que podem conter íntrons). O *Northern* reverso é uma alternativa da técnica quando se faz necessária a seleção de uma sequência, dentre uma coleção ou biblioteca de cDNA imobilizada na membrana, utilizando-se como sonda marcada o RNA total.

A técnica *Northern blot* em si é bastante simples e possibilita a verificação de seu progresso em vários pontos (por exemplo, integridade do RNA total e eficiência de sua transferência para a membrana). O procedimento consiste basicamente na desnaturação e na separação de moléculas de RNA por meio de eletroforese, seguidas da transferência do RNA para uma membrana, na qual ele é imobilizado e hibridizado com uma sonda marcada. No entanto, alguns cuidados se fazem necessários durante todo o processo, pois, se as amostras de RNA estiverem, mesmo que parcialmente, degradadas, a qualidade do resultado e a capacidade de quantificar a expressão de uma determinada molécula são extremamente prejudicadas. Portanto, o uso de reagentes, vidrarias e aplicação de técnicas que eliminem

as ribonucleases (RNAses), enzimas que degradam o RNA, são essenciais em todas as etapas do procedimento.

Atualmente, vários métodos e suas adaptações são utilizados na extração de RNA total de plantas; além disso, vários kits comerciais já foram desenvolvidos com essa finalidade. No entanto, dois métodos que utilizam agentes desnaturantes fortes são mais adotados em função de seu custo e praticidade: o fenol associado ao cloreto de lítio (LiCl) e o isotiocianato de guanidina. Esses métodos são eficientes porque rompem as células e, simultaneamente, inativam as RNAses, permitindo um grau de integridade elevado após cada preparação. O método de extração com fenol, seguido de precipitação com etanol e cloreto de lítio (BERGER, 1987), é dividido em duas fases: a) lise das células, remoção de proteínas por extração com fenol/clorofórmio/SDS com simultânea inibição de atividade das ribonucleases presentes no tecido; b) separação de RNA do DNA e outros componentes por precipitação seletiva usando cloreto de lítio. Já o método do isotiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987) utiliza uma mistura aquosa contendo fenol, clorofórmio e um potente agente desnaturante (isotiocianato de guanidina) durante a lise celular e a separação de fases por centrifugação, resultando no acúmulo do RNA na fase superior aquosa, enquanto o DNA e as proteínas ficam, respectivamente, retidos na interfase e na fase orgânica. O RNA é então recuperado da fase aquosa por meio de precipitação com etanol ou álcool isoamílico.

Após o isolamento do RNA total, a separação das moléculas que o compõem é realizada por eletroforese

em gel de agarose. O comportamento eletroforético do RNA total é influenciado pelo seu tamanho, carga e pela estrutura secundária da molécula, portanto, para eliminar as diferenças causadas pela conformação da molécula de RNA, a eletroforese é feita em géis contendo agentes desnaturantes (formaldeído, glioxal/DMSO ou hidróxido de metil mercúrio) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A transferência do RNA para membrana pode ser feita por capilaridade, por vácuo ou por campo elétrico, sendo as duas primeiras as mais usadas. A transferência por capilaridade é facilmente realizada por não requerer equipamentos especiais, e a taxa de transferência depende do tamanho das moléculas de ácidos nucleicos a serem transferidas. A transferência a vácuo é mais eficiente e rápida do que as outras, levando de 30 minutos a 1 hora, no máximo, para ser efetuada. Atualmente, a membrana de náilon é a mais utilizada, pois apresenta alta capacidade de ligação com ácidos nucleicos, incluindo fragmentos de pequeno tamanho, e permite eficiente remoção de sondas, possibilitando novas hibridizações. Algumas membranas apresentam uma camada adicional de carga positiva em sua superfície, aumentando ainda mais sua capacidade de ligação ao ácido nucleico (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O RNA total é imobilizado na membrana por meio de exposição à luz ultravioleta ou solução alcalina, segundo modelo e fabricante da membrana.

A hibridização é a etapa em que o RNA, já imobilizado na membrana, tem contato com a sonda marcada em solução. A sonda a ser utilizada pode ser de DNA, cDNA ou RNA de fita simples ou dupla, radioativa ou não

(Capítulo 11). A hibridização da sonda ao RNA complementar se dá em condições determinadas de estringência que permitem pareamento de sequências com diferentes graus de homologia. Essas condições de estringência podem ser alteradas de acordo com a concentração de sal e/ou temperatura de hibridização. Antes da hibridização propriamente dita, deve-se proceder à pré-hibridização, de maneira a bloquear ligações inespecíficas da sonda à superfície da membrana durante a hibridização. Para tal, pode-se utilizar uma série de agentes bloqueadores, e o mais utilizado é uma mistura da solução de Denhardt (DENHARDT, 1966), que contém albumina de soro bovino (BSA) e polímeros de alto peso molecular (Ficoll e PVP), com fragmentos desnaturados de DNA de esperma de salmão, de levedura ou de timo de boi, que se ligam inespecificamente à membrana (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As soluções de pré-hibridização e de hibridização também contêm SDS, que é um surfactante que reduz a ligação não específica da sonda, e uma solução salina (SSC ou SSPE), para fornecer a estringência desejada à hibridização.

Os métodos de hibridização baseiam-se na habilidade que os ácidos nucleicos apresentam de anelar-se, na presença de sequências complementares, sob determinadas condições. A formação de híbridos de ácidos nucleicos é um processo reversível, cuja estabilidade é afetada por alguns parâmetros que permitem a determinação de condições adequadas para a hibridização. Uma medida da estabilidade de um dúplex de ácido nucleico é a sua temperatura de desnaturação, *melting temperature* (T_m), correspondente ao ponto exato de transição entre

a forma de fita dupla e fita simples. A energia requerida para separação das duas fitas é afetada pela força iônica, pela composição de bases (% GC), pelo tamanho do híbrido em pares de base (L), e pela concentração de agentes desestabilizadores do dúplex, por exemplo, a formamida. A estabilidade dos híbridos de RNA-RNA é maior do que a dos de RNA-DNA, que, por sua vez, é maior do que a dos de DNA-DNA. A T_m ideal para formação de híbridos perfeitos de DNA, RNA ou utilizando oligonucleotídeos como sonda está descrita na Tabela 1 (STRACHAN; READ, 1999). Geralmente escolhe-se como a temperatura ideal de hibridização aquela que promove a formação de fitas duplas a 25 °C abaixo da T_m , conforme as seguintes equações da Tabela 1.

Tabela 1. Equações para determinação da temperatura ideal de hibridização.

Híbridos	T_m (°C)
DNA-DNA	$81,5 + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\%GC) - 500/L$
DNA-RNA ou RNA-RNA	$79,8 + 18,5 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,58 (\%GC) + 11,8 (\%GC)^2 - 820/L$
oligo-DNA ou oligo-RNA	< 20 nucleotídeos: $2 (I_n)$ 20–35 nucleotídeos: $22 + 1,46 (I_n)$

Nota: O Na^+ nas expressões pode ser substituído por outro cátion monovalente, a 0,01–0,4 M; A % de GC deve ser de 30% a 75%. L = comprimento do dúplex em pares de base; oligo-DNA ou oligo-RNA = oligonucleotídeo; I_n = tamanho efetivo do iniciador (*primer*) = $2 \times (n^\circ \text{ de G} + \text{C}) + (n^\circ \text{ de A} + \text{T})$. Para cada 1% de formamida, a T_m é reduzida em cerca de 0,6 °C, enquanto a inclusão de ureia a 6 M reduz a T_m em 30 °C.

Fonte: baseado em Strachan e Read (1999).

A cinética de reassociação é um termo utilizado para medir a velocidade com que moléculas complementares de fita simples encontram-se umas às outras para formar fitas-duplas. Geralmente realiza-se a hibridização por até três vezes o tempo, em horas, necessário para atingir 50% de híbridos ($3 \times T_{50}$). Após este tempo de hibridização, a quantidade de sonda disponível é insignificante (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em geral, para se determinar o tempo necessário de hibridização de uma determinada sonda, usa-se a seguinte fórmula:

$$T_{50} = 1/x \cdot y/5 \cdot z/10,$$

em que:

T_{50} = tempo, em horas, necessário para atingir 50% de híbridos.

x = peso (em μg) da sonda adicionada na reação.

y = complexidade da sonda (tamanho em kb).

z = volume da reação (mL).

Essa cinética é também dependente da temperatura de hibridização e da concentração de cátions monovalentes na solução. Dessa forma, usualmente utilizam-se esses parâmetros fixos, com temperatura a 65°C e concentração de Na^+ de $0,3\text{ M NaCl}$.

Após a hibridização, a membrana é lavada para remover ligações inespecíficas entre a sonda e o RNA fixado na membrana e retirar o excesso de sonda. As

lavagens devem ser realizadas com a maior estringência possível, isto é, a combinação da temperatura e da concentração de sal deve ser de 12°C a 20°C abaixo do T_m do híbrido em questão. A temperatura e condições iônicas podem também ser determinadas empiricamente em experimentos preliminares. A homologia relativa entre as sequências da sonda e do alvo é também um parâmetro determinante; homologia de 100% permite a utilização de altas temperaturas (65°C a 75°C). Caso a homologia seja menor, deve-se proceder às lavagens em temperaturas mais baixas, iniciando-se entre 37°C e 40°C , aumentando-se até que as ligações não específicas (*background*) não interfiram nos resultados. Outro fator importante é o tamanho da sonda. Quando são pequenas (menores que 100 pb), devem ser lavadas a temperaturas mais baixas, mesmo que apresentem 100% de homologia com o alvo.

Entre os sistemas de marcação e detecção de sondas não radioativas mais usados estão os sistemas digoxigenina-antidigoxigenina (DIG-antiDIG) e biotina-estreptoavidina, entre outros. Os híbridos formados entre os transcritos e a sonda podem ser detectados tanto por substrato cromogênico (colorimétrico) quanto por substrato quimioluminescente para a enzima envolvida no sistema (KARCHER, 1994) e são visualizados por meio de autorradiograma ou reação colorimétrica.

No presente capítulo, descreve-se a metodologia de isolamento de RNA pelos métodos de Fenol-LiCl e Fenol-isotiocianato de guanidina; a quantificação de RNA; eletroforese em gel desnaturante e gel de acrilami-

da para análise de siRNA; transferência e fixação de RNA em membrana; e hibridização com sonda radioativa e não radioativa (sistema DIG-antiDIG). O preparo da sonda a ser utilizada está descrito no Capítulo 11.

2 Isolamento de RNA total (Método do Fenol-LiCl)

2.1 Material

Preparação do material

O material utilizado para isolamento de RNA (vidrarias e material plástico), deve ser estéril e sem RNAses exógenas. Durante as manipulações com RNA, devem-se sempre usar luvas, trocando-as quando houver contato com superfícies e/ou material não tratado com dietil pirocarbonato (DEPC) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A vidraria a ser usada deve ser aquecida a 180 °C por no mínimo 8 horas. Como alternativa, podem-se tratar a vidraria e o material plástico com DEPC 0,1% (v/v), enxaguando em água previamente tratada com DEPC, e esterilizando em seguida em autoclave por 20 minutos a 120 °C.

Soluções

Todas as soluções, com exceção de Tris-HCl e solventes orgânicos, devem ser tratadas com DEPC, forte inibidor de RNAses.

- Acetato de sódio 3 M, pH 4,5 (Apêndice 4).

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Cloreto de lítio 4 M (Apêndice 4).
- EDTA 500 mM (Apêndice 4).
- Etanol absoluto: separar um frasco de etanol somente para trabalhos com RNA e guardá-lo a -20 °C.
- Etanol 70% (v/v) em água DEPC 0,1%. Guardar a -20 °C.
- Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Apêndice 4).



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Nitrogênio líquido.
- SDS 20% (Apêndice 4).

- Tampão de extração NTES:

Componente	Volume	Concentração final
NaCl 5 M	2 mL	0,1 M
Tris-HCl 1 M pH 7,5	1 mL	0,01 M
EDTA 500 mM	200 µL	1 mM
SDS 20%	5 mL	1%
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 100 mL	

O tampão NTES deve ser preparado pouco antes do uso, adicionando-se o SDS por último, e estocado à temperatura ambiente (para evitar precipitação do SDS).

- Tris-HCl 1 M, pH 7,5 (Apêndice 4).

2.2 Procedimento

1. Coletar as amostras de partes de plantas a serem analisadas em tubos de centrífuga ou papel alumínio (sem RNAses exógenas). Congelar o mais rapidamente possível, em nitrogênio líquido. Proceder imediatamente à metodologia ou guardar a -80 °C.

Usar luvas durante a coleta de amostras e proceder rapidamente ao congelamento a fim de inibir a ação de RNAses endógenas.

2. Pesar 2 g de amostra congelada e macerar em almofariz, previamente resfriado com nitrogênio líquido, até obter-se um pó fino.

Deve-se manter o tecido congelado durante a maceração adicionando-se nitrogênio líquido sempre que necessário.

3. Distribuir 6 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 9 mL de tampão NTES em tubos de centrífuga de 50 mL e resfriar a 4 °C. Adicionar o pó das amostras com ajuda de uma espátula, tampar bem e agitar vigorosamente durante 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 10.000 g por 10 minutos.
5. Coletar cuidadosamente a fase aquosa (superior) com auxílio de pipeta. Transferir para novo tubo.

Os tubos devem ser previamente resfriados, e as amostras, a partir deste passo, mantidas sempre no gelo.

6. Adicionar 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 4,5) e 2 volumes de etanol absoluto (-20 °C). Homogeneizar e incubar a -20 °C por, no mínimo, 1 hora.
7. Centrifugar a 10.000 g por 15 minutos. Descartar o sobrenadante.

O sedimento geralmente apresenta um halo gelatinoso ao seu redor que corresponde ao RNA.

8. Dissolver o sedimento em 2,5 mL de água DEPC 0,1%, previamente resfriada.
9. Adicionar 2,5 mL de LiCl 4 M e incubar a 4 °C por, no mínimo, 3 horas.
10. Centrifugar a 10.000 g por 15 minutos e descartar o sobrenadante.
11. Ressuspender o sedimento em 1,8 mL de água DEPC 0,1%, previamente resfriada.

O sedimento deve apresentar-se translúcido e com aspecto gelatinoso. O RNA é facilmente ressuspensionado em água.

12. Adicionar 0,2 mL de acetato de sódio 3 M e 4 mL de etanol (-20 °C). Deixar precipitando a -20 °C durante, no mínimo, 1 hora.
13. Centrifugar a 10.000 g por 20 minutos e descartar o sobrenadante.
14. Adicionar 5 mL de etanol 70% e centrifugar durante 3 minutos a 10.000 g. Descartar cuidadosamente o etanol.

O etanol 70% retira o excesso de sal precipitado junto com o RNA.

15. Ressuspender o sedimento em 200 µL de água DEPC 0,1% resfriada.
16. Quantificar o RNA por meio de leitura espectrofotométrica.

A concentração de RNA é dada pela fórmula: $[RNA] = 40 \mu\text{g/mL} \times F. \text{dil.} \times A_{260}$, em que F.dil. é o fator de diluição do RNA. Após quantificar o RNA, estimar sua pureza (ver seção 3).

2.3 Observações

Deve-se armazenar o RNA isolado na forma precipitada, em acetato de sódio 0,3 M e etanol absoluto, a -80 °C.

A pureza do RNA pode ser estimada pela razão A_{260}/A_{280} na amostra. Uma preparação de RNA puro apresenta razão em torno de 2,0. Razão menor significa contaminação com proteínas, devendo-se proceder a outras extrações

com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e nova precipitação com etanol. Uma razão maior que 2,0 indica contaminação com fenol, devendo-se proceder à outra precipitação com etanol. Leitura no comprimento de 230 nm significa presença de sujeira na cubeta, e valores altos de leitura no comprimento de 310 nm indicam presença de fenol na preparação, devendo-se proceder à nova precipitação do RNA.

Para a análise de siRNA, podem-se utilizar kits disponíveis comercialmente para o isolamento de RNA total. Entretanto, para alguns tecidos, como sementes em estágios de maturação ou secagem, o método de isolamento com cloreto de lítio provê maiores quantidades de RNA.

3 Isolamento de RNA total – Método do fenol-isotiocianato de guanidina

3.1 Material

Preparação do material

A esterilização de todo o material e os cuidados na manipulação das amostras devem seguir as recomendações descritas para o método anterior (seção 2.1 Material).

Soluções

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Clorofórmio.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Etanol a 75% (v/v) em água DEPC 0,1%. Guardar a -20°C .
- Isopropanol.
- Nitrogênio líquido.
- Reagente de lise monofásico (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina). Consultar o item 3.3 Observações.
- Solução salina contendo citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,8 M e cloreto de sódio (NaCl 1,2 M).

Utilizar a solução salina apenas para tecidos com altos níveis de polissacarídeos e glicoproteínas.

3.2 Procedimento

1. Após a coleta das amostras, como descrito no item 2.2 (Procedimento), pesar aproximadamente 250 mg de material vegetal e macerar em almofariz, previamente resfriado com nitrogênio líquido, até obter um pó fino. O material deve ser mantido congelado durante todo o processo de maceração.
 2. Transferir o equivalente a 1 mL do material macerado obtido para tubos do tipo Falcon de 15 mL, previamente congelados, e mantê-los em suporte flutuante no nitrogênio líquido até o próximo passo.
- O protocolo do reagente TRIzol usa a proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de solução. Entretanto, o protocolo mostrou também boa eficiência na proporção de 2 g para 10 mL de TRIzol.
3. Adicionar 2,5 mL do reagente de lise monofásico. Misturar imediatamente em agitador do tipo Vortex até a homogeneização do material. Após esta etapa, o material pode ficar à temperatura ambiente ou ser armazenado para continuação do processo de isolamento do RNA total posteriormente.
 4. Centrifugar as amostras a 8.000 g por 10 minutos a 4°C e transferir a fase aquosa (superior) para novo tubo.
 5. Repetir a etapa 4 deste item.
 6. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
 7. Adicionar a cada amostra 500 μL de clorofórmio e misturar em agitador do tipo Vortex a fim de se obter uma boa homogeneização.
 8. Incubar à temperatura ambiente por 12 minutos.
 9. Centrifugar a 8.000 g por 15 minutos a 4°C e, com a ajuda de uma pipeta, transferir, cuidadosamente, 500 μL da fase aquosa (superior) para um microtubo de 1,5 mL.
 10. Adicionar 600 μL de isopropanol.

No caso de tecidos com altos níveis de polissacarídeos ou glicoproteínas, utilizar 300 µL de solução salina contendo citrato de sódio 0,8 M e NaCl 1,2 M e 300 µL de isopropanol.

11. Agitar a amostra manualmente a fim de obter a homogeneização.
12. Deixar os tubos à temperatura ambiente por 10 minutos.
13. Centrifugar a 13.000 *g* por 10 minutos à temperatura ambiente.

No caso de tecidos muito ricos em polissacarídeos ou glicoproteínas, centrifugar a 4 °C.

14. Descartar o sobrenadante.
15. Adicionar 1 mL de etanol 75% a cada amostra e agitar rapidamente para que o precipitado seja solto da parede do tubo.
16. Centrifugar a 13.000 *g* por 5 minutos à temperatura ambiente.

No caso de tecidos muito ricos em polissacarídeos ou glicoproteínas, centrifugar a 4 °C.

17. Descartar o sobrenadante.
18. Centrifugar por 5 segundos as amostras para levar ao fundo do tubo qualquer resíduo de etanol que tenha ficado aderido à parede.
19. Retirar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta e deixar secar o precipitado à temperatura ambiente, por 5 minutos.

20. Ressuspender o precipitado em 10 µL a 50 µL de água ultrapura e sem RNase.

21. Colocar as amostras no banho seco a 55 °C por 10 minutos para acelerar a ressuspensão.

22. Guardar no congelador a -20 °C ou a -80 °C.

3.3 Observação

A composição específica da solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina não foi publicada. No entanto, existem vários produtos comerciais que são compostos de soluções monofásicas contendo fenol, guanidina ou tiocianato de amônio e agentes solubilizantes. Quando utilizar o produto comercial, recomenda-se seguir o protocolo do fabricante, que pode variar ligeiramente em relação ao protocolo anteriormente descrito.

4 Eletroforese de RNA em gel desnaturante

4.1 Material

Sempre que possível, devem-se utilizar cubas, suportes e pentes exclusivos para eletroforese de géis de RNA. As cubas, suportes e pentes para eletroforese de géis de RNA devem ser tratados previamente com solução detergente (por exemplo, SDS 2% p/v ou detergente comum) e enxaguados com água DEPC 0,1%.

- Agarose sem RNase.
- Água DEPC 0,1% (item 2.1 Material).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Brometo de etídio 0,1% (p/v) (Apêndice 4).



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Formaldeído 37% (v/v).



Formaldeído é considerado provável agente mutagênico e altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Formamida deionizada: a formamida é deionizada usando resina Dowex XG-8. Após preparo, guardar a -20 °C.



Formamida é altamente tóxica por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão de amostra 10X para eletroforese (Apêndice 4).

- Tampão MOPS 10X (1.000 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
MOPS	41,85 g	0,2 M
Acetato de sódio triidratado	6,80 g	50 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,72 g	10 mM
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 1.000 mL	

Homogeneizar a solução e ajustar o pH para 7,0. Esterilizar em autoclave e guardar em frasco escuro a 4 °C.

4.2 Procedimento

Preparação de gel desnaturante

1. Dissolver a agarose em água: 0,56 g em 33,75 mL de água DEPC 0,1%, para minigel de 50 mL, ou 2,25 g em 135 mL de água DEPC 0,1%, para gel grande de 200 mL.
2. Fundir a agarose em banho-maria ou forno de micro-ondas. Medir o volume da solução em proveta e completar com água, se necessário.
3. Adicionar o MOPS 10X e, após resfriamento, quando a solução estiver em torno de 55 °C, adicionar formaldeído, na proporção indicada abaixo. Homogeneizar em capela de exaustão.

Reagente	Minigel	Gel grande
Agarose	0,56 g	2,25 g
MOPS 10X	5 mL	20 mL
Formaldeído 37%	6,65 mL	26,6 mL
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 50 mL	200 mL

4. Verter a solução no suporte para solidificar.

Deve-se evitar a formação de bolhas de ar no gel, vertendo lentamente a solução.

Preparo das amostras e eletroforese

5. Preparar as amostras de RNA de acordo com o volume a ser aplicado no gel.

Reagente	Minigel	Gel grande
RNA diluído em água	7,5 µL	12 µL
DEPC 0,1%	(10 µg a 20 µg)	(20 µg a 30 µg)
Formamida deionizada	14,5 µL	25 µL
MOPS 10X	3 µL	5 µL
Formaldeído	5 µL	8 µL
Volume da amostra	30 µL	50 µL

Para a análise da expressão relativa de um determinado gene após hibridização (seções 6 e 7), é essencial que a mesma quantidade de RNA total (10 µg a 30 µg) de cada amostra seja depositada no gel.

6. Colocar o gel solidificado em cuba contendo tampão MOPS 1X, preparado pouco antes de usar.

Antes de colocar o gel na cuba, conectar os fios e testar se a fonte fornece a corrente desejada.

7. Desnaturar as amostras por 5 minutos a 65 °C e, em seguida, colocar imediatamente no gelo.

O RNA é aquecido para que estruturas secundárias sejam rompidas, linearizando-se, de forma que possa ser separado por tamanho após a eletroforese.

8. Adicionar 1/10 do volume de tampão de amostra 10X e 1 µL de brometo de etídio 0,1%.
9. Aplicar as amostras no gel e cobrir a cuba para evitar evaporação de formaldeído.

10. Ligar a fonte de eletroforese e aplicar corrente de 80 V por, no máximo, 15 minutos (até as amostras entrarem nos poços), passando para 60 V em seguida.

11. Fotografar o gel ao final da corrida.

Se o RNA estiver puro, intacto e não degradado, ele poderá ser visualizado como apresentado na Figura 1.

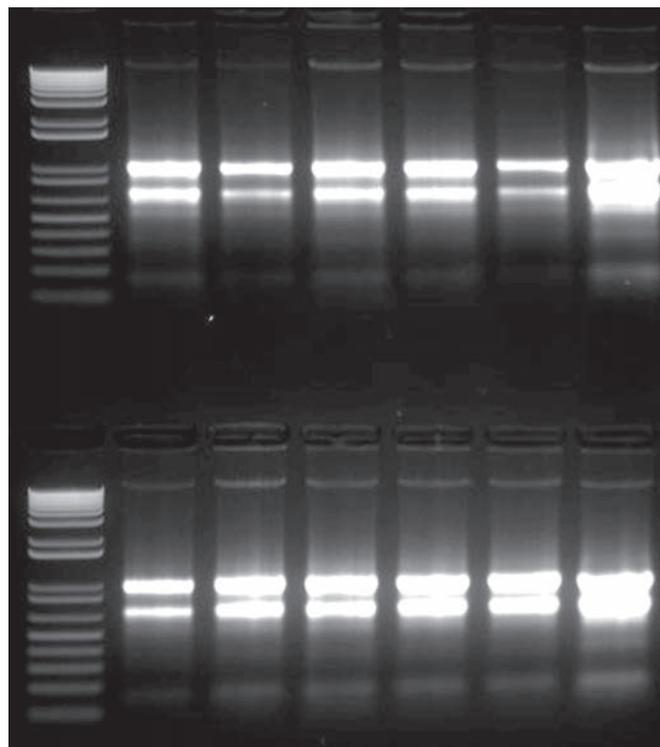


Foto: Andressa da Cunha Quintana Martins

Figura 1. Gel de agarose 1% (p/v), após eletroforese em tampão TBE 1X, contendo RNA total de amostras de raízes de *Arachis stenosperma* extraído pelo método do fenol-isotiocianato de guanidina.

4.3 Preparação do gel de acrilamida para análise de siRNA

1. Preparar a acrilamida, misturando 19 g de acrilamida a 1 g bisacrilamida (proporção de 19:1) em 50 mL de água.
2. Em seguida, para preparar o gel de acrilamida 20%, usar:

Reagente	Quantidade
TBE 5X (Apêndice 4)	3,0 mL
Mistura acrilamida e bisacrilamida	7,5 mL
Ureia	6,3 g
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 15 mL

3. Dissolver completamente e adicionar 120 μ L de persulfato de amônio 10% (p/v) e 16 μ L de TEMED.
4. Misturar a solução rapidamente, adicionar ao molde do gel na cuba e colocar o pente.
5. Deixar polimerizar por 30 minutos a 1 hora.
6. Preparar o tampão de amostra:

Componente	Quantidade	Concentração final
Glicerol (100%)	3,7 mL	37%
Azul de bromofenol	2,5 μ g	0,025%
Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (Apêndice 4)	200 μ L	20 mM
EDTA 500 mM (Apêndice 4)	100 μ L	5 mM
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 10 mL	

Em alguns casos, há a necessidade de aumentar a concentração de glicerol na amostra. Isso pode ser feito adicionando-se 3 mL a 4 mL de glicerol 100% às amostras já prontas para serem aplicadas ao gel.

7. As amostras de RNA são preparadas para terem 50 μ L de RNA total no tampão de amostra.
8. A eletroforese deve ser realizada em TBE 1X a 250 V e 60 mA nos primeiros 20 minutos e, depois, a 200 V e 40 mA por 45 minutos. As condições elétricas são dependentes do equipamento a ser utilizado. O azul de bromofenol do tampão de amostra deve atingir 3/4 do comprimento do gel.
9. Em seguida, o gel deve ser corado em uma solução de brometo de etídio 1 μ g/mL por 15 minutos. Após esse tempo, o gel deve ser fotografado (Figura 2).

Deve-se ter o cuidado de fotografar o gel juntamente com uma régua milimetrada. Isso é importante para que se possa posicionar o marcador na membrana, após a revelação.

Pode-se usar um marcador de RNA de baixa massa molecular ou podem-se, também, utilizar iniciadores (*primers*) como marcadores. Em geral, utiliza-se uma mistura de 1 ng de cada iniciador com tamanhos entre 40 e 18 nucleotídeos.

5 Transferência e fixação de RNA em membrana

5.1 Material

A transferência de RNA para membrana é feita imediatamente após a eletroforese, pois o gel já é desnaturante.

- Membrana de náilon N+ (GE).

Membranas carregadas positivamente (N+) devem seguir o protocolo de transferência alcalina.

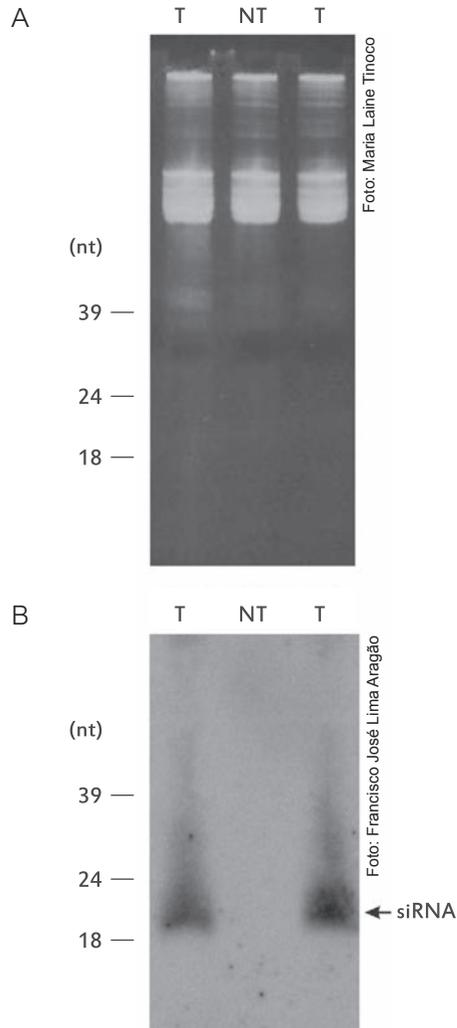


Figura 2. Análise pela técnica de *Northern blot* para detecção de siRNA. Em A, tem-se o gel de acrilamida corado com brometo de etídeo mostrando mRNA, tRNA e rRNA. Em B, tem-se a detecção dos siRNA com sonda radioativa. Os marcadores estão mostrados à esquerda em número de nucleotídeos (nt).

- Papel de filtro.
- Papel-toalha.
- SSC 20X para RNA (1.000 mL) (Apêndice 4).

5.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 3.

1. Retirar o excesso de gel sob luz ultravioleta e manter o gel em tampão.
2. Recortar o papel de filtro (seis pedaços), a membrana e o papel-toalha do mesmo tamanho do gel.
3. Colocar três folhas de papel de filtro embebidas em SSC 20X sobre uma bandeja, evitando a formação de bolhas.
4. Para transferência alcalina, deve-se lavar o gel em água DEPC 0,1% e embeber o gel por 20 minutos em 5 volumes de uma mistura de 0,01 N de NaOH e 3 M de NaCl.
5. Colocar a face superior do gel invertida sobre o papel.

O RNA está mais próximo da face inferior.

6. Justapor a membrana sobre o gel cuidadosamente, retirando bolhas de ar e fazendo um pequeno corte para marcar um lado da membrana.
7. Colocar três folhas de papel de filtro embebidas em 20X SSC sobre a membrana, evitando bolhas.

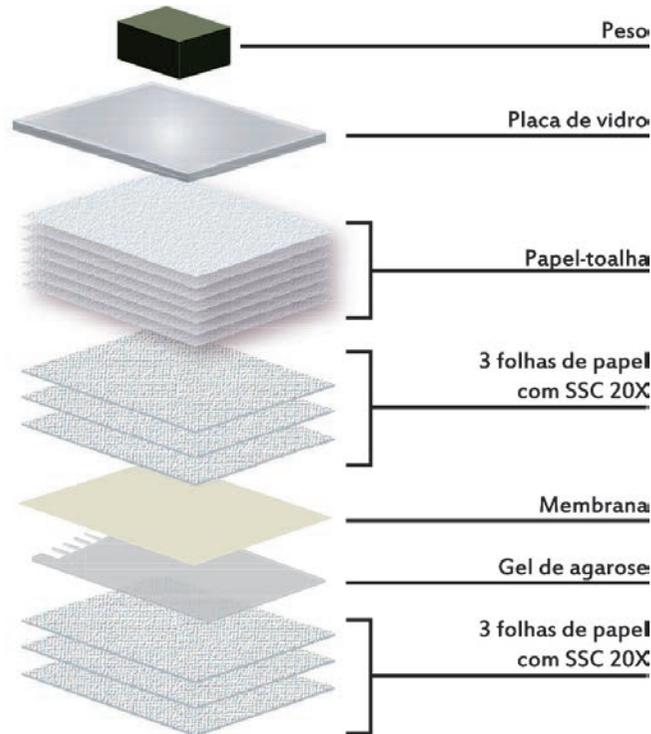


Figura 3. Sistema de transferência de RNA para membrana.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

8. Justapor uma camada de papel-toalha (4 cm a 5 cm de altura).
9. A fim de homogeneizar a pressão sobre o sistema, colocar uma placa de vidro e um peso de 1 kg a 2 kg sobre a placa.

10. Deixar transferir por 12 a 16 horas (durante a noite toda).
11. Desfazer o sistema, marcando o lugar dos poços com lápis, na membrana, e fazer um corte em um dos lados da membrana para saber sua orientação posteriormente.
12. Retirar a membrana com uma pinça. Colocar em forno a 80 °C com vácuo durante 2 horas.

Como alternativa, o RNA pode ser fixado à membrana por meio de irradiação ultravioleta (254 nm por 1 minuto e 45 segundos a 1,5 J/cm²) ou de acordo com a descrição do fabricante da membrana. As membranas carregadas positivamente dispensam essa etapa de fixação.

13. Cobrir com plástico (PVC) e guardar a 4 °C ou proceder à hibridização.
14. Fotografar a membrana sob luz ultravioleta.
15. Utilizar a membrana para hibridização com sonda radioativa (seção 6) ou não radioativa (seção 7).

5.3 Observação

Para análise de siRNA, tanto o gel quanto a membrana de náilon (usualmente carregada positivamente) devem ser equilibrados por 15 minutos em TBE 0,5X (Apêndice 4). A transferência deve ser realizada, preferencialmente, em equipamento elétrico de forma semiseca.

6 Hibridização com sonda radioativa

6.1 Material

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- DNA de espermatozoides de salmão (4 mg/mL).
- Formamida.
- SDS 20% (Apêndice 4).
- Solução Denhardt 50X para RNA (Apêndice 4).
- Solução de pré-hibridização para análise de siRNA (25 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Na ₂ HPO ₄	1,77 g	0,5 M
500 mM EDTA	50 µL	1 mM
BSA	0,25 g	1%
SDS	1,75 g	7%
Água		q.s.p. 25 mL

- Solução de pré-hibridização para RNA (25 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X para <i>Northern blot</i>	6,25 mL	5X
Solução Denhardt 50X para RNA	1 mL	2X
SDS 20%	125 µL	0,1%
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 25 mL	

Preparar a solução colocando o SDS por último. Caso haja precipitação de SDS, aquecer e homogeneizar.

- Solução de pré-hibridização para RNA (25 mL) contendo formamida:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSPE 20X para <i>Northern blot</i>	6,25 mL	5X
Formamida	12,5 mL	50%
Solução Denhardt 50X para RNA	1 mL	2X
SDS 20%	125 µL	0,1%
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 25 mL	

Preparar a solução colocando o SDS e a formamida por último, na capela de exaustão.

- Sonda marcada radioativamente (Capítulo 11).
- SSC 20X para RNA (Apêndice 4).
- SSPE 20X para RNA (Apêndice 4).

6.2 Procedimento

Pré-hibridização

1. Preaquecer a solução de pré-hibridização a 42 °C. Usar 20 mL de solução por 100 cm² de membrana. Colocar a membrana em um recipiente (frasco para forno de hibridização, caixa ou saco plástico vedado).

A solução de pré-hibridização pode ser preparada sem formamida. Nesse caso, as temperaturas de pré-hibridização e hibridização deverão ser de 65 °C, em vez de 42 °C.

2. Desnaturar DNA de esperma de salmão (30 µL/mL de solução) por 5 minutos a 95 °C, colocar no gelo imediatamente. Em seguida, adicionar à solução de pré-hibridização.

DNA de esperma de salmão é adicionado durante a pré-hibridização para evitar hibridização inespecífica após adição da sonda.

3. Deixar pré-hibridizando por 2 horas à temperatura ótima que deve ser determinada conforme nota da etapa 6 deste item.

Para análise de siRNA, a pré-hibridização deve ser feita em 25 mL de solução de pré-hibridização para análise de siRNA por um período de 2 a 3 horas a 45 °C.

Hibridização

4. Caso a sonda seja de DNA de fita dupla, desnaturar aquecendo por 5 minutos a 95 °C e colocando imediatamente no gelo.



A manipulação de **material radioativo** deve ser realizada com luvas cirúrgicas, óculos de proteção, jaleco de manga comprida e sempre utilizando uma proteção de acrílico. Deve-se checar a limpeza das bancadas e do material utilizado com um contador Geiger e proceder à limpeza, com água e sabão, caso sejam detectadas eventuais contaminações.

5. Determinar a quantidade de solução de hibridização necessária de acordo com o tamanho e o número de membranas:

Número de membranas	Tamanho	Quantidade de solução para <i>Northern blot</i>
1	10 cm x 10 cm	Mínimo de 10 mL
1	≥ 20 cm x 20 cm	Mínimo de 25 mL
≥ 2	≥ 10 cm x 10 cm	Suficiente para que as membranas se movam livremente

6. Determinar a concentração de sonda necessária para a hibridização para *Northern blot* de acordo com a tabela.

Tipo de sonda	Concentração da sonda	Condições de hibridização
RNA	10 ng/mL a 50 ng/mL	12–18 horas, a 65 °C
DNA	5 ng/mL a 20 ng/mL	12-18 horas, a 42 °C
Oligonucleotídeo	1 ng/mL a 10 pmol/mL	1 a 6 horas, dependendo do conteúdo G+C

A temperatura ótima de pré-hibridização e de hibridização depende do tamanho da sonda e de sua homologia com a sequência-alvo, poden-

do ser calculada (conforme a Tabela 1 da Introdução deste capítulo) ou determinada empiricamente.

7. Descartar a solução de pré-hibridização, adicionar solução de hibridização e a sonda marcada. Deixar hibridizando de acordo com a tabela da etapa 6 desta seção.

No momento de adicionar a sonda, deve-se ter o cuidado de pipetá-la diretamente dentro da solução, sem encostar a ponteira na membrana.

8. Após a hibridização, guardar a solução de hibridização em um tubo com tampa (por exemplo, tubo de polipropileno que suporte altas temperaturas) para ser reutilizada.

Para análise de siRNA, a hibridização deve ser realizada na mesma solução de pré-hibridização por um período de 16 horas a 45 °C.

Lavagem

9. Lavar a membrana por 10 minutos à temperatura ambiente com tampão SSPE 2X; SDS 0,1%.
10. Descartar a solução em lixo reservado exclusivamente para material radioativo. Monitorar a lavagem da membrana com um contador Geiger.
11. Lavar a membrana por duas vezes durante 15 minutos à temperatura de hibridização, com tampão SSPE 1X; SDS 0,1%.

12. Descartar a solução em em lixo reservado exclusivamente para material radioativo e monitorar a membrana a cada lavagem.

13. Lavar a membrana durante 15 minutos à temperatura de hibridização com tampão SSPE 0,1 X; SDS 0,1% (opcional).

Essa lavagem é de alta estringência e deve ser efetuada quando a membrana apresentar alta contagem após as outras lavagens.

Para análise de siRNA: realizar duas lavagens por 10 minutos a 50 °C com uma solução 2X SSPE contendo 0,1% SDS.

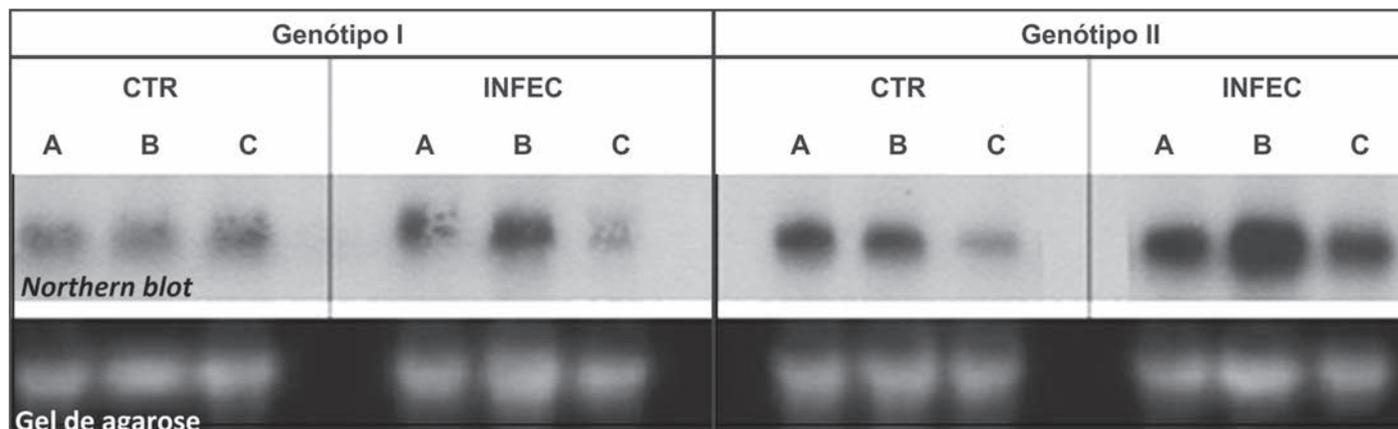
14. Envolver a membrana com papel de PVC. Expor em filme de raios X.

15. Revelar o filme de raios X (Figura 4).

Como alternativa, a membrana marcada sensibilizada pode ser exposta a uma placa de armazenamento de fósforo (*phosphor imaging plate*), sensível aos raios X. O sinal radioativo é revelado por digitalização em scanner a laser após um período de 24 a 96 horas de exposição, gerando uma imagem similar à de um filme de raios X.

6.3 Observação

Todo o trabalho que envolve a utilização de material radioativo deve obedecer a normas estritas de segurança estabelecidas no laboratório que deverá ser previamente licenciado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).



Fotos: Karina Proite e Patrícia Messenberg Guimarães

Figura 4. Análise pela técnica de *Northern blot* do RNA total de raízes de amendoim (Genótipo I suscetível e Genótipo II resistente) não infectadas (controle; CTR) e infectadas (INFEC) com o nematoide-das-galhas. A sonda utilizada na hibridização corresponde ao gene *arp* (*auxin repressed protein*), e os pontos avaliados na análise da expressão temporal desse gene foram 4 (A), 9 (B) e 16 (C) dias após infecção (DAI). Para a análise da expressão relativa do gene *arp* pela técnica de *Northern blot*, foi depositada no gel de agarose a mesma quantidade de RNA total de cada amostra.

7 Hibridização com sonda não radioativa

7.1 Material

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Formamida deionizada (item 3.1 Material).
- Reagente bloqueador (fornecido no kit pelo fabricante).

- Sarcosil 10% para RNA: pesar 5 g de sarcosil (N-lauril sarcosine) e dissolver em água DEPC 0,1%, completando o volume para 50 mL.
- SDS 20% para RNA (Apêndice 4).
- SSC 20X para RNA (Apêndice 4).
- Solução bloqueadora:

Componente	Quantidade	Concentração final
Solução estoque de reagente bloqueador	1	20%
Tampão maleato	4	80%

- Solução estoque de reagente bloqueador (10%): 100 mM maleato de sódio, pH 7,5, contendo 10%

reagente bloqueador para hibridização de ácidos nucleicos. Tratar a solução com DEPC 0,1% e esterilizar por autoclavagem.

O maleato de sódio permite o tratamento da solução estoque de reagente bloqueador com DEPC para inibir RNAses.

- Solução de lavagem 0,5X:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	1,25 mL	0,5X
SDS 20%	0,25 mL	0,1%
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 50 mL	

- Solução de lavagem 2X:

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	5 mL	2X
SDS 20%	0,25 mL	0,1%
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 50 mL	

- Solução de pré-hibridização para *Northern blot* (25 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
SSC 20X para <i>Northern blot</i>	6,25 mL	5X
Sarcosil 10%	250 µL	0,1%
SDS 20%	25 µL	0,02%
Solução bloqueadora estoque (10%)	5 mL	2%
DNA de esperma de salmão (4 mg/mL)	625 µL	100 µg/mL
Formamida deionizada	12,5 mL	50%
Água DEPC 0,1% q.s.p.	25 mL	

- Tampão maleato:

Componente	Quantidade	Concentração final
Ácido maleico pH 7,5	0,23 g	100 mM
NaCl 5 M (Apêndice 4)	0,6 mL	150 mM
Água DEPC 0,1%	q.s.p. 20 mL	

7.2 Procedimento

Pré-hibridização

1. Preaquecer a solução de pré-hibridização. Usar 20 mL de solução por 100 cm² de membrana. Colocar a membrana em um recipiente (frasco para forno de hibridização, caixa ou saco plástico vedado).
2. Deixar pré-hibridizando por 2 horas à temperatura ótima.

Hibridização

3. Sondas de DNA de fita dupla devem ser desnaturadas 5 minutos a 95 °C e colocadas imediatamente no gelo.
4. Determinar a quantidade de solução de hibridização necessária de acordo com o tamanho e o número de membranas, como mostrado na etapa 5 do item 5.2 Procedimento.
5. Diluir a sonda em solução de hibridização para RNA de acordo com a tabela da etapa 6 do item 6.2 Procedimento.

6. Descartar a solução de pré-hibridização e adicionar solução de hibridização contendo a sonda marcada. Deixar hibridizando de acordo com tabela do item 6 da seção 6.2 Procedimento.
7. Após a hibridização, guardar a solução de hibridização em um tubo com tampa (por exemplo, tubo de polipropileno capaz de suportar altas temperaturas) para ser reutilizada.

Esta solução de hibridização para *Northern blot* contém grande quantidade de sonda marcada com DIG que não anelou ao RNA alvo. Identificar o tubo e estocar soluções a -20 °C (sonda de DNA) e a -80 °C (sonda de RNA) para futura reutilização. Sondas marcadas com DIG e estocadas dessa maneira são estáveis por pelo menos 1 ano. Para reutilizar, basta desnaturar a 68 °C por 10 minutos.

Lavagem

8. Lavar a membrana duas vezes por 5 minutos em solução de lavagem à temperatura ambiente.
9. Lavar a membrana por 15 minutos em solução de lavagem 0,5X. Repetir a lavagem.

Quando forem utilizadas sondas maiores que 100 pb, proceder às lavagens a 68 °C.

Essas lavagens (etapas 8 e 9 deste item) removem restos de sonda não aderida, que levariam a uma alta taxa de hibridização não específica (*background*) se não fossem removidos.

10. Prosseguir à detecção quimioluminescente ou colorimétrica de acordo com as instruções do fabricante.

8 Referências

- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, n. 12, p. 5350-5354, 1977.
- BERGER, S. L. Preparation and characterization of RNA: overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 152, p. 215-219, 1987.
- BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- DENHARDT, D. T. A membrane-filter technique for detection of complementary DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 23, n. 5, p. 641-646, 1966.
- KARCHER, S. Non radioactive nucleic acid detection systems. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1994. p. 309-333.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v, 2100 p.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.
- STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human molecular genetics**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1999. 576 p.
- STREIT, S.; MICHALSKI, C. W.; ERKAN, M.; KLEEFF, J.; FRIESS, H. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nature Protocols**, London, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009.
- TINOCO, M. L. P.; DIAS, B. B. A.; DALL'ASTTA, R. C.; PAMPHILE, J. A.; ARAGÃO, F. J. L. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells

by *in planta* expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**, London, v. 8, p. 27, 2010.

TRAYHURN, P. Northern blotting. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 55, n. 1B, p. 583-589, 1996.

VÁLÓCZI, A.; HORNYIK, C.; VARGA, N.; BURGYÁN, J.; KAUPPINEN, S.; HAVELDA, Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by

northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 22, p. e175, 2004.

WU, H.-W.; YU, T.-A.; RAJA, J.; WANG, H.-C.; YEH, S.-D. Generation of transgenic oriental melon resistant to Zucchini yellow mosaic virus by an improved cotyledon-cutting method. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, n. 7, p. 1053-1064, 2009.

Quantificação gênica pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

Julio Carlyle Macedo Rodrigues
Érika Valéria Saliba Albuquerque

1 Introdução

A PCR (sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase) revolucionou a detecção de ácidos nucleicos, tornando possível detectar até uma única cópia de uma determinada sequência (Capítulo 10). A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) baseia-se na premissa de que a quantidade de produto em um determinado ponto da curva de amplificação da reação, de preferência na sua fase exponencial, está diretamente relacionada com a quantidade inicial de fitas-molde de ácidos nucleicos presente na amostra (FREEMAN et al., 1999; RAEYMAEKERS, 2000). A qPCR possibilitou um grande avanço na quantificação de ácidos nucleicos, uma vez que permite o monitoramento do acúmulo de fitas produzidas a cada ciclo da reação. Quanto maior a quantidade de cópias do ácido nucleico-alvo no início da reação, menor será o número de ciclos necessário para detectar o produto de amplificação (amplicons).

Na qPCR, a metodologia de quantificação de ácidos nucleicos presentes em uma amostra baseia-se na detecção e quantificação da fluorescência emitida por fluoróforos que se ligam direta ou indiretamente ao produto de amplificação. A fita-molde da reação pode ser DNA (plasmidial, genômico ou o próprio amplicon) ou cDNA (sintetizado pela transcrição reversa de RNA mensageiro).

Dois tipos principais de sistemas de detecção são utilizados para a detecção da fluorescência a cada ciclo

de amplificação em reações de qPCR. O mais utilizado, por seu custo/benefício positivo, é o fluoróforo cianina assimétrica (MORRISON et al., 1998). A cianina assimétrica (N',N'-dimetil-N-[4-[(E)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ilideno)metil]-1-fenilquinolina-1-ium-2-il]-N-propilpropano-1,3-diamina) se intercala nos sulcos menores da estrutura do DNA fita dupla (de maneira não covalente), não interfere na reação de PCR e, quando excitado com luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$), emite fluorescência na faixa da luz verde (aproximadamente $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$; Figura 1A). Portanto, quanto maior a quantidade de amplicons produzida pela reação de PCR, maior a fluorescência emitida. Esse sistema de detecção tem a vantagem de ser versátil, pois a cianina assimétrica liga-se indiscriminadamente a qualquer DNA de fita dupla, podendo ser utilizada com iniciadores (*primers*) comuns e sem a necessidade de sondas de hidrólise, reduzindo o custo. Entretanto, por não reconhecer especificamente amplicons gerados pela reação, a cianina assimétrica apresenta a desvantagem de se ligar também a amplicons inespecíficos. Os corantes de cianina assimétrica mais utilizados em qPCR são SYBR® Green I, SYBR® Green II, SYBR® Gold, YO (*Oxazole Yellow*), TO (*Thiazole Orange*) e PG (*Pico Green*).

O segundo sistema de detecção consiste na utilização de iniciadores associados a sondas fluorogênicas (HEID et al., 1996). A grande vantagem dessa abordagem é sua especificidade, pois ocorre emissão de sinal apenas na amplificação do produto específico ao qual a sonda se liga. Além disso, diferentes genes podem ser estudados em uma mesma amostra, utilizando-se diferentes fluoróforos

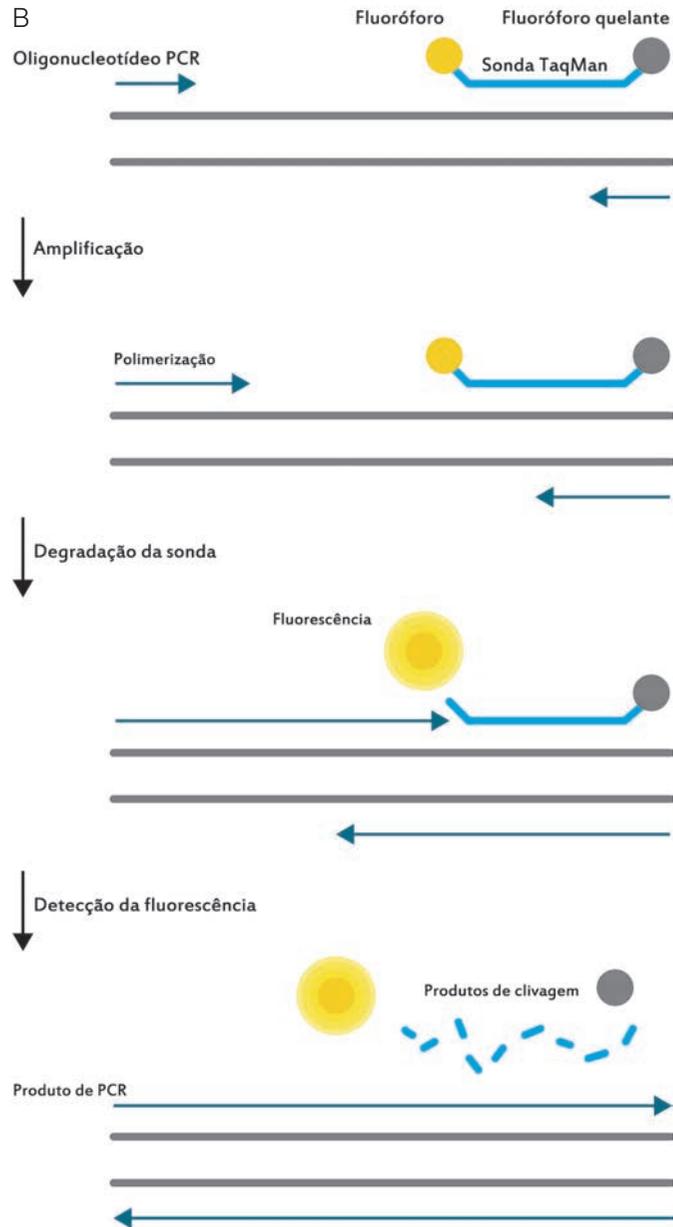
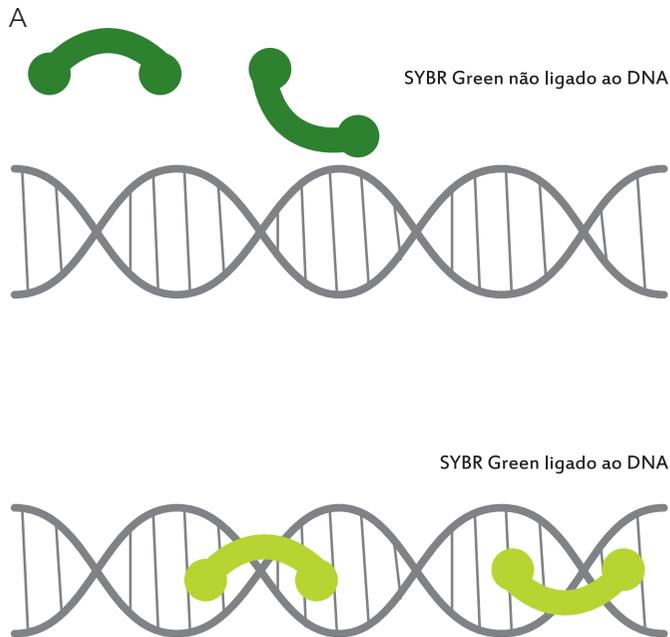


Figura 1. Esquemas da reação de amplificação usando dois tipos de sonda: A) A cianina assimétrica que se liga ao DNA de fita dupla. B) Sonda de hidrólise, a qual contém fluoróforo em uma das extremidades e um quelante na outra. O quelante inibe a emissão de fluorescência do fluoróforo. A sonda se liga à região complementar do DNA. Os oligonucleotídeos são desenhados para flanquear a sonda, degradada em seguida pela atividade exonucleásica da Taq polimerase. A degradação da sonda separa o fluoróforo do quelante, causando a liberação de fluorescência.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

(multiplex). Ao planejar reações com multiplex, deve-se evitar sobreposição entre os espectros de detecção dos pares fluoróforo/quelante para que não haja emissões cruzadas dos diferentes produtos. Em contrapartida, a grande desvantagem reside no seu alto custo, uma vez que para cada produto a ser amplificado, tem que ser gerada uma sonda específica. Amplamente utilizada, a tecnologia de sonda de hidrólise é um exemplo de sonda fluorogênica de hidrólise. Existem outros tipos de sondas baseadas em fluoróforo/quelante que não requerem hidrólise, como *Molecular beacon* e *Scorpions*. *Molecular beacon* baseia-se na estrutura secundária em forma de grampo da própria sonda, enquanto as sondas do tipo *Scorpions* são uma combinação de iniciadores com sonda.

A sonda de hidrólise fluorogênica é um oligonucleotídeo específico ao ácido nucleico-alvo e possui um fluoróforo repórter ligado de maneira covalente na extremidade 5', e outra molécula quelante da fluorescência na extremidade 3' (Figura 1B). Enquanto não houver amplificação da fita-molde, a sonda permanece anelada, e o quelante inibe a fluorescência do fluoróforo repórter (LIVAK et al., 1995). À medida que o produto é amplificado na reação de qPCR pelos iniciadores, a atividade 5' nucleásica da Taq DNA polimerase cliva a sonda marcada, provocando a separação dos fluoróforos e permitindo a emissão do sinal fluorescente (Figura 1B). Assim, o aumento de fluorescência indica que houve o acúmulo de produtos de amplificação. Ao desenhar uma sonda de hidrólise fluorescente, é necessário garantir que o fluoróforo e seu quelante sejam compatíveis, de acordo com a química de

detecção. A sonda de hidrólise fluorogênica mais utilizada em qPCR é TaqMan®.

O monitoramento da reação de qPCR é feito em termocicladores que possuem uma fonte luminosa para excitação de fluoróforos, câmeras para captação da fluorescência e blocos ou câmaras para o controle de temperatura. Esses elementos são controlados por programas que acompanham cada sistema de qPCR, que, tipicamente, geram um gráfico (Figura 2) da relação entre a fluorescência captada no final de cada ciclo (R) e o número do ciclo correspondente da PCR. A curva de amplificação é exponencial, até a reação atingir o grau de saturação (*plateau*). A fluorescência basal, conhecida como linha de base, corresponde à intensidade de sinal do produto amplificado que ainda não ultrapassa a intensidade da fluorescência encontrada no meio. Qualquer aumento da fluorescência que ultrapasse a linha de base indica a detecção do amplicon. O limiar de detecção de fluorescência pode ser estabelecido no início da fase exponencial da reação e é definido como *threshold* (Figura 2). Esse limiar pode ser fixado manualmente pelo operador ou automaticamente pelo programa de tratamento de dados, a depender das condições de cada reação. O parâmetro Cq (*quantification cycle*) indica o ciclo da reação em que a fluorescência do produto amplificado de cada amostra atinge o *threshold*. O valor de Cq depende da quantidade inicial de ácido nucleico-alvo e da eficiência da reação de amplificação. De uma maneira geral, os programas calculam automaticamente o *threshold*, para cada iniciador, como dez vezes o desvio padrão da linha de base, e estabelecem esse limiar

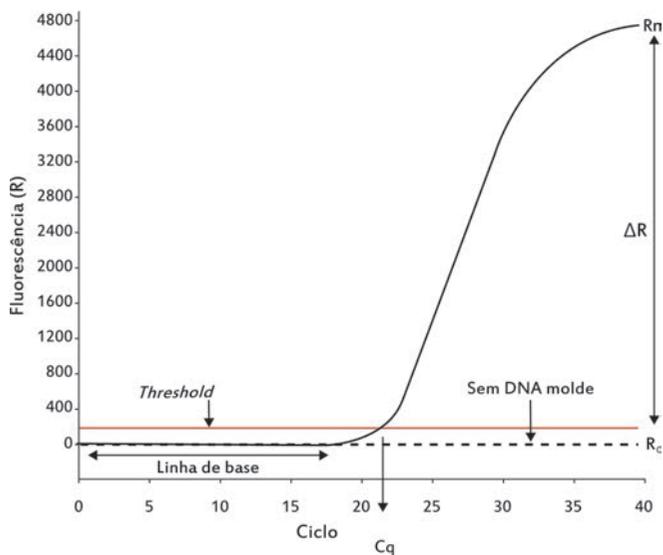


Figura 2. Gráfico representando a reação de PCR quantitativa e seus principais parâmetros. A fluorescência (R ; eixo 'y') é medida a cada ciclo de PCR (eixo 'x'). A diferença (ΔR) entre a quantidade de fluorescência após n ciclos de reação (R_n) e no início (R_0) indica a quantidade total de fluorescência gerada. A linha de base consiste na fase da PCR em que não há incremento da fluorescência. O *threshold* é determinado quando a fluorescência ultrapassa a linha de base, indicando o início da fase exponencial da reação. O ciclo da qPCR correspondente ao *threshold* é chamado de C_q (*quantification cycle*), e é um dos parâmetros mais importantes na análise de expressão gênica.

no início da fase exponencial de amplificação, na qual não há limitação de componentes para a reação de PCR, e a sensibilidade é alta.

Podem-se realizar dois tipos de quantificação gênica a partir dos dados provenientes da qPCR: a quantifica-

ção absoluta e a relativa (WONG; MEDRANO, 2005). Além da quantificação gênica, a qPCR possui vasta aplicação na detecção precisa de sequências nucleotídicas em estudos de genotipagem e discriminação alélica; inserções/deleções; translocações cromossômicas; mutações, assim como no diagnóstico de doenças genéticas; na identificação e caracterização genética de vírus e patógenos, na avaliação da eficácia de tratamentos medicamentosos (farmacogenética); na medicina forense para identificação de indivíduos por meio da amplificação de *Short Tandem Repeats*, no prognóstico de doenças; entre outras. Na Tabela 1, alguns exemplos são fornecidos. Essas aplicações,

Tabela 1. Aplicações da técnica de qPCR.

Aplicação	Referências
Variação de números de cópias	Bubner e Baldwin (2004) e Wu et al. (2007)
Imuno-PCR em tempo real	Lind e Kubista (2005)
Imunoprecipitação de cromatina	Puppo et al. (2005) e Sandoval et al. (2004)
Quantificação de carga viral	Espy et al. (2006)
Detecção de patógenos	Espy et al. (2006) e Mackay (2004)
Instabilidade genômica (microssatélites)	Mackay et al. (2008)
Genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs)	Vandemark e Miklas (2005) e Wittwer et al. (2003)
Detecção de metilação de DNA	Campan et al. (2009)
Determinação do número de cópias de transgenes	Bubner e Baldwin (2004) e Yang et al. (2005)

diferentemente da quantificação gênica, alvo deste capítulo, são realizadas com dados de fluorescência do produto amplificado obtidos ao final da qPCR (*end point analysis*) e permitem resultados qualitativos (e não quantitativos). Assim, as aplicações da qPCR são mais numerosas que da PCR convencional, uma vez que permitem a detecção dos produtos na fase exponencial da reação de PCR, tornando-a uma técnica rápida, de alta sensibilidade e especificidade.

Curva-padrão

A curva-padrão é importante tanto para quantificação absoluta como relativa. A curva-padrão é estabelecida por diluições seriadas, nas quais os valores de número de cópias, ou a quantidade do ácido nucleico-alvo, utilizados para cada ponto de diluição são previamente conhecidos (Figura 3). Esses diferentes pontos da curva serão utilizados para calcular a regressão linear, na qual a

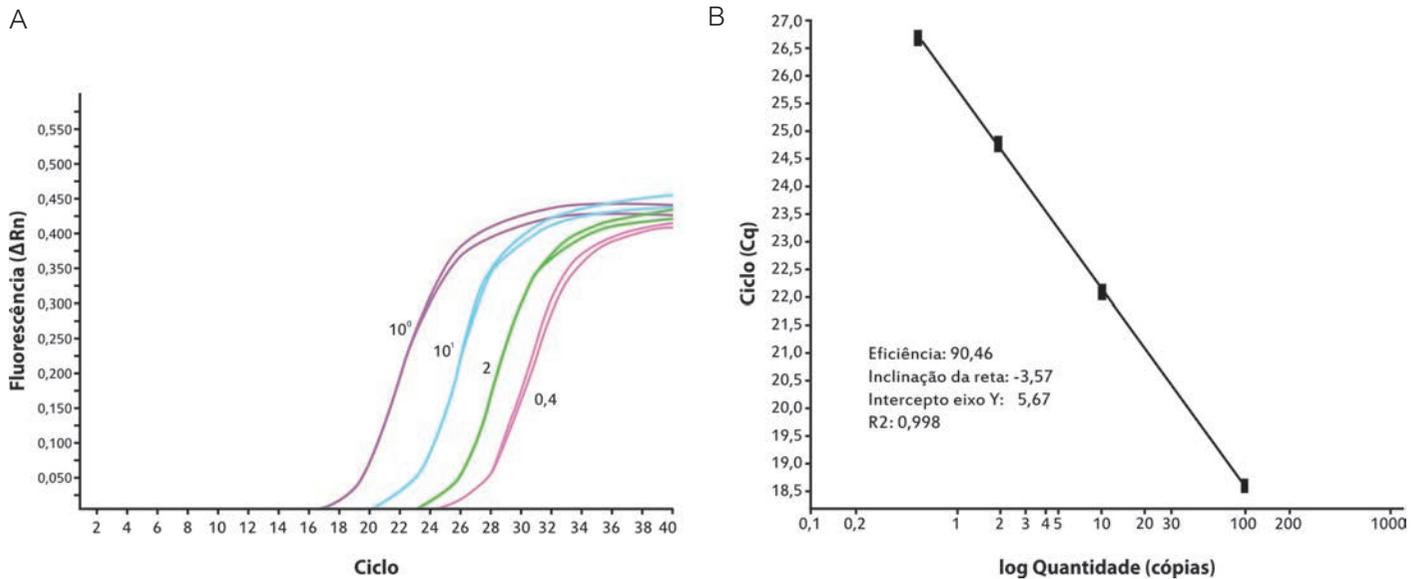


Figura 3. Gráficos representativos de uma curva-padrão. Diluições seriadas são preparadas e utilizadas em reação de qPCR. A) A relação entre fluorescência (y) e ciclo de qPCR (x), mostrando que diluições de base 10 têm uma diferença de aproximadamente três ciclos (Cq); 100 cópias (roxo); 10 cópias (azul); 2 cópias (verde) e 0,4 cópias (rosa); B) A relação entre Cq (y) e log da quantidade de produto por diluição (x). A regressão linear resulta na equação de reta, na qual o coeficiente de correlação (R2) deverá ser próximo de 1,0. A inclinação da reta (*slope*) é utilizada para cálculo de eficiência, por meio da fórmula $E = [10^{(-1/slope)} - 1] \times 100$. A eficiência deve ser entre 90% e 110%.

inclinação da reta (*slope*) de -3,32 significa uma eficiência (*E*) da reação de PCR de 100% (com $E = [10^{(-1/slope)} - 1] \times 100$). A eficiência de amplificação pode ser definida como a taxa na qual o produto é amplificado a cada ciclo da PCR durante sua fase exponencial. Para uma eficiência de 100%, haverá o dobro de produto a cada ciclo; para 90%, haverá um aumento de 1,9; para 110%, um aumento de 2,1; e assim por diante. O valor designado para a eficiência é uma medida de desempenho global do ensaio de qPCR. Como idealmente a eficiência deverá estar entre 90% e 110% para todos os iniciadores (seção 4 deste capítulo), a inclinação da reta (*slope*) deverá ser basicamente entre $\approx -3,6$ (para uma eficiência de 90%) e $\approx -3,1$ (para uma eficiência de 110%) (ver cálculo abaixo). A produção da curva-padrão, portanto, é necessária para o cálculo da eficiência e tem que ser altamente específica, reprodutível e abrangente. O índice de correlação entre os diferentes pontos da diluição seriada e os valores de fluorescência obtidos no Cq precisam estar bem ajustados, ou seja, o coeficiente de correlação (R2) tem que ser próximo de 1,0. Como fita-molde para estabelecer essa curva-padrão, podem-se usar diluições seriadas de cDNA ou do próprio produto de amplificação do gene de interesse (GI). Os programas de análise de dados de qPCR geralmente já fazem o cálculo da eficiência da reação, que também pode ser realizado por programas específicos de cálculo de eficiência como LinReg e PCRMiner. Para a quantificação absoluta, a curva-padrão também é utilizada para determinar o valor das amostras desconhecidas, que é obtido pela interceptação dos valores de Cq de cada amostra na

curva-padrão, em que o eixo 'x' representa o número de cópias do fragmento amplificado, e 'y' representa o valor Cq correspondente (Figura 3B).

Cálculo de inclinação de reta baseado em eficiência de 90%:

$$E = 0,90 = 10^{(-1/slope)} - 1$$

$$\leftrightarrow 1,90 = 10^{(-1/slope)}$$

$$\leftrightarrow \log 1,90 = -1/x$$

$$\leftrightarrow x = -1/\log 1,90$$

$$\leftrightarrow x = -3,587 \approx -3,6$$

Quantificação absoluta

A quantificação absoluta determina o número exato de cópias ou a quantidade (expressa em peso) de um ácido nucleico-alvo presente na amostra inicial por interpolação a partir de uma curva-padrão. Esse cálculo é feito pela extrapolação de valores das amostras em estudo com valores de uma amostra de quantificação conhecida, utilizada para estabelecer uma curva-padrão (seção 5 deste capítulo). A quantificação absoluta é frequentemente aplicada na pesquisa com plantas para a quantificação de carga viral de patógenos e de transgenes em organismos geneticamente modificados (OGMs). Para quantificação absoluta, a curva-padrão pode ser baseada em concentrações conhecidas de moléculas de DNA, como plasmídios, DNA genômico, amplicons, oligonucleotídeos comerciais, entre outros. É importante enfatizar que a curva-padrão utilizada para quantificação

absoluta deverá ser incluída em toda corrida para as amostras em estudo.

Quantificação relativa

A quantificação relativa determina quantas vezes (*fold change*) um determinado GI é expresso em relação a um ou mais genes de referências (GRs), os quais são utilizados como controles internos e cuja expressão é estável (não variável) em todas as amostras analisadas. A quantificação relativa pode ser utilizada para determinar o *fold change* de um determinado GI em uma dada amostra ou a alteração do seu padrão de expressão em resposta a um tratamento, variação ambiental ou no decorrer do desenvolvimento de uma célula, tecido, órgão ou sistema. Nesse caso, utiliza-se uma amostra calibradora como referência (amostra “não tratada”, por exemplo), e os valores das outras amostras são divididos pela amostra calibradora para determinar a alteração de expressão do GI.

Os GRs mais comumente utilizados na quantificação relativa estão envolvidos com processos celulares básicos, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ubiquitina, actina, genes ribossomais, entre outros. Não há um GR universal que funcione para todos os experimentos de qPCR, e sua escolha depende da espécie (ou mesmo do genótipo), da condição experimental, e do tecido em estudo, portanto, é necessário determinar quais os GRs mais adequados para as amostras utilizadas ao se delinear um experimento de qPCR (SUZUKI et al., 2000). A expressão do GR tem que ser significativamente

estável em todas as amostras em estudo para que a quantificação relativa seja confiável, já que ela pode variar nos diferentes órgãos; por exemplo, um GR utilizado para verificar variação de expressão em folha em resposta a um determinado tratamento pode não ter expressão estável entre órgãos vegetativos e reprodutivos, como mostra o exemplo da Figura 4. Vários programas disponíveis gratuitamente calculam os níveis de estabilidade de genes candidatos a GR, como GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) ou BestKeeper (PFAFFL et al., 2004). É fortemente aconselhável o uso de

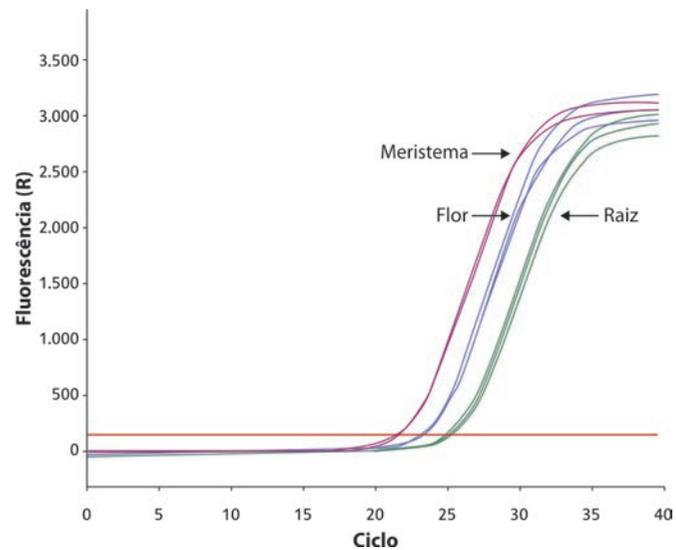


Figura 4. Gráfico de uma reação de RT-qPCR típica para teste de gene de referência em diferentes partes de planta, sugerindo que o gene testado pode ser utilizado para análises de expressão gênica relativa no mesmo órgão, mas deve ser evitado para análises entre os diferentes órgãos.

mais de um GR como normalizador na análise da expressão relativa de um determinado GI.

Para o cálculo da quantificação relativa, os valores de Cq obtidos para o(s) GR(s) são deduzidos dos valores obtidos para o GI na mesma amostra (seção 4 deste capítulo). Essa normalização elimina o efeito de variações não biológicas, como a quantidade inicial de ácido nucleico, em cada amostra, por menores que sejam, e garante que as diferenças de quantificação observadas para o GI sejam verdadeiras.

2 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

2.1 Material

- 2 µg de RNA total de alta qualidade em um volume de até 8 µL (Capítulo 14).
- Desoxirribonuclease (DNase) sem Ribonuclease (RNase) a 2 U/µL e seu tampão 10X.
- DTT a 200 mM, diluído a partir da solução DTT 1M (Apêndice 4).
- EDTA 25 mM, pH 8,0, diluído a partir da solução EDTA 500 mM (Apêndice 4).
- Inibidor de RNase a 40 U/µL.
- Mistura de desoxinucleotídeos (dNTPs) a 10 mM cada um (Apêndice 4).

- Oligonucleotídeo poli(T) [(dT)₁₂₋₁₈] a 500 µg/mL.
- Ponteiras com filtro.
- Termobloco ou banho-maria com regulação de temperatura para 37 °C, 65 °C, 42 °C e 70 °C.
- Transcriptase reversa a 200 U/µL e respectivo tampão de reação 5X.
- Tubos de microcentrífuga de 200 µL (microtubo), próprios para manipulação com RNA.

2.2 Procedimento

1. Em um microtubo de 200 µL, acrescentar 2 µg de RNA total, 2 U de DNase sem RNase e 1 µL de tampão de DNase 10X. Completar o volume para 10 µL com água deionizada estéril.
2. Incubar por uma hora a 37 °C. Acrescentar 1 µL de EDTA 25 mM, misturar e incubar durante 10 minutos a 65 °C. Incubar no gelo por 5 minutos e centrifugar rapidamente.

O EDTA e o aquecimento a 65 °C têm como objetivo inibir a atividade enzimática da DNase.

Em alguns protocolos, a DNase é inativada pela extração com fenol:clorofórmio, seguida de precipitação com etanol.

3. No mesmo tubo no qual foi realizado o tratamento com a DNase, adicionar 1 µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ e 1 µL de dNTPs.
4. Aquecer a 65 °C por 5 minutos, levar imediatamente ao gelo e centrifugar rapidamente.

Nesta etapa ocorre a desnaturação de estruturas secundárias de RNA e o anelamento do oligo(dT) a sua cauda poli-A.

5. Adicionar 4 μL do tampão de reação de transcriptase reversa, 1 μL de DTT e 1 μL de inibidor de RNase. Misturar delicadamente.
6. Incubar a 42 °C por 2 minutos e adicionar 1 μL de transcriptase reversa. Misturar cuidadosamente e centrifugar rapidamente.

Conferir com o protocolo do kit da enzima transcriptase reversa a temperatura adequada, pois algumas enzimas usam a temperatura de 50 °C.

7. Incubar a 42 °C por 50 minutos.
8. Inativar a transcriptase reversa por aquecimento a 70 °C por 15 minutos. Armazenar o cDNA a -20 °C.

Caso seja prevista a amplificação de produtos maiores que 1 Kb, adicionar 2 U de RNase H e incubar a 37 °C por 20 minutos.

9. Para verificar a qualidade do cDNA recém-sintetizado, proceder a uma reação de PCR convencional (Capítulo 10), utilizando o cDNA como fita-molde (RT-PCR) e iniciadores de genes conhecidos da espécie em estudo. Para tanto, diluir 1 μL do cDNA obtido (seção 8 deste capítulo) em 1 μL de água e utilizar 1 μL dessa diluição como molde em uma reação de RT-PCR, para um volume final de 25 μL .

Uma reação de RT-PCR é uma PCR (Capítulo 10) que utiliza cDNA como fita-molde.

10. Verificar a qualidade do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio (Apêndice 4), de uma alíquota de 10 μL do volume final da reação.

2.3 Observações

A qualidade do ácido nucleico a ser usado como molde para a qPCR é de fundamental importância para o sucesso do experimento. Em caso de análise de expressão gênica, o RNA deve ser de alta qualidade, preferencialmente extraído com o mesmo protocolo para todas as amostras analisadas (ver Capítulo 14 de extração de RNA para mais detalhes). Vários kits comerciais de extração de RNA estão disponíveis, bem como kits em coluna para purificação de RNA a partir de pequena quantidade de tecido. Essas diferentes metodologias devem ser testadas para determinar a que garante melhor qualidade e custo/benefício de acordo com o material a ser analisado.

Antes de iniciar o tratamento com DNase, a quantidade e a integridade do RNA devem ser estimadas por espectrometria. Recomenda-se confirmar posteriormente essa estimativa em gel agarose desnaturante (Capítulo 14) aplicando-se a mesma quantidade de RNA (200 ng a 500 ng, por exemplo) de todas as amostras experimentais e de uma amostra-controle com quantidade previamente conhecida. A intensidade da banda de RNA deve ser semelhante para todas as amostras e análoga à da amostra-controle. A integridade do RNA pode ser adicionalmente analisada com mais acurácia por eletroforese de capilaridade.

A precisão da quantificação é importante para que não haja grandes variações na expressão do GR em razão de variações na quantidade inicial de RNA total na reação de síntese de cDNA. Apesar de que essas variações podem ser corrigidas na normalização dos dados, quanto menor o erro, mais confiáveis e reprodutíveis serão os resultados.

Para a análise de expressão gênica, é necessário eliminar resíduos de DNA genômico da amostra de RNA. A presença de DNA genômico pode resultar em produtos de amplificação indesejáveis e alterar os resultados da quantificação do gene transcrito. Geralmente, os resíduos de DNA contaminante são eliminados por tratamento com DNase antes da síntese de cDNA, como descrito neste Capítulo. Alguns kits de extração de RNA também preveem a eliminação do DNA diretamente na coluna, o que evita o risco de perda de RNA por contaminação com RNase ou na precipitação durante o tratamento com DNase.

Diferentes kits comerciais estão disponíveis para a síntese de cDNA a partir de RNA total. Esses kits geralmente utilizam iniciadores oligo(dT) para favorecer a síntese de cDNA a partir de RNA mensageiro (mRNA) pelo anelamento em sua cauda poli-A característica. No entanto, uma opção é a utilização de oligonucleotídeos aleatórios (*random primers*) para a síntese de cDNA. A utilização de oligonucleotídeos aleatórios na síntese de cDNA tem a vantagem de rendimento, portanto, podem ser recomendados nos casos em que a quantidade inicial de RNA total é limitada (< 1 µg).

Para a síntese de cDNA recomenda-se que a quantidade de RNA esteja entre 1 µg e 5 µg. Em casos de genes de baixa abundância e, portanto, raros, recomenda-se utilizar 3 µg e 4 µg. De um modo geral, a quantidade entre 2 µg e 3 µg é suficiente para amplificar a maior parte dos genes.

A presença residual de DNA genômico na amostra pode ser verificada de duas maneiras: a) amplificação de um fragmento utilizando iniciadores que flanqueiam um íntron (*intron-spanning primers*) de um gene conhecido. Dessa maneira, a reação de RT-PCR contendo apenas cDNA não deverá ter a presença do íntron, enquanto a reação contendo DNA genômico contaminante resultará em um fragmento maior do que na amostra proveniente do cDNA. Caso não seja possível: b) utilizar controles negativos, nos quais a transcriptase reversa é omitida da amostra de RNA total utilizada para a síntese de cDNA; dessa maneira, se houver produto de amplificação, o DNA contaminante é usado como molde e, portanto, está presente na amostra.

3 Estabelecimento de curva-padrão e quantificação relativa

3.1 Material

- cDNA ou DNA genômico (dependendo da análise a ser realizada).

- Iniciadores “forward” e “reverse” específicos do GR ou GI a 10 μ M cada um.
- Mistura contendo o fluoróforo cianina assimétrica, Taq DNA polimerase, tampão da reação e dNTPs.
- Ponteiras com filtro.
- Termociclador para PCR em tempo real.
- Tubos de microcentrífuga (microtubos) de 200 μ L ou placa de 96 poços, a depender do modelo do termociclador, próprios para manipulação com RNA.

3.2 Procedimento

1. Preparar diluições seriadas de base 10 (por exemplo, 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; e 10^{-5}) a partir da solução-estoque da fita-molde [DNA ou cDNA (item 2 deste capítulo)].

Para o preparo da curva de diluição, pode-se utilizar tanto cDNA ou DNA, amplicons purificados em gel ou clonados em vetor. Diluições intermediárias (como 2X ou 5X) também podem ser utilizadas. A série de diluição deverá ser informada no programa do termociclador utilizado.

Caso seja conhecida a concentração do cDNA, realizar um gradiente da quantidade de cDNA de 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng.

A fita-molde utilizada no estabelecimento da curva-padrão poderá ser uma amostra aleatória ou, de preferência, uma mistura equimolar de todas as amostras experimentais em estudo.

Ao preparar as diluições, evitar utilizar volumes pequenos, que são menos precisos. Por exemplo, realizar diluições de 10 μ L de fita-molde em 90 μ L de água em vez de 1 μ L em 9 μ L.

2. Preparar a mistura de reação de acordo com o número de amostras (n) de cada experimento, conforme tabela abaixo:

Componente	Concentração final	Volume por reação	Volume para “n” reações
Iniciador F	200 nM	0,2 μ L	0,2 μ L x n
Iniciador R	200 nM	0,2 μ L	0,2 μ L x n
Mistura Cianina assimétrica	1X	5,0 μ L	5,0 μ L x n
H ₂ O		2,6 μ L	2,6 μ L x n

Ao se determinar o número total de amostras, é importante lembrar que cada amostra deve ser feita em triplicata técnica, e que, para cada par de iniciadores, uma controle sem fita-molde deve ser incluída (*no template control* – NTC).

3. Distribuir 8 μ L da mistura em cada tubo ou poço de reação.
4. Adicionar 2 μ L da fita-molde (cDNA ou DNA genômico) das amostras e misturar.
5. Fechar o tubo, ou selar a placa com adesivo óptico apropriado, e centrifugar a 4 °C por 1 minuto a 1.000 g.
6. Colocar as amostras no equipamento e iniciar programa nas seguintes condições:

Etapa	Temperatura	Duração
Pré-ciclo	95 °C	1 a 10 minutos
Ciclos (40)	95 °C	15 segundos
	58 °C a 60 °C	15 segundos
	72 °C	15 a 20 segundos
Curva de desnaturação	95 °C	15 segundos
	58 °C a 60 °C	1 minuto
	95 °C	15 segundos

O pré-ciclo corresponde à ativação da Taq polimerase, geralmente do tipo *hot start*. Pode haver diferença quanto ao tempo necessário para ativar a enzima. Seguir recomendação do fabricante.

7. Certificar-se da especificidade do produto amplificado por meio da análise da curva de desnaturação e da eficiência da reação, que deverá estar entre 0,9 e 1,1 (seção 4 deste capítulo).
8. Proceder à análise estatística dos dados que deverá ser feita utilizando valores C_q em programas específicos para análise de dados de qPCR (seção 4 deste capítulo).
9. Após a análise da curva de diluição seriada e a otimização de todos os parâmetros, proceder à reação de qPCR (etapas 2 a 6 deste item), utilizando todas as amostras em estudo com os iniciadores dos GIs e GRs.

Analisar todas as amostras em triplicatas técnicas.

Se possível, proceder à qPCR das mesmas amostras com os iniciadores de GI e de GR na mesma placa.

10. Analisar a expressão relativa dos GIs (seção 4 deste capítulo).

3.3 Observações

A mistura contendo o fluoróforo cianina assimétrica, disponível comercialmente, contém todos os reagentes necessários para realização da reação de qPCR, incluindo: Taq DNA polimerase (geralmente do tipo *hot start*, que evita amplificações inespecíficas e necessita de aquecimento a 95 °C por 1 a 10 minutos para ativação), tampão de reação otimizado, dNTPs, o corante fluorescente de cianina assimétrica (como SYBR® Green I) e o corante de

referência passiva ROX. O corante passivo ROX serve para a normalização do sinal do corante fluorescente, eliminando variações entre amostras devido a volume ou concentração. Portanto, os principais ajustes que podem ser feitos nos reagentes de uma reação de qPCR, que utiliza uma mistura comercial contendo o fluoróforo cianina assimétrica, estão na quantidade de fita-molde e na concentração/proporção dos iniciadores a serem adicionados à reação. Normalmente, as concentrações finais utilizadas variam de 150 nM a 250 nM na reação; no entanto, podem-se testar gradientes de concentrações mais amplas, de 50 nM a 900 nM, inclusive testando quantidades diferentes de iniciadores “forward” e “reverse”. As concentrações ideais devem levar em consideração o C_q do produto (na faixa de alta precisão: entre 15 e 30) e a fluorescência, ou ΔRn (a maior possível), além da ausência de dímeros e de amplificações em controles negativos sem molde (NTC).

Existem novos fluoróforos que prometem ser mais eficientes que o fluoróforo cianina assimétrica.

Algumas misturas comerciais fornecem MgCl₂ separadamente para otimização das condições da reação.

Algumas misturas comerciais utilizam dUTP associado à UDG (dUTP DNA glicosilase). Essa combinação evita amplificação em razão de contaminantes por DNA. dUTP é incorporado ao DNA e removido de modo específico pela UDG. Nesse caso, uma incubação a 50 °C por 2 minutos (seguir recomendação do fabricante) deve preceder o *hot start*.

A curva de diluição seriada (ou curva-padrão seriada) deve ser realizada para cada novo par de iniciador/fita-molde em estudo e é essencial para se determinar: a) a faixa de fita-molde que a qPCR pode detectar, isto é, se a quantidade de fita-molde inicial produz resultados dentro da faixa linear dinâmica de um ensaio (Cq na faixa de alta precisão: entre 15 e 30); b) a precisão das réplicas, isto é, em um ensaio preciso, o coeficiente de variação (R2) deve ser menor ou igual a 0,99; c) a eficiência da reação (ver seção 4 deste capítulo).

4 Análise dos dados pelo método $\Delta\Delta Cq$

Na quantificação relativa, o método mais utilizado para análise de dados se baseia na utilização da variação do valor Cq, denominado $\Delta\Delta Cq$ (delta-delta Cq) ou Cq comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para se obter uma quantificação reprodutível e confiável, é necessário que as eficiências de amplificação dos GIs e GRs para as mesmas amostras sejam semelhantes e próximas de 100%. O método $\Delta\Delta Cq$ já faz essa inferência, portanto, é importante confirmá-la para uma maior confiabilidade dos resultados. Caso a eficiência não seja satisfatória, pode ser necessário ajustar a reação de qPCR, testando-se diferentes concentrações (realizar uma titulação de 100 nM a 600 nM) e proporções entre os iniciadores “forward” e “reverse” e a temperatura de anelamento. Alternativamente, pode ser necessário desenhar outro

par de iniciadores para garantir uma melhor eficiência de amplificação.

Na situação hipotética, em que se está investigando o efeito de um determinado tratamento na expressão de um GI, a diferença de Cq entre o GI e o GR (normalizador) de uma mesma amostra será o ΔCq . Em seguida, a diferença entre o ΔCq de cada amostra e o ΔCq de uma amostra calibradora será o $\Delta\Delta Cq$. A amostra calibradora é uma das amostras experimentais usada como base para comparação de resultados, isto é, a amostra 1X e todas as quantidades das demais amostras serão expressas como uma diferença de n vezes em relação a ela. O valor $\Delta\Delta Cq$ é colocado na fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para obter a quantidade relativa de GI (normalizada para o GR e em relação à amostra calibradora). Este valor de $\Delta\Delta Cq$ representa os níveis de expressão basal de GI ou os níveis de expressão de GI em uma amostra tratada em relação a seu controle não tratado; ou seja, quantas vezes a mais (ou a menos) o GI é expresso em resposta ao tratamento. Assim, pelo método $\Delta\Delta Cq$, a expressão relativa é calculada pela fórmula (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008):

Para expressão basal:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

ou para tratamentos:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq} \text{ da amostra tratada} / 2^{-\Delta\Delta Cq} \text{ da amostra controle}$$

em que:

RQ = quantificação relativa;

$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ da amostra experimental - da amostra calibradora;

$$\Delta Cq = Cq(GI) - Cq(GR).$$

Caso a eficiência de amplificação de *GI* e a de *GR* não sejam próximas (>10%) ou fora da faixa de $100 \pm 10\%$, pode-se usar uma variação do método $\Delta\Delta Cq$, que é o método Pfaffl (PFAFFL, 2001). Nesse método, a expressão relativa é calculada pela fórmula:

$$RQ = E(GI)^{\Delta Cq(GI)} / E(GR)^{\Delta Cq(GR)}$$

em que:

RQ = quantificação relativa;

E = eficiência de amplificação do *GI* ou do *GR*, calculada como $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$; e

$\Delta Cq = Cq$ (amostra controle) - Cq (amostra tratada).

Como mostra a fórmula, a equação de Pfaffl utiliza as eficiências (*E*) do *GI* e do *GR*. Caso as eficiências do *GI* e *GR* sejam iguais ou muito próximas, os resultados dos métodos Pfaffl e $\Delta\Delta Cq$ serão equivalentes.

Os dados obtidos com os modelos descritos devem ser analisados estatisticamente em relação ao efeito de cada fator experimental e sua significância. As hipóteses biológicas e o desenho experimental adotado são preponderantes na escolha do modelo de análise estatística a ser aplicado aos dados da qPCR. O *Cq* é a variável dependente do tratamento, da concentração inicial do material em estudo, do tempo de exposição ao tratamento, dos diferentes genótipos utilizados e de

outras variáveis experimentais. Alguns modelos também permitem avaliar o efeito interativo entre as variáveis.

A análise estatística dos dados deve começar pela determinação da distribuição dos dados (normal ou não normal). Para tanto, podem ser aplicados testes como Shapiro/Kolmogorov. No caso da normalidade, a análise de variância (ANOVA) indicará se existe efeito significativo do tratamento sobre as amostras. Em caso afirmativo, testes como Tukey ou Bonferroni deverão apontar se os contrastes entre os tratamentos são diferentes. Finalmente, os contrastes entre os efeitos principais de cada tratamento e das combinações das interações entre eles podem ser apresentados sob a forma de dendogramas. É importante ressaltar que, de acordo com o desenho experimental escolhido, outras ferramentas estatísticas poderão ser necessárias. Para um aprofundamento sobre métodos estatísticos, sugere-se Rieu e Powers (2009).

4.1 Observações

A mistura comercial para utilização de cianina assimétrica na qPCR contém os componentes necessários para a reação, com exceção da fita-molde e dos iniciadores. Portanto, o desenho dos iniciadores torna-se um aspecto fundamental para a reação de qPCR. Seguindo-se alguns parâmetros no desenho de iniciadores, aumenta-se a possibilidade de ter eficiências altas e próximas entre os diferentes *GIs* e *GRs* em estudo, o que aumenta a confiabilidade da quantificação. Esses parâmetros incluem:

- Tamanho do amplicon gerado: deve ser pequeno, preferencialmente entre 100 pb e 200 pb.
- Tamanho dos iniciadores: geralmente de 18 a 22 nucleotídeos.
- Ausência de autocomplementaridade: deve ser prevista no desenho dos iniciadores, pois leva à formação de grampos dentro do iniciador, dificultando o anelamento ao molde e a amplificação do produto, o que diminui a eficiência da reação.
- Baixa probabilidade da formação de dímeros: ocorre quando há complementaridade entre o par de iniciadores, o que, além de competir com o anelamento com a fita-molde, gera DNA dupla fita ao qual o fluoróforo cianina assimétrica é capaz de se ligar, resultando na emissão de fluorescência e mascarando os dados de fluorescência dos GIs e dos GRs.
- Temperatura de desnaturação (T_m) dos iniciadores: geralmente entre 58 °C e 62 °C.
- Porcentagem de conteúdo GC dos iniciadores: geralmente entre 45% e 55%.

Existem diversos programas para o desenho de iniciadores em que esses parâmetros são analisados para uma escolha adequada. Entre os mais utilizados está o primer3Plus¹ (disponível gratuitamente na internet). Apesar de esses programas serem eficientes no desenho

¹ Disponível em: <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>>.

de iniciadores, ainda há necessidade de testá-los em curvas-padrão para determinação de sua eficiência.

Diversos programas oferecem a possibilidade de fazer análises estatísticas de dados, sendo alguns gratuitos, geralmente desenvolvidos por universidades, e outros a serem adquiridos. Entretanto, qualquer que seja o programa escolhido, é necessário o conhecimento básico de estatística para que o usuário possa decidir quais ferramentas do programa aplicar ao seu experimento.

O número de cópias de um transgene pode ser determinado por quantificação relativa, dividindo-se o número absoluto obtido para o transgene pelo número absoluto obtido para o GR. Para tanto, é necessário que as eficiências da reação sejam próximas, e a regressão linear das duas curvas-padrão seja próxima de 1,0 (YANG et al., 2005; YUAN et al., 2007).

5 Quantificação absoluta

O mesmo princípio, material e procedimento descritos para a quantificação relativa (seção 3 deste capítulo) se aplicam para a quantificação absoluta, com a diferença de que é necessário o preparo da curva-padrão usando quantidades conhecidas de moléculas da fita-molde. A fórmula usada no cálculo do número de cópias dependerá do tipo de amostra utilizada, que poderá ser de DNA, RNA, cDNA ou oligonucleotídeos. O número de cópias é calculado pela seguinte fórmula:

Número de cópias em 100 ng/ μ L =

$$\left(\frac{\frac{xg}{\mu L} \text{ DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em } bp \times 660} \right) = 6,022 \times 10^{23}$$

A curva-padrão é geralmente estabelecida com quatro diluições de base 10 entre 10^{-3} e 10^{-6} . Os valores das amostras desconhecidas devem estar todos dentro do limite estabelecido pelos pontos de maior e menor quantidade da curva. É importante salientar que a curva-padrão tem que ser incluída em cada placa de qPCR. Para análise de número de cópias de plantas transgênicas, tem que se estabelecer uma curva padrão para um GR com número de cópias conhecido, e estabelecer outra curva padrão para o transgene.

6 Observações

A montagem de uma reação de qPCR requer os mesmos cuidados de uma reação de PCR convencional para evitar contaminação ambiental ou cruzada entre as amostras. A utilização de luvas sem talco, pipetas exclusivas para PCR e ponteiras com filtro são cuidados comuns entre laboratórios que utilizam essa técnica.

As reações de qPCR deverão ser feitas em triplicatas biológicas, o que facilita a análise estatística e aumenta a confiabilidade dos resultados.

É desejável a utilização de robôs programados ou micropipetas automáticas para realizar a distribuição dos

reagentes e amostras em placa ou tubos. A automação pode aumentar a reprodutibilidade das repetições intra e interexperimentais e reduz os erros por pipetagem, além de poupar o manipulador do desgaste da pipetagem manual.

A formação de produtos inespecíficos pode ser detectada ao se analisar a curva de desnaturação quando se utiliza o fluoróforo cianina assimétrica, que é gerada no final da reação de qPCR pelo aumento gradativo da temperatura de 60 °C a 95 °C. O aquecimento leva à desnaturação da dupla fita de DNA (produto da amplificação), que é medida pelo valor da fluorescência a cada incremento de 0,2 °C a 0,5 °C de temperatura. A temperatura de desnaturação (*melting temperature* – Tm) depende essencialmente do tamanho da molécula e da sua composição, ou seja, do conteúdo relativo de CG, e é específica de cada produto de amplificação. Na reação de qPCR, quando se atinge a temperatura de desnaturação, ocorre uma diminuição súbita de fluorescência em razão da liberação do corante (Figura 5). A análise da curva de desnaturação é um aspecto importante da reação de qPCR, uma vez que permite inferir a especificidade do produto gerado. Reações altamente específicas têm apenas um pico de desnaturação relativo a apenas um fragmento específico amplificado (Figura 5A). A presença de picos distintos indica que amplicons distintos foram produzidos na reação, podendo inclusive detectar a presença de dímeros entre os iniciadores (Figura 5B). Além de determinar a especificidade da reação de qPCR, a análise da curva de desnaturação é a base de algumas aplicações da qPCR, como detectar diferenças entre membros de famílias gênicas, diferenças alélicas e genotipagem de

populações e patógenos, como subtipos virais. Diferenças entre sequências, inclusive de apenas um nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism – SNP*), podem ser detectadas pelo desvio do pico a curva de desnaturação.

Para garantir resultados confiáveis, é importante repetir o experimento com diferentes extrações de RNA nas mesmas condições experimentais. Muitas vezes, isso pode provocar resultados discrepantes, o que pode ser evitado

pela padronização rígida das metodologias de coleta de tecido (especialmente em se tratando de amostras coletadas ao longo do desenvolvimento de um órgão ou tecido), de extração de RNA e de síntese de cDNA. Essa padronização garantirá resultados mais consistentes entre experimentos e repetições biológicas. É importante lembrar que alterações de resultados podem ser provocadas por mudança de reagentes, principalmente do próprio fluoróforo cianina assimétrica, bem como da máquina de qPCR.

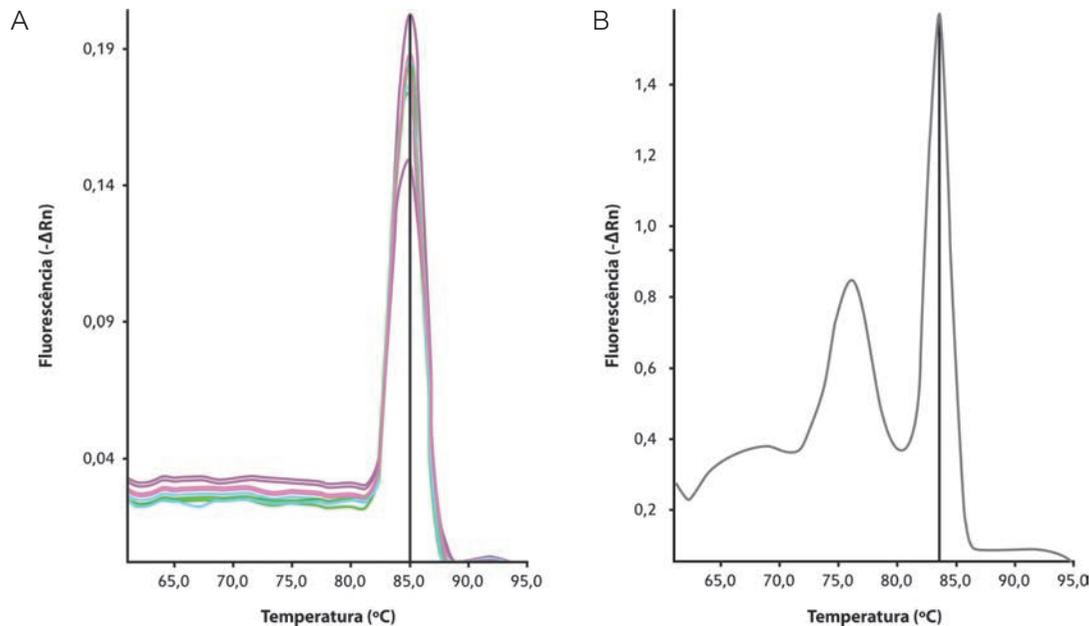


Figura 5. Análise da especificidade de reação pela análise da curva de desnaturação. Ao final da qPCR, o produto da reação (amplicon) é submetido a aumento de temperatura com a fluorescência monitorada. A queda de fluorescência indica a desnaturação da dupla fita do produto, que depende de seu tamanho e da composição em guanina e citosina (% GC). Produtos específicos apresentam apenas um pico (A). Mais de um pico indica a presença de produtos inespecíficos (B). Esse parâmetro pode ser utilizado para distinguir alelos, por exemplo, em que polimorfismos vão gerar curvas de desnaturação distintas.

A medida da variação entre as unidades experimentais de um mesmo tratamento constitui o erro experimental. Uma estimativa do erro experimental é necessária para testes de significância e para estimativa de intervalos de confiança. Essa estimativa é gerada pela repetição de um tratamento no experimento. Assim, o desenho experimental deve prever repetições biológicas e técnicas. As repetições técnicas retratam a reprodutibilidade da técnica de qPCR, que é testada pela quantificação de uma mesma amostra diversas vezes, visando a identificar variações instrumentais, de reagentes ou de manipulação. As condições de qPCR devem ser alteradas até que as repetições técnicas indiquem pouca ou nenhuma variabilidade. As repetições biológicas indicam as variações devidas às condições experimentais, como variabilidade genética entre indivíduos ou oscilações ambientais durante um determinado tratamento. Como a qPCR é um método de alta sensibilidade, as réplicas biológicas devem ser executadas com extremo cuidado para evitar variações que dificultem ou mesmo inviabilizem as análises estatísticas dos dados; recomendam-se, por exemplo, condições ambientais bem controladas, como em câmara de crescimento, e plantas de genótipos semelhantes, como linhagens quase isogênicas (*Near isogenic lines – NILs*) ou clones.

7 Referências

- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- BUBNER, B.; BALDWIN, I. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 263-271, 2004.
- CAMPAN, M.; WEISENBERGER, D.; TRINH, B.; LAIRD, P. MethyLight. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 507, p. 325-337, 2009.
- ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL, F. R.; SMITH, T. F. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.
- FREEMAN, W.; WALKER, S.; VRANA, K. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, London, v. 26, n. 1, p. 112-122, 1999.
- GONI, R.; GARCÍA, P.; FOISSAC, S. The qPCR data statistical analysis. **Integromics White Paper**, [S.l.], p. 1-9, 2009.
- HEID, C.; STEVENS, J.; LIVAK, K.; WILLIAMS, P. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- LIND, K.; KUBISTA, M. Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 304, n. 1/2, p. 107-116, 2005.
- LIVAK, K.; FLOOD, S.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 4, n. 6, p. 357-362, 1995.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, Duluth, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MACKAY, I. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.
- MACKAY, J.; WRIGHT, C.; BONFIGLIOLI, R. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. **Plant Methods**, London, v. 4, p. 8, 2008.
- MORRISON, T.; WEIS, J.; WITTEWER, C. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR® Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, London, v. 24, n. 6, p. 954-958, 1998.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PUPPO, F.; MUSSO, M.; PIRULLI, D.; GRISERI, P.; BACHETTI, T.; CROVELLA, S.; PATRONE, G.; CECCHERINI, I.; RAVAZZOLO, R. Comparative genomic sequence analysis coupled to chromatin immunoprecipitation: a screening procedure applied to search for regulatory elements at the RET locus. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 23, n. 3, p. 269-274, 2005.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 15, n. 2, p. 115-122, 2000.

RIEU, I.; POWERS, S. J. Real-Time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 4, p. 1031-1033, 2009.

SANDOVAL, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; TUR, G.; SERVIDDIO, G.; PEREDA, J.; BOUKABA, A.; SASTRE, J.; TORRES, L.; FRANCO, L.; LÓPEZ-RODAS, G. RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 11, p. e88, 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SUZUKI, T.; HIGGINS, P.; CRAWFORD, D. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, London, v. 29, n. 2, p. 332-337, 2000.

VANDEMARK, G. J.; MIKLAS, P. N. Genotyping common bean for the potyvirus resistance alleles I and bc-12 with a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, St.Paul, v. 95, n. 5, p. 499-505, 2005.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

WITTEWER, C. T.; REED, G. H.; GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; PRYOR, R. J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 6, p. 853-860, 2003.

WONG, M.; MEDRANO, J. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, London, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WU, Y. L.; SAVELLI, S. L.; YANG, Y.; ZHOU, B.; ROVIN, B. H.; BIRMINGHAM, D. J.; NAGARAJA, H. N.; HEBERT, L. A.; YU, C. Y. Sensitive and specific real-time polymerase chain reaction assays to accurately determine Copy Number Variations (CNVs) of human complement C4A, C4B, C4-Long, C4-Short, and RCCX modules: elucidation of C4 CNVs in 50 consanguineous subjects with defined HLA genotypes. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 179, p. 3012-3025, 2007.

YANG, L.; DING, J.; ZHANG, C.; JIA, J.; WENG, H.; LIU, W.; ZHANG, D. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 10/11, p. 759-763, 2005.

YUAN, J.; BURRIS, J.; STEWART, N.; MENTEWAB, A.; STEWART JUNIOR, C. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Bioinformatics**, London, v. 8, n. S6, p. 1-12, 2007. Supplement 7.

Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais

Diva Maria de Alencar Dusi

1 Introdução

A hibridização *in situ* é o pareamento e a ligação específica de uma sequência de ácido nucleico marcada (sonda) a uma sequência complementar (alvo) em um material biológico morfológicamente preservado. Essa técnica permite a localização de sequências de RNA ou DNA em amostras de cromossomos, células, órgãos, organismos, ou em seções de tecidos. O local em que ocorreu a hibridização é indicado pelo local em que a sonda é visualizada (WILKINSON, 1992).

Desde seu desenvolvimento para a localização de DNA por método radioativo, há mais de 45 anos (PARDUE; GALL, 1969), essa técnica modificou-se e seu uso foi diversificado (WARFORD; LAUDER, 1991). Atualmente, a hibridização *in situ* tem sido bastante utilizada para a detecção de RNA mensageiro (mRNA) em estudos de expressão de genes e também na localização de genes em cromossomos por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH, Capítulo 13). Quando combinadas numa mesma preparação, as técnicas podem ser utilizadas na visualização da organização de transgenes em núcleos em interfase, assim como na localização dos transcritos de RNA (SANTOS et al., 2006).

Na localização de mRNA, as sondas mais utilizadas são as de RNA, por produzirem híbridos mais estáveis do que as de DNA. Para a confecção da sonda, pode-se utilizar marcação por compostos radioativos ou por métodos não radioativos, que é possível pela introdução de

uma molécula repórter na sonda, de RNA. Nesse caso, um hapteno, como a digoxigenina (SCHMITZ et al., 1991) ou a biotina, é incorporado à sonda, e sua detecção pode ser de duas formas: a) com anticorpos marcados com os fluoróforos, por exemplo, fluoresceína ou rodamina, seguida de visualização ao microscópio de fluorescência; b) com anticorpos marcados com a enzima fosfatase alcalina, a visualização sendo feita após reação colorimétrica com substratos, que, em presença da enzima, reagem resultando em um sedimento colorido no local da reação.

A hibridização *in situ* com sonda de mRNA marcada com haptenos, não radioativa, é uma técnica que apresenta boa resolução (uma célula), rapidez de resultados e marcação de alta estabilidade. Outro benefício da utilização de sondas não radioativas é a possibilidade de se fazer *wholemout*, ou seja, hibridização em órgão ou organismo completo (GARCÍA-AGUILAR et al., 2005; SCHMIDT et al., 1997; WILKINSON, 1992).

Por possibilitar a detecção de expressão local e temporal de genes, a hibridização *in situ* é utilizada nas análises da expressão de transgenes, em especial daqueles regulados por promotores com expressão específica (espacial ou temporal), por exemplo, em determinados órgãos, tecidos ou células (SCHOLZ-STARKE et al., 2003; TRINDADE et al., 2003; YAMAMOTO et al., 1991) ou ainda por promotores induzíveis sob condições específicas. A hibridização *in situ* é especialmente importante em plantas recalcitrantes à transformação, para as quais normalmente não se faz a confirmação prévia de espe-

cificidade do promotor utilizando um gene repórter. Além disso, a técnica auxilia no estudo de função gênica durante o desenvolvimento (LACERDA et al., 2012), pela localização da expressão de genes em genótipos silvestres (ROMANEL et al., 2011) e em mutantes obtidos por transformação genética (JAVELLE et al., 2011; ZHOU et al., 2012). A hibridização in situ tem uma vantagem sobre a imunocitoquímica, uma vez que nessa última, a reação de imunolocalização que é visualizada numa célula pode ser resultado da síntese da proteína realizada em outra célula e, então, transportada ou secretada (KIERNAN, 2008).

A técnica de hibridização in situ envolve seis etapas principais:

Preparação do material de laboratório e das lâminas de microscopia

Toda a vidraria e os tampões a serem utilizados antes e durante a hibridização devem estar sem RNase. Em geral, a vidraria é exposta, por várias horas, a um tratamento térmico para eliminação de nucleases em estufas que chegam de 180 °C a 300 °C. As lâminas de vidro de microscopia devem ser tratadas com poli-L-lisina ou organosilano (aminopropiltrióxido-silano) para melhor retenção das secções do tecido vegetal depositado.

Preparação do material biológico

O material vegetal deve ser fixado para preservação da morfologia das células e tecidos e retenção do ácido nucleico alvo, protegendo-o contra a ação de nucleases.

A fixação deve levar em conta a natureza e o tamanho do material biológico, o tampão utilizado e o agente fixador. Agentes fixadores com alto teor de etanol, como, por exemplo, o FAA (formalina:ácido acético glacial:álcool etílico) (ITO; SHINOZAKI, 2002), podem ser utilizados em experimentos de hibridização in situ principalmente em materiais difíceis de fixar. Entretanto, os agentes fixadores que combinam paraformaldeído e glutaraldeído em baixo teor, em solução aquosa, são muito utilizados por promoverem boa retenção do RNA e acessibilidade da sonda ao mesmo tempo em que preservam a morfologia do material biológico. Uma vez fixado, o material pode ser preparado e utilizado diretamente para hibridização do tipo *wholemout* (SCHMIDT et al., 1996) ou passar por um processo de infiltração em uma matriz de parafina (SANTA-CATARINA et al., 2012; STEINER et al., 2012), ou de um composto à base de parafina, como a mistura parafina com poli-isobutileno, ou mesmo de resina do tipo butil metil metacrilato (BMM), e ser seccionado (SALAJ et al., 2008). Neste capítulo, serão descritos dois métodos de infiltração: o primeiro utilizando mistura parafina com poli-isobutileno, e o segundo, BMM. A mistura parafina com poli-isobutileno é mais macia e permite cortes seriados em fita de espessura de até 5 µm. O BMM é uma resina mais firme que produz cortes de secções isoladas de até 2 µm. O BMM geralmente produz melhor preservação na morfologia nas secções de tecido quando comparado com as misturas à base de parafina. No entanto, os produtos à base de parafina são de uso mais comum em laboratórios.

Síntese da sonda de RNA marcada com digoxigenina

A sequência de cDNA molde deve estar clonada em um vetor entre os promotores das RNA polimerases de origem viral (T7 e SP6 ou T3 RNA polimerase). A transcrição da sequência de cDNA em RNA fita simples pode ser feita a partir de vetor linearizado ou a partir de produto de PCR. A marcação da sonda é feita durante a transcrição pela RNA polimerase com a utilização de uridina-5'-trifosfato (UTP) marcada com digoxigenina. A sonda será mais competente para detectar apenas a sequência-alvo, quanto mais específica for a sequência utilizada como molde.

Pré-hibridização

Os tratamentos de pré-hibridização visam à permeabilização do tecido para facilitar a penetração da sonda, o alcance da sequência-alvo e a redução de ruído não específico (*background*). Para permeabilizar o tecido, o tratamento mais utilizado é a aplicação de proteinase K, mas detergentes e ácidos (LEWIS; WELLS, 1992) também podem ser utilizados. Após o uso de proteinase K, é desejável fazer uma segunda e breve fixação do tecido, denominada pós-fixação (SAMANANI et al., 2005). A redução do *background* causado por ligações não específicas a grupos amino positivamente carregados pode ser feita pela incubação do tecido com trietanolamina e anidrido acético, neutralizando cargas positivas (HOUBEN et al., 2006; SAMANANI et al., 2005). Para verificar a integridade do RNA no tecido, após todo o processo de fixação, infiltração e seccionamento, amostras do tecido podem ser

coradas com laranja de acridina que indica, em laranja, a presença de RNA total (BIMAL et al., 1995).

Hibridização da sonda com o ácido nucleico alvo no tecido ou órgão

A hibridização é feita com a sonda antissenso, complementar a sequência-alvo. Entretanto, controles de hibridização devem ser feitos, e o mais comum é o controle negativo que é realizado fazendo-se a hibridização do material com a sonda senso ou com outra sonda de mesmo comprimento, já previamente conhecida, por não hibridizar no tecido utilizado. As condições que interferem no grau de associação das fitas de ácidos nucleicos, a estringência, podem ser ajustadas para elevar ao máximo o pareamento e a ligação específicos da sonda com as sequências-alvo complementares. Na prática, a concentração dos sais e da formamida são mantidas, e ajusta-se a estringência com a adequação, principalmente, da temperatura. A temperatura ideal de hibridização depende da natureza da sonda, sendo os híbridos RNA:RNA mais estáveis, e é de 10 °C a 25 °C abaixo da T_m – *melting temperature* ou temperatura de desnaturação (Capítulo 15). As temperaturas entre 42 °C e 60 °C são as mais utilizadas (ALVES et al., 2007; SAMANANI et al., 2005; SANTA-CATARINA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012).

Pós-hibridização

Após a hibridização, são feitas lavagens para retirar toda a sonda que não hibridizou. Alguns autores também tratam o tecido com RNase A, para remoção de todo fragmento de sonda não hibridizado (DEBLOCK; DEBROUWER,

1993; SAMANANI et al., 2005). Após o bloqueio dos sítios de ligação não específicos, uma reação imunocitoquímica é realizada, durante a qual ocorre a incubação com um anticorpo específico para a digoxigenina acoplado a um marcador, que pode ser uma enzima (como fosfatase alcalina e peroxidase) ou um fluoróforo como a fluoresceína ou a rodamina. A detecção do complexo antígeno/anticorpo pode ser visualizada por meio colorimétrico, ou fluorimétrico. O método que tem sido mais utilizado é o colorimétrico, em que a reação imunoquímica ocorre com o anticorpo antidigoxigenina acoplado à enzima fosfatase alcalina (antidig AP fragmentos Fab, AP para fosfatase alcalina). Essa enzima desfosforila o substrato BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), que, na presença do agente oxidante NBT (Nitroblue tetrazólio cloreto), se oxida e forma um sedimento de cor azul-escura. O NBT, quando reduzido, também forma um sedimento de cor azul púrpura. Os dois corantes concentram-se na região onde o híbrido sonda-ácido nucleico alvo foi formado. A localização da sonda pode ser observada por microscopia de luz de campo claro (para seções de tecido) ou de contraste de interferência diferencial (para *wholemout*). Em reações que utilizam fluorocromos, as observações podem ser feitas utilizando-se microscópio de fluorescência com filtro adequado ao fluoróforo utilizado.

Neste capítulo, é apresentado um protocolo básico de detecção de transcritos em seções utilizando sonda de mRNA marcada com digoxigenina, baseado nos protocolos de hibridização *in situ* descritos por Alves et al. (2007), Bimal et al. (1995), DIG Application... (2008),

Dusi (2001) e Engler et al. (2001). A síntese da sonda se baseia em Javelle et al. (2011). A preparação de material biológico em BMM foi baseada em Baskin et al. (1992) e Kronenberger et al. (1993). O teste de laranja de acridina foi baseado em Bimal et al. (1995). A preparação de NBT e BCIP é feita de acordo com instruções da Thermo Scientific (2011). Nas notas, são descritas alternativas ao protocolo apresentado.

2 Preparação do material de laboratório e das lâminas de microscopia

2.1 Material

- Cubas de vidro para coloração de lâminas de vidro.
- Forno ou estufa para esterilização que atinja 180 °C a 250 °C.
- Lâminas de vidro para microscopia e lamínulas de 22 mm x 50 mm.
- Ponteiras para micropipetas.
- Solução de poli-L-lisina: 100 µg/mL de poli-L-lisina em tampão 10 mM de tris-HCl (pH 8,0; Apêndice 4).

Poli-L-lisina pode ser guardada a -20 °C em estoque de 4 mg/mL.

- Tubos de 1,5 mL para microcentrífugas.

2.2 Procedimento

1. Lavar e secar totalmente toda a vidraria, garrafas, cubas de vidro, lâminas para microscopia e lamínulas. Cobrir o material com papel alumínio e colocar em estufa a 250 °C por 4 horas para eliminação de RNAses.

Quando expostas a altas temperaturas, vidrarias com umidade podem rachar.

As ponteiras e tubos de microcentrífuga novos devem ser manuseados com luvas novas e autoclavados.

2. Tratar as lâminas de microscopia sem RNase em solução de poli-L-lisina imergindo-as várias vezes por pelo menos 10 minutos.
3. Secar as lâminas por 1 dia em capela de exaustão e guardar a -20 °C numa caixa selada com fita adesiva crepe.

Lâminas de vidro de microscopia sem RNase previamente tratadas com poli-L-lisina ou organossilano são encontradas no mercado. Como opção, é possível tratar as lâminas sem RNase com organossilano (3-aminopropiltrióxido-silano): imergir as lâminas várias vezes em etanol 100% ou acetona; em seguida, imergir as lâminas em organossilano 1% (p/v) e etanol 100% ou acetona.

4. Proceder à preparação do material biológico que pode ser feita utilizando mistura de parafina com poli-isobutileno (seção 3 deste capítulo) ou BMM (seção 4 deste capítulo).

2.3 Observações

Toda a vidraria a ser utilizada antes e durante a hibridização deve estar sem RNase. Material contaminado

com RNAses pode degradar a sonda e os RNAs presentes na amostra biológica, interferindo diretamente no resultado da hibridização.

Esterilização em autoclave não elimina as RNAses.

Na ausência de forno que permita temperatura de até 250 °C, para tratar a vidraria, é possível utilizar tratamento de até 180 °C por 2 a 18 horas.

3 Preparação do material biológico utilizando mistura de parafina com poli-isobutileno (“parafina”)

3.1 Material

- Água destilada e esterilizada em autoclave.
- Água tratada com DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Barra magnética e agitador magnético com aquecimento.
- Base para blocos de parafina.
- Bisturi ou lâmina para cortar o material vegetal.
- Cubas de vidro para lâminas de microscopia.
- Estufa entre 56 °C e 58 °C.

- Etanol absoluto.
- Faca de aço para micrótomo.
- Fita indicadora de pH.
- Formas de metal ou placas de Petri descartáveis (35 mm x 10 mm).
- Lâminas de vidro de microscopia tratadas com poli-L-lisina.
- Microscópio estereoscópico e microscópio de luz.
- Micrótomo.
- Parafina.
- Paraformaldeído
- Formaldeído 5%: em um béquer contendo 30 mL de água DEPC, adicionar 2 g de paraformaldeído. Incluir a barra magnética e colocar o béquer sobre agitador magnético com aquecimento a 65 °C. Adicionar uma a uma gotas de NaOH 5 N (Apêndice 4) até dissolver totalmente o paraformaldeído. Ajustar o volume para 40 mL.



Paraformaldeído e formaldeído são considerados prováveis agentes mutagênicos e altamente tóxicos por inalação, contato com pele e por ingestão. Provocam queimaduras e apresentam risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 (Apêndice 4).

- Solução de fixação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Formaldeído 5%	40 mL	4%
Glutaraldeído 25%	0,5 mL	0,25%
Tampão fosfato de sódio 1 M, pH 7,0	0,5 mL	10 mM
H ₂ O DEPC	q.s.p. 50 mL	

O pH da solução ficará entre 7,0 e 7,4; checar com uma fita indicadora de pH. Preparar a solução imediatamente antes da utilização.

- Solução comercial de glutaraldeído 25%.



Glutaraldeído é altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Xilol.



Xilol é inflamável, irritante aos olhos, pele e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

3.2 Procedimento

1. Coletar e cortar o material biológico em pequenos pedaços e colocar imediatamente em frasco de vidro de 10 mL contendo 3 mL de solução de fixação. Aplicar vácuo parcial por 1 hora, trocar a solução e deixar por 4 horas à temperatura ambiente ou a 4 °C por aproximadamente 18 horas.

Para materiais difíceis de fixar, pode-se utilizar como fixador o FAA (Formaldeído 37%, ácido acético glacial, álcool etílico 70% (v/v) na

proporção de 5:5:90). A concentração de álcool etílico 50% (v/v) também pode ser utilizada. Nesse caso, após a retirada do fixador, deve-se seguir direto para a etapa 4 deste item.

2. Remover a solução de fixação.
3. Lavar o material em tampão fosfato de sódio 10 mM.
4. Desidratar o material em série crescente de etanol (10%, 30%, 50%, 70%), por 30 minutos cada vez, e etanol 96% e 100% três vezes, por 1 hora cada vez.

O material pode ser guardado em etanol 70% a 4 °C por 12–18 horas ou em etanol absoluto a -20 °C por muitos meses.

5. Transferir o material para solução de etanol: xilol 3:1, 1:1, 1:3 e, finalmente, três vezes em xilol puro, deixando por 30 minutos em cada solução.
6. Adicionar ao xilol um terço do volume de parafina e deixar por 1 dia ou adicionar as pastilhas de parafina aos poucos.
7. Adicionar ao xilol: parafina mais um volume de parafina e deixar por 1 dia, em estufa à temperatura de fusão indicada pelo fabricante (56 °C a 58 °C) dentro de capela de exaustão.
8. Abrir o frasco.

Nessas condições, o xilol vai evaporar, restando ao final apenas a parafina.

9. Fazer a troca da parafina por nova previamente derretida na estufa por três vezes, deixando por 1 dia cada vez.
10. Colocar as formas de metal, ou as placas de Petri descartáveis, em uma chapa preaquecida entre 56 °C

e 58 °C e verter as amostras em parafina nas formas. Posicionar as amostras com auxílio de estilete. Desligar a chapa e deixar a parafina solidificar lentamente por 1 dia.

11. Montar o bloco de parafina numa base e seccionar numa espessura de 5 µm a 10 µm, em micrótomo, com faca de aço, em ângulo de 6 graus.
12. Em lâmina de vidro de microscopia, previamente tratada, contendo gota de 1 mL de água sem RNase, depositar as fitas de parafina com as secções.
13. Colocar as lâminas em placa preaquecida a 42 °C, previamente limpa, até esticar a fita.
14. Retirar a água, com o auxílio de papel filtro ou papel toalha, e deixar secando na placa a 42 °C por aproximadamente 12 horas para as secções ficarem bem aderidas à lâmina.

Manter as lâminas cobertas durante a secagem em placa a 42 °C para proteger o material.

Se necessário, as lâminas contendo as secções podem ser armazenadas em caixas plásticas próprias para lâminas de microscopia a 4 °C até a hora de remover a parafina.

15. Remover a parafina em xilol, colocando as lâminas com as secções na cuba de vidro contendo xilol por 15 minutos, duas vezes; xilol: etanol (1:1), 5 minutos; etanol, 10 minutos; etanol: água (DEPC), 5 minutos; água (DEPC) por duas vezes, 5 minutos cada vez sob leve agitação.

Se necessário, as lâminas contendo as secções podem ser armazenadas em caixas plásticas próprias para lâminas de microscopia -20 °C até a hora de utilizar.

3.3 Observações

A infiltração em parafina permite cortes seriados que facilitam a análise, enquanto a infiltração em BMM permite melhor preservação da morfologia do material biológico.

Tanto a infiltração com parafina quanto com BMM podem ser feitas mais lentamente e em maior número de gradientes, sendo o tempo de infiltração proporcional ao tamanho das amostras.

4 Preparação do material biológico utilizando butil metil metacrilato (BMM)

4.1 Material

- Acetona.



Acetona é facilmente inflamável, irritante aos olhos, pele e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas em capela de exaustão.

- Água destilada e esterilizada em autoclave.
- Água tratada com DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Câmara de luz ultravioleta.



A exposição à **radiação ultravioleta** pode causar danos à retina e à pele. Sua manipulação deve ser feita com óculos de proteção específicos para luz UV. Procurar não expor a pele, usando jaleco de mangas longas e luvas.

- Cápsulas plásticas ou do tipo gelatina.
- Clorofórmio.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Cubas de vidro para lâminas de microscopia.
- Etanol absoluto.
- Faca de vidro para ultramicrotomo.
- Formaldeído 5% (como descrito no item 3.1 Material).



Formaldeído é considerado provável agente mutagênico e altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Ultramicrotomo.
- Lâminas de vidro de microscopia tratadas com poli-L-lisina.
- Microscópio estereoscópico e microscópio de luz.

- Resina butil metil metacrilato (BMM):

Componente	Quantidade	Concentração final
Butil metacrilato	40 mL	80%
Metil metacrilato	10 mL	20%
Etoxi-benzoína	250 mg	5 mg/mL
Volume total	50 mL	

Misturar, evitando a formação de bolhas e o contato do BMM com o ar. Guardar a 4 °C ou a -20 °C.



BMM e seus componentes são extremamente tóxicos e podem ser voláteis. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Solução de fixação (como descrito no item 3.1 Material).

A solução de fixação contém formaldeído e glutaraldeído que são extremamente tóxicos e voláteis. Manipular com luvas e utilizar capela de exaustão.

4.2 Procedimento

1. Fixar e desidratar o material vegetal como descrito nas etapas 1 a 4 do item 3.2 Procedimento.
2. Transferir o material para uma série de soluções de etanol:BMM nas proporções (v/v) de 5:1, 5:2; 5:3, 5:4, 1:1, 4:5; 3:5, 2:5, 1:5 e em BMM puro por duas vezes, por 4 horas cada vez, a 4 °C.

Se necessário, deixar por 12 horas em qualquer das etapas.

3. Colocar o material em cápsulas plásticas ou do tipo gelatina, completar com BMM, fechar a tampa e colocar as cápsulas em suporte apropriado.
4. Polimerizar, colocando o suporte com as cápsulas em câmara fechada sob luz UV, 24 horas (ou mais), a -20 °C.

A distância da cápsula à lâmpada deve ser, no mínimo, de 15 cm.

Após a polimerização da resina, guardar as cápsulas a 4 °C.

5. Montar o bloco de BMM em suporte para micrótomo.
6. Cortar a superfície do bloco de BMM num formato trapezoidal.

A amostra deve ser orientada de forma a se cortar da base para o topo do trapézio, produzindo assim uma secção, contendo uma fatia da amostra na orientação desejada (longitudinal ou transversal).

7. Seccionar, numa espessura de 2 µm a 4 µm em ultramicrótomo, com navalha de vidro (ângulo de 6°), e colocar as secções em gotas de água tratada com DEPC em lâminas de vidro de microscopia.
8. Esticar as secções com vapor de clorofórmio, aplicado em um chumaço de algodão, e deixar secar em placa preaquecida a 60 °C, por 1 hora.

As lâminas contendo as secções podem ser armazenadas em caixas plásticas próprias para lâminas de microscopia a 4 °C até a hora de remover o BMM.

9. Remover o BMM, colocando as lâminas com as secções em cuba de vidro contendo acetona duas vezes por 10 a 15 minutos. Trocar a acetona por mistura de acetona:água tratada com DEPC (1:1, v/v). Após 5 mi-

nutos, colocar as lâminas em água tratada com DEPC. Trocar a água e deixar por mais 5 minutos.

As lâminas contendo as seções podem ser armazenadas em caixas plásticas próprias para lâminas de microscopia a -20 °C até a hora de utilizar.

4.3 Observação

Caso o material vegetal tenha facilidade em oxidar, adicionar 10 mM DTT (ditiotreitól) em etanol 96% ou em etanol absoluto quando for fazer a desidratação, e também acrescentar 0,08 g de DTT na mistura de BMM e misturar borbulhando gás nitrogênio através da mistura por 15 minutos.

5 Síntese da sonda de RNA marcada com digoxigenina

5.1 Material

- Acetato de sódio 3 M, pH 5,2 (Apêndice 4).

A solução de acetato de sódio deve ser preparada utilizando reagente manuseado com material e recipiente sem RNase e com água DEPC.

- Ácido acético 10% (v/v).



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Banho-maria.
- Clorofórmio.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Manter o recipiente bem fechado. Sua manipulação deve ser feita com luvas de nitrila, óculos e máscara em capela de exaustão.

- DNase I (sem RNase).
- EDTA 0,2 M, pH 8,0 (Apêndice 4) sem RNase.
- Etanol absoluto e solução de etanol 70% (v/v).
- Fenol.



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Formamida deionizada 50%.



Formamida é altamente tóxica por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE sem RNase (Apêndice 4).
- Inibidor de RNase 20 U/ μ L.
- Microcentrífuga.

- Mistura de NTPs contendo DIG-UTP 10X (tampão Tris-HCl, pH 7,5 contendo ATP 10 mM , CTP 10 mM, GTP 10mM, UTP 6,5 mM, DIG-UTP 3,5 mM).

A mistura é adquirida pronta do fabricante, dentro do kit de marcação de RNA com digoxigenina ou separadamente.

- RNA polimerase SP6 e T7 e tampão de transcrição 10X.

O tampão pode ser adquirido juntamente com RNA polimerase SP6 e T7 ou dentro do kit de marcação de RNA com digoxigenina.

- Suporte para tubos de microcentrífuga.
- Solução de hidrólise de sonda:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃) 200 mM	30 µL	120 mM
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 200 mM	20 µL	80 mM
Volume total	50 µL	

A solução de hidrólise deve ser preparada utilizando reagentes manuseados com materiais e recipientes sem RNase e água DEPC.

- Tubos de microcentrífuga livres de RNase.

5.2 Procedimento

1. Realizar uma minipreparação do plasmídeo (Capítulo 2) contendo o gene alvo clonado entre os pro-

motores T7 e SP6 (ou T3), para ligação das respectivas RNA polimerases.

2. Linearizar o plasmídeo em duas reações separadas para a síntese das sondas senso e antissenso, com enzimas de restrição que flanqueiam a sequência de interesse conforme esquematizado na Figura 1. Utilizar sempre reagentes sem RNases.

A linearização do plasmídeo deve ser feita de forma que a transcrição termine logo após o inserto.

Evite a utilização de enzima que gere extremidade coesiva 3'.

Idealmente, os fragmentos do gene estudado devem ter entre 400 pb e 600 pb para facilitar a síntese e também evitar possíveis regiões de similaridade com sequências não alvo.

3. Purificar o plasmídeo linearizado, acrescentando, a 20 µL do plasmídeo linearizado, 180 µL de água tratada com DEPC, e adicionar 100 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio. Misturar em agitador tipo Vortex e centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga e adicionar 200 µL de clorofórmio, misturar em agitador tipo Vortex e centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm. Transferir 180 µL do sobrenadante para um novo tubo.
4. Precipitar adicionando 18 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 400 µL de etanol absoluto, misturar e incubar a -20 °C por 8 horas ou a -80 °C por 1 hora. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm à temperatura ambiente. Lavar o sedimento com 500 µL de etanol 70% (v/v) a 4 °C e centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm.

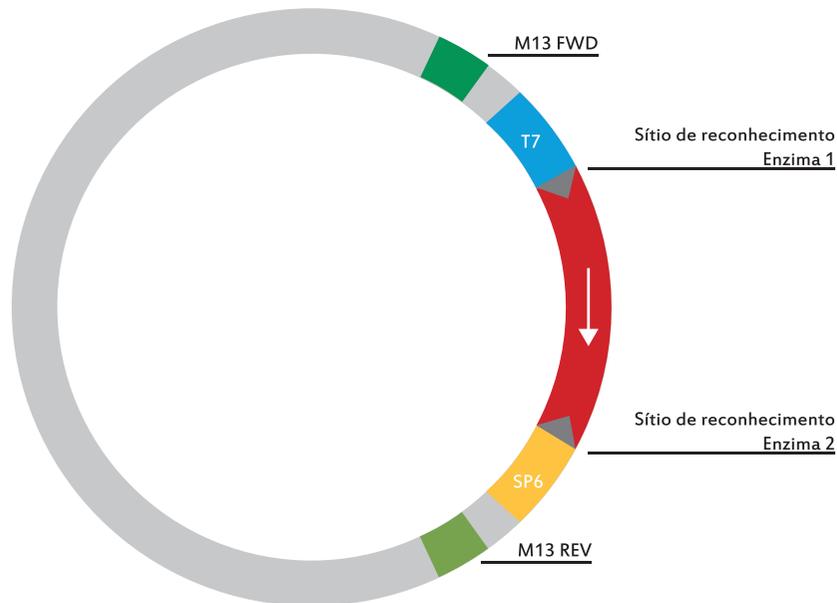
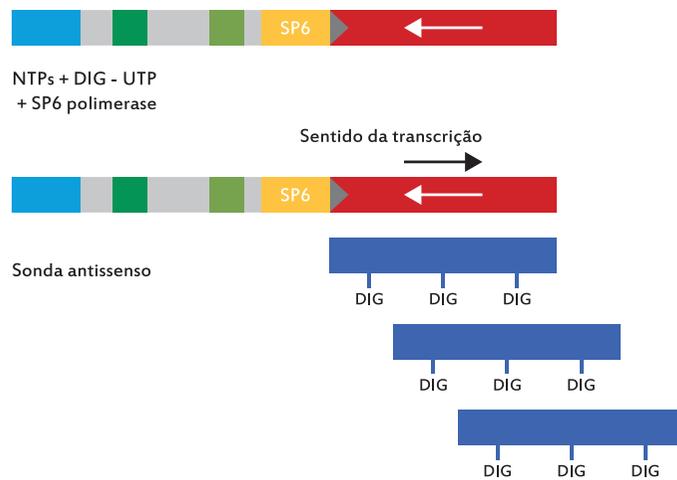


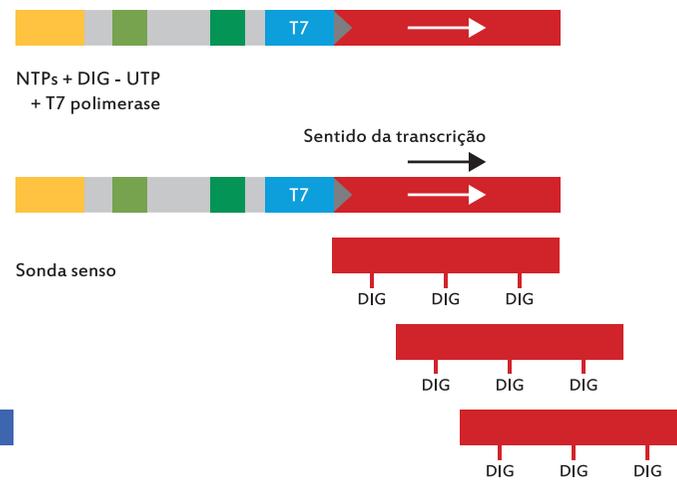
Figura 1. Esquema da preparação da sonda marcada com digoxigenina. A sequência de cDNA molde (em vermelho) está clonada no plasmídio circular entre os promotores das T7 e SP6 RNA polimerases no sentido T7 para SP6, indicado pela seta branca. O plasmídio é linearizado em duas reações separadas com enzimas de restrição (por exemplo, enzimas 1 e 2) que reconhecem sítios em cada lado da sequência cDNA molde. Na presença de uridina-5'-trifosfato (UTP) marcada com digoxigenina (DIG-UTP), a transcrição da sonda antissenso (enzima 1) é feita utilizando a enzima SP6 polimerase, enquanto a transcrição da sonda senso (enzima 2) é feita utilizando a enzima T7 polimerase. A presença de promotores M13 *forward* (verde escuro) e M13 *reverse* (verde claro) no plasmídio permite, alternativamente à linearização, que o molde linear para transcrição seja obtido por PCR.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

Enzima 1



Enzima 2



Remover o etanol e secar ao ar. Ressuspender o sedimento em 25 µL de água tratada com DEPC.

5. Checar a linearização do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Ajustar a concentração do plasmídeo para 1 µg/µL
6. Para a reação de síntese da sonda, preparar em tubo de microcentrífuga, colocado sobre gelo, o sistema de reação descrito abaixo, misturar e incubar a 37 °C.

Componentes	Quantidade	Concentração final
DNA molde linearizado 1 µg/µL	1 µL	0,05 µg/µL
Mistura de NTPs contendo DIG-UTP 10X	2 µL	1X
Tampão de transcrição 10X	2 µL	1X
Inibidor de RNase 20 U/µL	1 µL	1 U/µL
RNA Polimerase SP6 ou T7 20 U/µL	2 µL	2 U/µL
H ₂ O DEPC 0,1%	q.s.p. 20 µL	

7. Após duas horas de reação, adicionar 2 µL de DNase I (sem RNase) e incubar a 37 °C por 15 minutos.
8. Parar a reação adicionando 2 µL de EDTA 0,2 M.

O rendimento final da sonda deve ser de 10 µg de RNA marcado por 1 µg de DNA molde.

A eficiência da síntese de RNA pode ser checada por análise em gel de agarose.

9. Se for necessário, hidrolisar a sonda; caso contrário, ajuste o volume para 100 µL com água tratada com DEPC e siga para a etapa 13 deste item.

Em geral, sondas de até 500 pb não necessitam de hidrólise.

Hidrólise da sonda (opcional)

10. Calcular o tempo de hidrólise conforme equação abaixo:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{K \cdot L_0 \cdot L_f}$$

em que:

t = tempo de hidrólise em minutos (a 60 °C)

L_0 = comprimento inicial da sonda (em Kb)

L_f = comprimento final da sonda (em Kb)

K = taxa constante = 0,11 Kb/min

O comprimento final da sonda (L_f) indicado para uma melhor dinâmica de hibridização é de 150 pb a 200 pb.

11. Acrescentar, aos 24 µL da sonda marcada, os 50 µL de solução de hidrólise de sonda e ajustar o volume para 100 µL com água DEPC.
12. Incubar a reação a 60 °C pelo tempo calculado e neutralizar a reação adicionando 5 µL de ácido acético 10%.

13. Purificar a sonda, acrescentando à reação 10 μL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200 μL de etanol, misturar e incubar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Podem-se utilizar, após a hidrólise alcalina, carreadores como glicogênio ou tRNA para uma precipitação mais eficiente dos fragmentos. Neste caso, não será possível checar a integridade após precipitação, e deve-se seguir diretamente para a etapa 15.

14. Após 8 horas de precipitação, centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga, descartar o sobrenadante, lavar o sedimento em etanol 70%, deixar secar e ressuspender em 50 μL de água DEPC.
15. Checar o tamanho e concentração do fragmento da sonda em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando marcador de concentração e de peso molecular.
16. Ajustar a concentração da sonda para 100 ng/ μL com água DEPC ou com formamida deionizada 50% em água DEPC. Distribuir em alíquotas e conservar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
17. Conferir se a sonda está marcada fazendo um *dot blot* (seção 6 deste capítulo) se necessário, ou seguir para o procedimento descrito na seção 7 deste capítulo.

5.3 Observações

Uma alternativa à linearização do plasmídeo é fazer uma PCR com os iniciadores M13 *reverse* e M13 *forward* e sintetizar a sonda, utilizando como molde o produto da PCR.

Sondas de até 500 pb podem ser utilizadas sem necessidade de hidrólise (KOMMINOTH, 1996).

6 Reação imunoquímica para detecção da marcação da sonda (opcional)

6.1 Material

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Antidig AP fragmentos Fab 0,75 U/ μL .
- Microcentrífuga.
- Membrana de náilon.
- Solução de BCIP 50 mg/mL: dissolver 0,5 g de BCIP (sal de p-toluidina) em 10 mL de DMF 100%, dividir em alíquotas e guardar no escuro a $4\text{ }^\circ\text{C}$ ou $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
- Solução de NBT 50 mg/mL: dissolver 0,5 g de NBT em 10 mL de dimetilformamida (DMF) 70% (v/v) em água. Dividir em alíquotas e guardar no escuro a $4\text{ }^\circ\text{C}$ ou $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



DMF é altamente tóxico, inflamável e irritante para os olhos. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão 1:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M pH 7,5 (Apêndice 4)	100 mL	0,1 M
NaCl	8,77 g	0,15 M
H ₂ O deionizada	q.s.p. 1.000 mL	

Esterilizar em autoclave a 121 °C por 20 minutos e conservar à temperatura ambiente.

- Tampão 2:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Albumina de soro bovino (BSA)	2 g	2%
Tampão 1	q.s.p. 100 mL	

Dissolver aquecendo a 70 °C. Deixar esfriar, preparar alíquotas e conservar a -20 °C.

O BSA pode ser substituído por 1% do reagente de bloqueio (do inglês *blocking reagent*).

- Tampão 3:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M pH 7,5 (Apêndice 4)	100 mL	0,1 M
NaCl	5,84 g	0,1 M
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,17 g	0,05 M
H ₂ O deionizada	q.s.p. 1.000 mL	

Ajustar o pH para 9,5. Filtrar ou esterilizar em autoclave a 121 °C por 20 minutos e conservar à temperatura ambiente

Após esterilização em autoclave, é comum a formação de sedimento.

- Solução de coloração: misturar a 5 mL de Tampão 3, 22,5 µL de NBT (50 mg/mL) e 17,5 µL de BCIP (50 mg/mL).

Preparar a solução imediatamente antes da utilização.

É possível também utilizar uma solução comercial pronta de NBT/BCIP.

- Tampão 4:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M pH 8,0	10 mL	0,01 M
EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4)	2 mL	1 mM
H ₂ O deionizada	q.s.p. 1.000 mL	

Esterilizar em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

- Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL sem RNase.

6.2 Procedimento

Ensaio de *dot blot* para detectar a marcação da sonda

1. Cortar um fragmento de 30 mm x 30 mm da membrana de náilon, utilizando uma tesoura ou bisturi sem RNase.
2. Depositar o recorte de membrana em placa de Petri de 50 mm de diâmetro.
3. Aplicar 1 µL da amostra e 1 µL de sonda controle comprovadamente marcada com digoxigenina (seção 5 deste Capítulo) em locais distintos na membrana.

Para verificar, também, o rendimento da marcação da sonda, aplicar à membrana diluições seriadas de 1/10 feitas da sonda sintetizada e da sonda controle de concentração conhecida.

- Colocar a membrana por 1 hora a 80 °C ou em um equipamento UV *crosslinker* seguindo as instruções do fabricante, para fixar o RNA à membrana.
- Adicionar 5 mL de Tampão 1, deixar 1 minuto à temperatura ambiente.
- Remover o Tampão 1 e adicionar 5 mL de Tampão 2 e deixar 30 minutos à temperatura ambiente.
- Remover o Tampão 2 e adicionar 5 mL de Tampão 1, contendo 1 µL de anticorpo conjugado antidig AP fragmentos Fab. Deixar por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro.
- Remover a solução com anticorpo e lavar em 5 mL de Tampão 1, por 5 minutos, por duas vezes.
- Remover o Tampão 1, adicionar 5 mL de solução de coloração e manter por aproximadamente 15 minutos.
- Remover a solução e adicionar 5 mL de Tampão 4 para parar a reação.
- Se a sonda estiver marcada, uma coloração púrpura aparecerá na região de aplicação da sonda em poucos minutos, após a adição da solução de coloração.

O rendimento da marcação pode ser verificado comparando a intensidade da coloração da sonda sintetizada com a do controle.

6.3 Observação

O modo de preparo das soluções de NBT e BCIP pode ser encontrado nos catálogos das empresas que os fabricam.

7 Pré-hibridização (opcional)

7.1 Material

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Câmara úmida: recipiente com tampa que mantém a umidade, pois contém água ou papel umedecido no fundo, e na qual é possível dispor as lâminas de microscopia na horizontal.
- Cuba de vidro para lâminas de microscopia.
- EDTA 500 mM, pH 8,0 (Apêndice 4) sem RNase.
- Formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 (como descrito no item 3.1 Material).



Formaldeído é considerado provável agente mutagênico e altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- HCl 2,5 N (Apêndice 4).



Ácido clorídrico é um ácido forte, altamente tóxico e corrosivo. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Proteinase K: dissolver a proteinase K em água tratada com DEPC, ajustar a concentração para 1 µg/mL, deixar a 37 °C por 30 minutos, distribuir em alíquotas e guardar a -20 °C.
- Tampão fosfato de sódio 1 M e 10 mM, pH 7,0 (Apêndice 4) sem RNase.
- Tampão acetato 0,2 M: em um béquer, contendo 200 mL de água deionizada e esterilizada em autoclave, adicionar 3 mL de ácido acético glacial gota a gota sob agitação suave. Completar o volume para 250 mL e ajustar o pH para 2,1 com HCl.



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Solução de laranja de acridina 0,05%: 0,05 g de laranja de acridina em 100 mL de água DEPC.



Laranja de acridina é tóxica e considerada um agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara. O corante pode ser encontrado nos catálogos das empresas fabricantes também em solução aquosa, o que evita a etapa de pesagem.

- Tampão para Proteinase K:

Componentes	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M pH 8,0 (Apêndice 4) sem RNase	1 mL	0,01 M
EDTA 500 mM pH 8,0 (Apêndice 4) sem RNase	1 mL	5 mM
H ₂ O DEPC	q.s.p. 100 mL	

Esterilizar em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

- Tampão veronal-acetato pH 7,8:

Componente	Quantidade	Concentração final
Sódio-barbital	0,59 g	0,029 M
Acetato de sódio	0,39 g	0,047M
H ₂ O deionizada estéril	q.s.p. 100 mL	

Ajustar o pH para 7,8 com HCl 1N e esterilizar em autoclave.



Barbital é tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscaras em capela de exaustão.

- Tris-HCl 1 M, pH 7,5 (Apêndice 4), sem RNase.

7.2 Procedimento

1. Aplicar em cada lâmina contendo as secções de tecido (seção 5 deste capítulo) 200 µL de solução 1 µg/mL de proteinase K em tampão para proteinase K, por 10 a 30 minutos, a 37 °C.

A concentração e o tempo de tratamento com proteinase K podem variar dependendo da planta e do tecido. Uma análise prévia por microscopia da preservação do tecido, submetido a diferentes concentrações e

intervalos de tempo de tratamento, deve ser feita para estabelecer qual a melhor combinação que não afeta a morfologia.

2. Lavar três vezes em água DEPC.
3. Fixar novamente o material, colocando uma gota de formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 por 5 minutos e, depois, lavar em tampão fosfato de sódio 10 mM.
4. Se desejar verificar a integridade do RNA total, ou seja, se não houve degradação de RNA durante o processamento, separar algumas lâminas e fazer o ensaio de coloração com laranja de acridina ou seguir para o procedimento descrito na seção 8 deste capítulo .

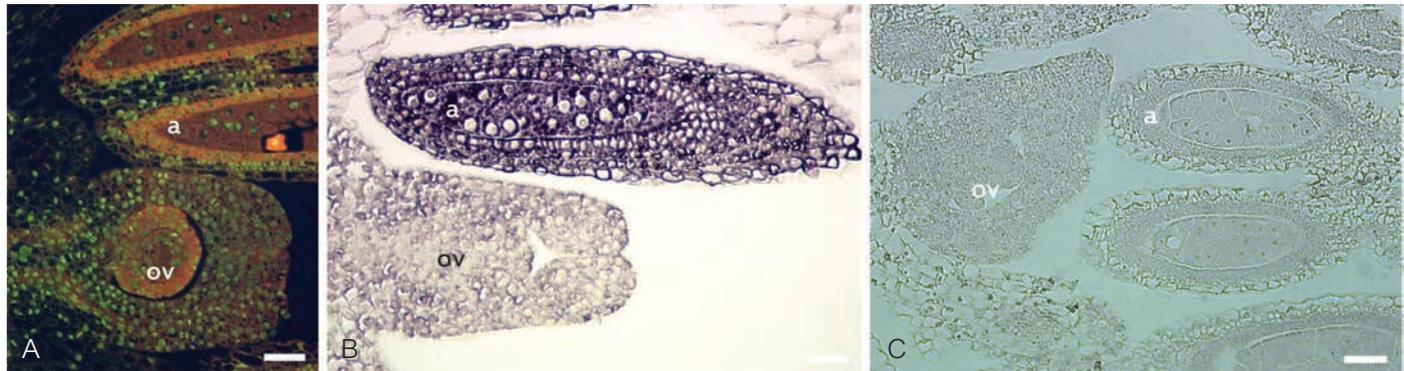
Coloração com laranja de acridina (opcional)

5. Separar algumas lâminas para o teste de preservação de RNA. Colocar as lâminas restantes em uma cuba

de vidro para lâminas de microscopia e acrescentar 100 mL de tampão acetato 0,2 M.

6. Após 5 minutos, retirar as lâminas da cuba, secar a parte inferior e dispor as lâminas em câmara úmida.
7. Acrescentar, a cada lâmina, 100 μ L da solução de laranja de acridina e cobrir com lamínula.
8. Após 30 minutos, lavar as lâminas em cuba contendo tampão veronal-acetato.
9. Retirar as lâminas, montar em tampão veronal-acetato e cobrir com uma lamínula.
10. Examinar com o auxílio de microscópio de fluorescência utilizando luz azul ou UV.

A coloração alaranjada significa presença de RNA, e a coloração verde significa presença de DNA (Figura 2A).



Fotos: Diva Maria de Alencar Dusi

Figura 2. Secções longitudinais de ovário e anteras de *Brachiaria decumbens* infiltrados em BMM (A-C). A) Observação em microscópio de fluorescência após coloração com laranja de acridina, mostrando em laranja o RNA total preservado, e em verde, o DNA. B) e C) Observação em microscópio de luz mostrando coloração púrpura na antera, após hibridização com a sonda antisense (B) e ausência de marcação após hibridização com a sonda senso (C). a: antera; ov: ovário. Barras: A = 15 μ m; B = 10 μ m; C = 15 μ m.

7.3 Observações

A pré-hibridização é opcional. O tratamento com proteinase K é especialmente importante quando se utilizam maiores concentrações de glutaraldeído no tampão de fixação ou quando as sondas forem longas.

As lâminas usadas para teste com laranja de acridina não deverão ser usadas para hibridização.

Todos os reagentes e soluções devem ser preparados e manuseados com materiais e recipientes sem RNase e água DEPC.

A concentração e o tempo de incubação com proteinase K devem ser ajustados de acordo com o material vegetal e com o comprimento da sonda.

8 Hibridização da sonda no tecido

8.1 Material

- Água DEPC 0,1% (Apêndice 4).



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Solução de hibridização.

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M pH 7,5	100 µL	10 mM
NaCl 3M (Apêndice 4)	1 mL	300 mM
Formamida deionizada	5 mL	50%
EDTA 50 mM pH 8 (Apêndice 4)	200 µL	1 mM
Solução de Denhardt 50X (Apêndice 4)	200 µL	1X
Sulfato de dextrano 50% (p/v)	2 mL	10%
H ₂ O DEPC 0,1%	500 µL	

Preparar alíquotas da solução e guardar a -20 °C. Antes de utilizar, retirar uma alíquota e colocar no gelo.

A concentração final é obtida somente após o acréscimo da sonda na proporção de 1/10 (v/v); ver etapa 1 do item 8.2 Procedimento.

- Sonda marcada com digoxigenina a 100 ng/µL (seção 5 deste capítulo).
- Tris-HCl 1 M, pH 7,5 sem RNase (Apêndice 4).
- tRNA a 100 ng/µL.

8.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 3.

Para hibridizar a sonda em 10 lâminas, preparar 1 mL de solução de hibridização contendo 0,5 ng/µL de sonda marcada:

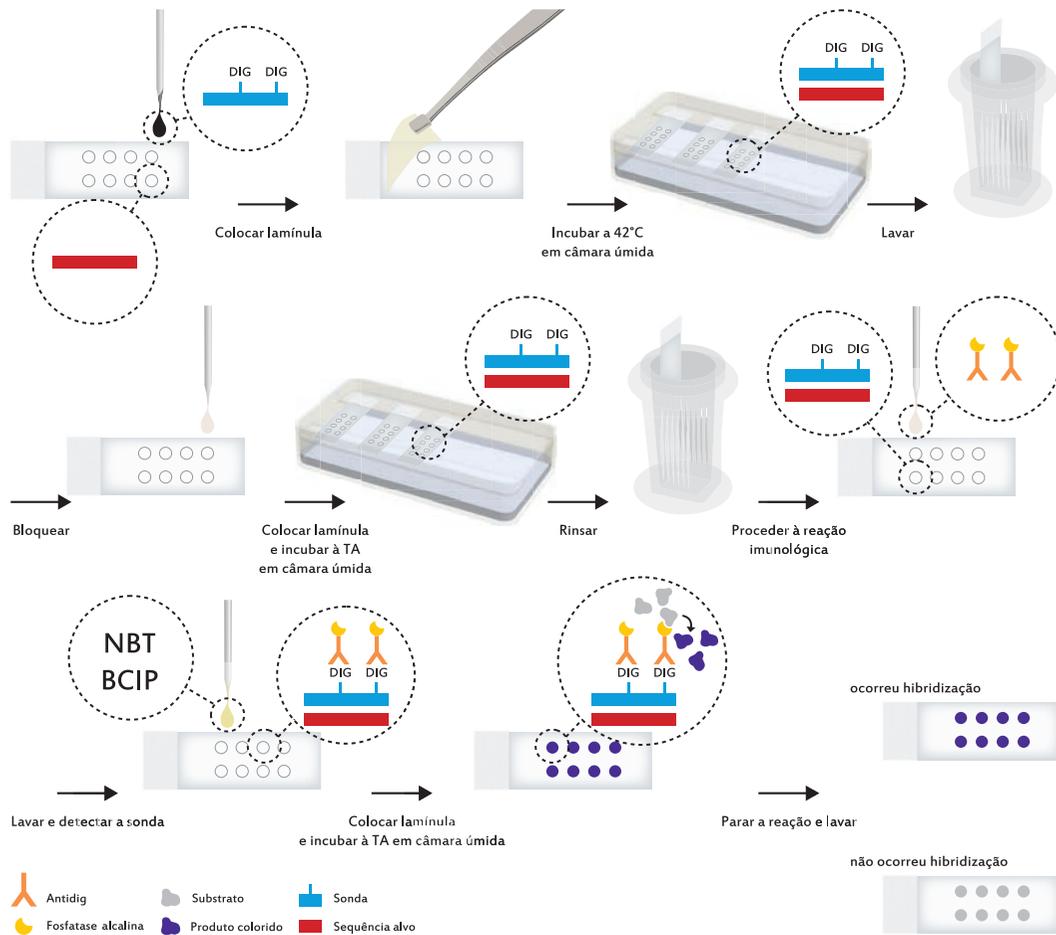


Figura 3. Etapas da hibridização in situ utilizando sonda antisseno. Inicialmente, 100 µL da solução de hibridização, contendo a sonda marcada com digoxigenina são aplicados às secções de tecido em cada lâmina. A laminula é depositada sobre a lâmina, que é colocada em câmara úmida por 18 horas, no escuro, à temperatura de 42 °C. As lâminas são então lavadas em cuba de vidro contendo os tampões apropriados. Em seguida, é feito o bloqueamento e, após rinsar as lâminas, procede-se à reação imunológica com o anticorpo antidig AP. Após lavar as lâminas, é feita a reação de coloração utilizando NBT e BCIP. A reação é interrompida quando aparece a coloração azul púrpura, característica da ocorrência da hibridização. Em seções ou locais em que não ocorreu hibridização, a coloração púrpura não aparece.

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

1. Adicionar, a um tubo de microcentrífuga, 5 μL de tRNA 100 ng/ μL (total de 500 ng), 5 μL de sonda 100 ng/ μL (total de 500 ng) e 90 μL de água DEPC.

O volume de sonda adicionado pode ser alterado caso se deseje concentração final ou volume diferentes.

2. Incubar a 80 °C por 5 minutos.
3. Colocar imediatamente no gelo.
4. Completar o volume para 1.000 μL com solução de hibridização.

Dessa forma, a concentração final da sonda fica 0,5 ng/ μL .

As quantidades apresentadas neste procedimento podem ser ajustadas, dependendo do número de lâminas que serão utilizadas na hibridização.

A concentração de sonda marcada com digoxigenina a ser aplicada em cada lâmina pode variar e deve ser ajustada dependendo da sonda e do material vegetal utilizado.

5. Aplicar 100 μL em cada lâmina (num total de 50 ng da sonda marcada com digoxigenina), cobrir com lamínula para espalhar a sonda e hibridizar por 12 horas a 42 °C, no escuro, em câmara úmida.

A quantidade de sonda aplicada e o tamanho da lamínula podem variar dependendo da área da lâmina a ser coberta.

8.3 Observações

A partir da seção 8, não há necessidade de se manter o material sem RNase.

A temperatura de hibridização pode ser aumentada até 60 °C, sempre que for exigida maior estringência na hibridização.

Todos os reagentes e soluções devem ser preparados e manuseados com materiais e recipientes sem RNase e água DEPC.

9 Pós-hibridização

9.1 Material

- Água dionizada e esterelizada em autoclave.
- Anticorpo antidig AP (fragmentos Fab) 1:1.000 em tampão 1.
- Câmara úmida.
- Lamínulas.
- Microscópio de luz.
- Microscópio estereoscópico.
- Papel-toalha.
- Solução de coloração: misturar a 2 mL do Tampão 3, 9 μL de NBT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 7 μL de BCIP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- Tampões 1 a 4, conforme descritos no item 6.1 Material.
- Tampão SSC 20X (Apêndice 4).

9.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 3.

1. Remover a lamínula e lavar as lâminas em cuba de vidro contendo tampão SSC nas concentrações 4X, 2X, 1X e 0,5X por 30 minutos cada vez, à 37 °C.
2. Enxaguar as lâminas em Tampão 1 por 5 minutos.
3. Retirar as lâminas, secar a parte de baixo com papel-toalha e colocá-las em câmara úmida, acrescentando em cada lâmina 1 mL de Tampão 2, e deixar por 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente, no escuro.
4. Enxaguar as lâminas por imersão em Tampão 1, por 5 minutos.
5. Secar a parte de baixo das lâminas com papel-toalha e colocá-las em câmara úmida, acrescentando em cada lâmina 100 µL a 150 µL de anticorpo antidig AP em Tampão 1. Cobrir com lamínula e deixar por 1 hora no escuro à temperatura ambiente ou a 4 °C.
6. Remover a lamínula e lavar as lâminas em cuba de vidro contendo Tampão 1, por 15 minutos, duas vezes.

A concentração do anticorpo antidig AP pode ser ajustada, se necessário, para 1:2.000 ou 1:3.000.

A lamínula de vidro pode ser substituída por filme plástico de parafina (película flexível, semitransparente, utilizada para vedação de frascos em laboratórios) cortado do tamanho de uma lamínula.

7. Enxaguar as lâminas por imersão em Tampão 3, por 5 minutos.
8. Secar a parte de baixo das lâminas com papel-toalha e colocar 200 µL de solução de coloração. Cobrir com lamínula e colocar as lâminas em câmara úmida.
9. Deixar por 15 minutos a algumas horas, à temperatura ambiente, no escuro. Verificar, utilizando um microscópio estereoscópico, o desenvolvimento de coloração azul púrpura.
10. Ao sinal de presença de uma cor púrpura, parar a reação, retirando as lamínulas e colocando em Tampão 4 por 10 minutos.
11. Enxaguar em água deionizada por 5 minutos, por duas vezes.
12. Colocar a lamínula e examinar diretamente em microscópio de luz, ou acrescentar glicerol 50% (v/v) e observar em microscópio de luz com contraste de interferência diferencial.
13. No local da hibridização, aparecerá uma coloração azul púrpura (Figura 2B). O controle negativo não deve apresentar esta coloração (Figura 2C).

A lâmina contendo a sonda senso serve de controle negativo, e o aparecimento de coloração azul púrpura nessa lâmina é um sinal de que está ocorrendo ruído não específico de que a coloração deve ser interrompida imediatamente. Em alguns casos, a sonda senso pode hibridizar com sequências existentes no tecido e, então, não deve ser utilizada como controle negativo.

9.3 Observação

É possível também fazer a montagem definitiva da lâmina: utilizando capela de exaustão, desidratar, submetendo a lâmina a uma série crescente de etanol [de 10% (v/v) a etanol absoluto] por 1 minuto cada vez; depois, em etanol absoluto: xilol na proporção de 3:1, 1:1, 1:3, 100% xilol (5 minutos cada vez). Acrescentar uma gota de meio de montagem à base de resina comercial solúvel em xilol (por exemplo, Depex ou Permount) utilizada na montagem de lâminas permanentes. Depositar a lamínula e deixar secar em capela de exaustão.

10 Referências

- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. In situ localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, Wien, v. 231, n. 3/4, p. 161-171, 2007.
- BASKIN, T. I.; BUSBY, C. H.; FOWKE, L. C.; SAMMUT, M.; GUBLER, F. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. **Planta**, Berlin, v. 187, n. 3, p. 405-413, 1992.
- BIMAL, R.; SCHEL, J. H. N.; TAVOLETTI, S.; WILLEMSE, M. T. M. Localization of poly(A)⁺-containing RNA during female gametophyte development in *Medicago sativa* and the diploid mutant *Medicago sativa* spp. *falcata* using digoxigenin-labelled oligo-dT probes. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 8, p. 18-26, 1995.
- DE BLOCK, M.; DEBROUWER, D. RNA-RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled probes: the use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 215, n. 1, p. 86-89, 1993.
- DIG APPLICATION **Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization**. 4th ed. Mannheim: Roche Giagnostics Gmgh, 2008. Disponível em: <http://lifescience.roche.com/ucstore/RASCatalogAssetstore/Articles/05353122001_08.08.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2014.
- DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* stapf**. Wageningen: University of Wageningen, 2001. 167 p.
- ENGLER, J. A.; GROODT, R. de; MONTAGU, M. van; ENGLER, G. *In situ* hybridization to mRNA of *Arabidopsis* tissue sections. **Methods**, Duluth, v. 23, n. 4, p. 325-334, 2001.
- GARCÍA-AGUILAR, M.; DORANTES-ACOSTA, A.; PÉREZ-ESPAÑA, V.; VIELLE-CALZADA, J.-P. Whole mount in situ mRNA localization in developing ovules and seeds of *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 23, p. 279-289, 2005.
- HOUBEN, A.; ORFORD, S. J.; TIMMIS, J. N. In situ hybridization to plant tissues and chromosomes. In: DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. (Ed.). **In situ hybridization protocols**. Totowa: Humana Press, 2006. p. 203-218.
- ITO, T.; SHINOZAKI, K. The *MALE STERILITY1* Gene of *Arabidopsis*, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 43, n. 11, p. 1285-1292, 2002.
- JAVELLE, M.; MARCO, C. F.; TIMMERMANS, M. *In situ* hybridization for the precise localization of transcripts in plants. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, v. 57, p. e3328, 2011.
- KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods: theory and practice**. 4th ed. Oxfordshire: Scion Publishing, 2008. 606 p.
- KOMMINOTH, P. Detection of mRNA in tissue sections using DIG-labeled RNA and oligonucleotide probes. In: GRUNEWALD-JANHO, S.; KEESEY, J.; LEOUS, M.; MILTENBURG, R. van; SCHROEDER, C. (Ed.). **Nonradioactive in situ hybridization application manual**. 2nd ed. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH Bio, 1996. p. 126-135.
- KRONENBERGER, J.; DESPREZ, T.; HÖFTE, H.; CABOCHE, M.; TRASS, J. A methacrylate embedding procedure developed for immunolocalization on plant tissues is also compatible with in situ hybridization. **Cell Biology International**, London, v. 17, n. 11, p. 1013-1021, 1993.
- LACERDA, A. L. M.; DUSI, D. M. A.; ALVES, E. R.; RODRIGUES, J. C. M.; GOMES, A. C. M. M.; CARNEIRO, V. T. C. Expression analyses of *Brachiaria brizantha* genes encoding ribosomal proteins *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, and *BbrizRPL41* during development of ovaries and anthers. **Protoplasma**, Wien, v. 250, n. 2, p. 505-514, 2012.

- LEWIS, F. A.; WELLS, M. Detection of virus in infected human tissue by in situ hybridization. In: WILKINSON, D. G. (Ed.). **In situ hybridization: a practical approach**. Oxford: IRL Press: Oxford University Press, 1992. p. 121-136.
- PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 64, n. 2, p. 600-604, 1969.
- ROMANEL, E.; DAS, P.; AMASINO, R. M.; TRAAS, J.; MEYEROWITZ, E.; ALVES-FERREIRA, M. Reproductive Meristem22 is a unique marker for the early stages of stamen development. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 55, n. 6, p. 657-664, 2011.
- SALAJ, J.; RECKLINGHAUSEN, I. R. VON; HECHT, V.; VRIES, S. C. DE; SCHEL, J. H. N.; LAMMEREN, A. A. M. van. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 46, n. 7, p. 709-714, 2008.
- SAMANANI, N.; PARK, S.-U.; FACCHINI, P. J. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 3, p. 915-926, 2005.
- SANTA-CATARINA, C.; OLIVEIRA, R. R. DE; CUTRI, L.; FLOH, E. I. S.; DORNELAS, M. C. WUSCHEL-related genes are expressed during somatic embryogenesis of the basal angiosperm *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Trees**, Camden, v. 26, n. 2, p. 493-501, 2012.
- SANTOS, A. P.; WEGEL, E.; ALLEN, G. C.; THOMPSON, W. F.; STOGER, E.; SHAW, P.; ABRANCHES, R. *In situ* methods to localize transgenes and transcripts in interphasenuclei: a tool for transgenic plant research. **Plant Methods**, London, v. 2, p. 18, 2006.
- SCHMIDT, E. D. L.; HENGEL, A. J. van; VRIES, S. C. de. A rapid method for localizing cell-specific transcripts in plant cell cultures. **Biochemica**, [Wageningen], v. 4, p. 25-28, 1996.
- SCHMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A. J.; VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, 1997.
- SCHMITZ, G. G.; WALTER, T.; SEIBL, R.; KESSLER, C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 192, n. 1, p. 222-231, 1991.
- SCHOLZ-STARKE, J.; BÜTTNER, M.; SAUER, N. AtSTP6, a new pollen-specific H-monosaccharide symporter from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 1, p. 70-77, 2003.
- SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M. A.; SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; COSTA, M. M. C.; ALVES-FERREIRA, M.; CARNEIRO, V. T. C. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 2, p. 403-416, 2012.
- STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M. P.; CUTRI, L.; DORNELAS, M. C. ; FLOH, E. I. S. A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 109, n. 1, p. 41-50, 2012.
- THERMO SCIENTIFIC. **Instruction**: protocol for staining with BCIP and NBT. Number 34040. 2011. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/instructions/2160155.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- TRINDADE, L. M.; HORVATH, B.; BACHEM, C.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.). **Gene**, Amsterdam, v. 303, p. 77-87, 2003.
- WARFORD, A.; LAUDER, I. In situ hybridisation in perspective. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 44, n. 3, p. 177-181, 1991.
- WILKINSON, D.G. The theory and practice of in situ hybridization. In: WILKINSON, D. G. (Ed.). **In situ hybridization: a practical approach**. Oxford: IRL Press: Oxford University Press, 1992. p. 1-13.
- YAMAMOTO, Y. T.; TAYLOR, C. G.; ACEDO, G. N.; CHENG, C.-L.; CONKLING, M. A. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 371-382, 1991.
- ZHOU, C.; HAN, L.; FU, C.; CHAI, M.; ZHANG, W.; LI, G.; TANG, Y.; WANG, Z.-Y. Identification and characterization of *petiolule-like pulvinusmutants* with abolished nyctinastic leaf movement in the model legume *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, Oxford, v. 196, n. 1, p. 92-100, 2012.

Capítulo 17

Detecção de proteínas
pela técnica de
ELISA (*enzyme-linked
immunosorbent assay*)

Francisco José Lima Aragão
Simone da Graça Ribeiro

1 Introdução

No final da década de 1950, começou a surgir uma nova perspectiva para a detecção de proteínas por meio de imunoenaios. Yalow e Berson (1959) conduziram um trabalho pioneiro, ao descreverem a detecção da insulina por radioimunoensaio.

Os imunoenaios caracterizam-se pela utilização de anticorpos produzidos contra antígenos em animais que apresentam resposta imune. Uma característica chave da resposta imune é a capacidade de produção de um vasto repertório de anticorpos específicos para inúmeros epitopos (anticorpos policlonais) (HARLOW; LANE, 1988). No entanto, essa característica dos anticorpos policlonais é limitante para determinados ensaios que requerem maior especificidade, além de sua produção ser limitada.

Posteriormente, surgiram várias inovações que melhoraram sobremaneira a detecção de proteínas por imunoenaios. Uma dessas inovações foi a possibilidade de se produzirem anticorpos monoclonais a partir de hibridomas (KOHLENER; MILSTEIN, 1975), o que permitiu a produção de quantidades ilimitadas de moléculas idênticas de anticorpo com especificidade para um só epitopo. Desde o início da década de 1970, os imunoenaios passaram a utilizar reagentes não radioativos. Esses ensaios, denominados ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (ENGVALL; PERLMAN, 1971; WEEMEN; SCHUURS, 1971), além de usarem reagentes enzimáticos, apresentam alta sensibilidade, facilidade na preparação dos reagentes, rapidez e reprodutibilidade

dos resultados. Tais características, aliadas à variedade dos tipos de ensaio, fizeram com que a técnica de ELISA fosse amplamente adotada em análises de anticorpos e antígenos solúveis, facilitando bastante a detecção de várias proteínas e vírus, com ampla aplicação em diagnósticos clínicos. Posteriormente, a técnica de ELISA passou a ser utilizada em todas as áreas de análises biológicas.

A técnica permite identificar uma proteína presente em uma população de outras proteínas, utilizando-se preparações cruas ou semipurificadas. Assim, pela técnica de ELISA, é possível a detecção de uma proteína codificada por um gene exógeno em uma planta transgênica. Essa técnica, que tem a vantagem de ser rápida e simples, além de permitir ensaios com um grande número de amostras, possibilita a análise de populações de plantas transgênicas (análise de progênie).

Anticorpos conjugados de forma covalente a diferentes enzimas, como fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, glucoamilase, urease e penicilinase, têm sido utilizados com sucesso nos testes de ELISA (Tabela 1) (HORNBECK, 1991). Entre elas, a fosfatase alcalina é a enzima mais utilizada, pois apresenta uma rápida atividade catalítica, alta estabilidade e é relativamente fácil de ser obtida e de se conjugar ao anticorpo. Existem vários tipos de ELISA. No entanto, os ensaios do tipo ELISA-indireta, ELISA-direta e ELISA-sanduíche são mais utilizados para a detecção de proteínas em plantas transgênicas.

No ensaio indireto (Figura 1), os extratos proteicos das amostras que se pretende analisar são colocados na

Tabela 1. Enzimas e respectivos substratos cromogênicos comumente utilizados em diferentes ensaios de ELISA.

Enzima	Substrato	Abreviatura	Cor inicial/final	Pico de absorvância (nm)
Peroxidase	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoluina-6-sulfônico) ⁽¹⁾	ABTS	Incolor/verde	410
	o-Fenilenodiamina ⁽²⁾	OPD	Incolor/marrom	492
	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina ⁽³⁾	TMB	Incolor/amarelo	450
β-galactosidase	O-Nitrofenil-β-D-galactopiranosideo ⁽⁴⁾	ONPG	Incolor/amarelo	410
Fosfatase alcalina	p-Nitrofenil fosfato ⁽⁵⁾	PNPP	Incolor/amarelo	405

Fonte : ⁽¹⁾Postmann et al. (1981); ⁽²⁾Voller et al. (1979); ⁽³⁾Holland et al. (1974); ⁽⁴⁾Craven et al. (1965); ⁽⁵⁾Snyder et al. (1972).

placa para testes ELISA, que é geralmente uma placa de poliestireno de 96 poços. Nessa etapa, várias proteínas presentes no extrato (proteína-alvo e proteínas endógenas) ligam-se à placa. Em seguida, adiciona-se o anticorpo específico ou primário, geralmente IgG (imunoglobulina G), produzido em coelho ou camundongo. Após o período de incubação, as moléculas de anticorpo que não se ligaram às proteínas-alvo são eliminadas por lavagem. Adiciona-se, então, o anticorpo secundário (anti-IgG, de coelho ou camundongo produzido em outro animal) conjugado a uma enzima (por exemplo, fosfatase alcalina ou peroxidase). Após um período de incubação, quando o anticorpo secundário se liga ao primário, é feita uma nova lavagem para eliminar os anticorpos que não se ligaram. Por fim, adiciona-se o substrato para que a enzima atue sobre ele, modificando-o, alterando sua cor (ensaio

colorimétrico) ou permitindo que este fluoresça em determinados comprimentos de onda (ensaio fluorimétrico). O ensaio do tipo ELISA-indireta é bastante versátil e tem-se mostrado extremamente útil, permitindo detectar tanto a expressão transiente de proteínas 24 horas após introdução dos genes pelo sistema biobalístico (Capítulo 5) (ARAGÃO et al., 1992; LACORTE et al., 1997), como a expressão estável de proteínas em plantas transgênicas (BALDONI et al., 2010; CUNHA et al., 2011; MARCELLINO et al., 1996). A técnica de ELISA-indireta também é usada para estudar o silenciamento gênico em plantas transgênicas modificadas pela estratégia de RNA interferente e nas análises de populações e progênies de plantas transgênicas em geral (DODO et al., 2008; LI et al., 2003; OLHOFT et al., 2007).

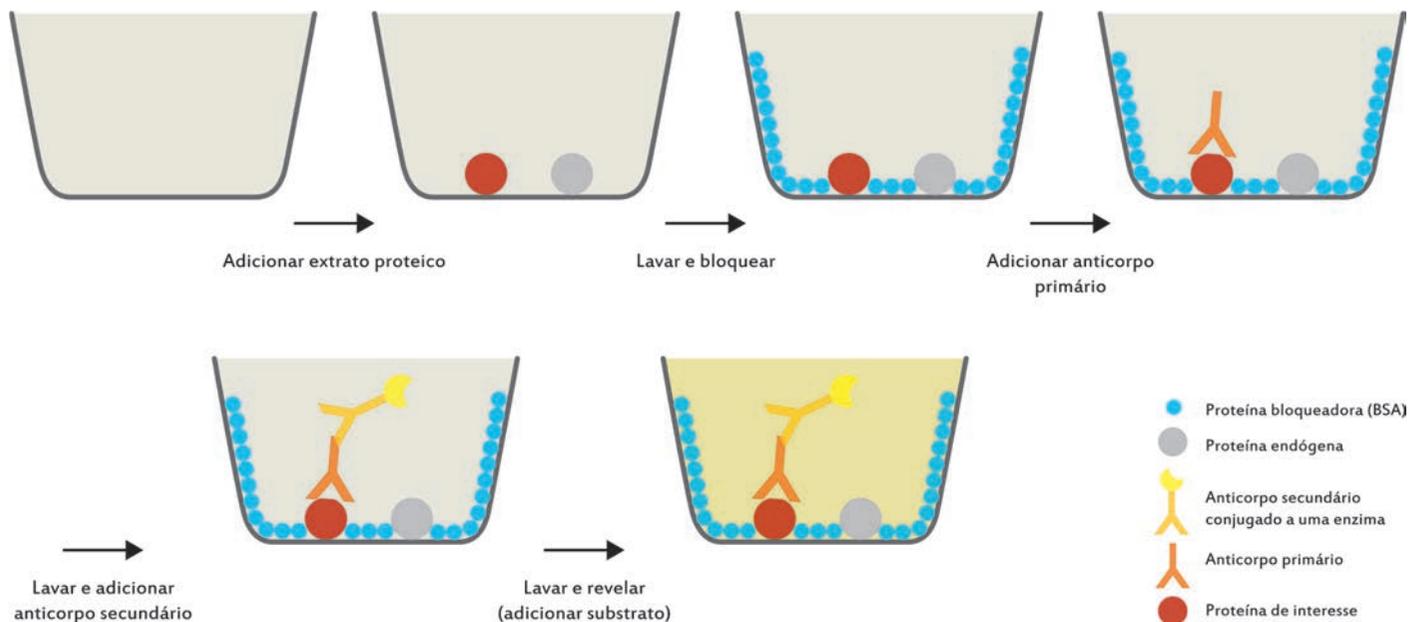


Figura 1. Etapas do ensaio de ELISA-indireta.

Fonte: adaptado de Aragão e Ribeiro (1998).

No ensaio do tipo ELISA-direta (Figura 2), as etapas são muito semelhantes às do ensaio do tipo ELISA-indireta. O extrato proteico é colocado na placa, e, em seguida, é feita uma lavagem. Mas, nesse caso, é utilizado apenas um anticorpo, específico para a proteína de interesse (proteína-alvo), conjugado a uma enzima. As etapas seguintes de lavagem e revelação são iguais às do tipo ELISA-indireta.

No ensaio do tipo ELISA-sanduiche (Figura 3), emprega-se um excesso de anticorpo primário específico

para recobrir a superfície da placa. Esses anticorpos irão capturar as proteínas específicas presentes no extrato. Em seguida, as proteínas não ligadas são lavadas e, então, adiciona-se o anticorpo secundário, que também deve ser específico para a proteína-alvo, conjugado a uma enzima. Após uma lavagem para eliminar os anticorpos não aderidos, adiciona-se o substrato da enzima. O ensaio ELISA-sanduiche é, em muitos casos, de duas a cinco vezes mais sensível que os dois primeiros.

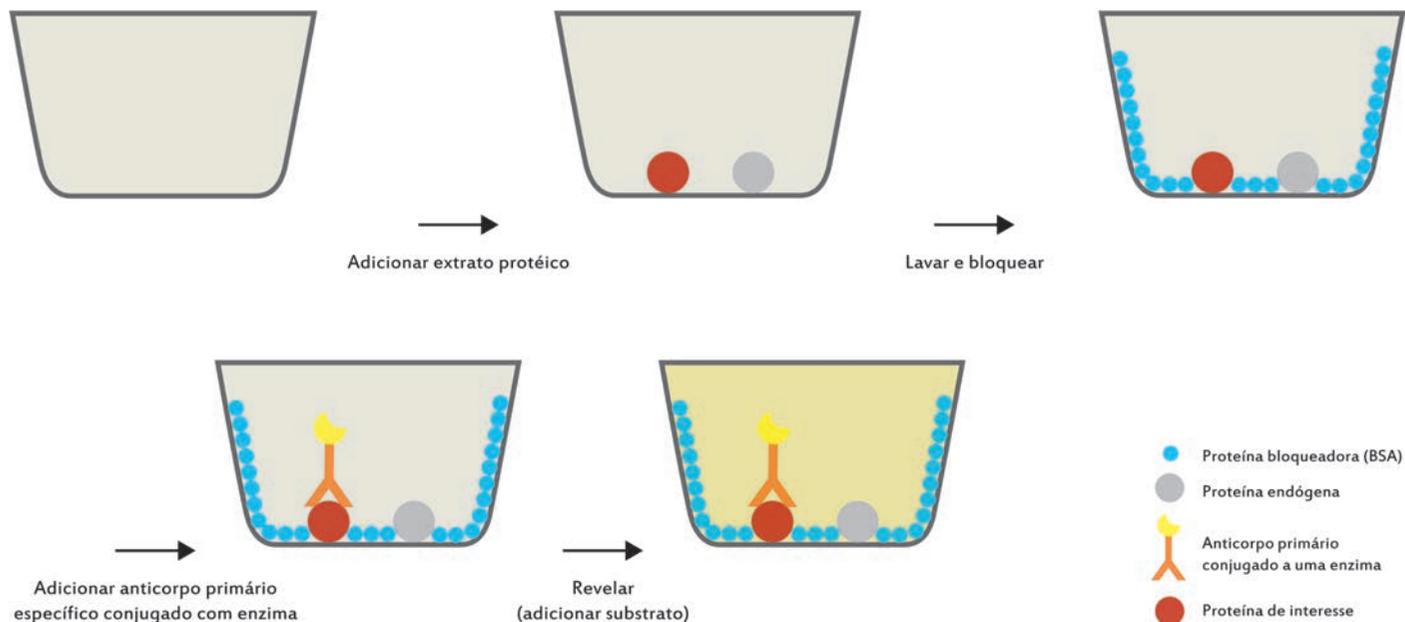


Figura 2. Etapas do ensaio de ELISA-direta.

Fonte: adaptado de Aragão e Ribeiro (1998).

Algumas considerações devem ser levadas em conta ao se escolher entre um e outro tipo de ensaio de ELISA. As características de cada um dos ensaios são apresentadas na Tabela 2.

Neste capítulo, trata-se do uso da técnica de ELISA na detecção de proteínas-alvo sintetizadas em plantas transgênicas. São também apresentadas as características das enzimas conjugadas ao anticorpo e cromóforos empregados, bem como alguns inibidores de proteases que podem ser adicionados ao tampão inicial de extração

Tabela 2. Características dos tipos de ELISA.

Tipo de ELISA	Requerimentos/comentários
ELISA-indireta	Requer quantidades relativamente grandes de antígeno. Não requer anticorpo específico conjugado com enzima
ELISA-direta	Requer anticorpo específico conjugado com enzima. Rápido
ELISA-sanduíche	Requer quantidades relativamente grandes de anticorpo de captura e anticorpo específico conjugado com enzima. Mais sensível que os demais testes

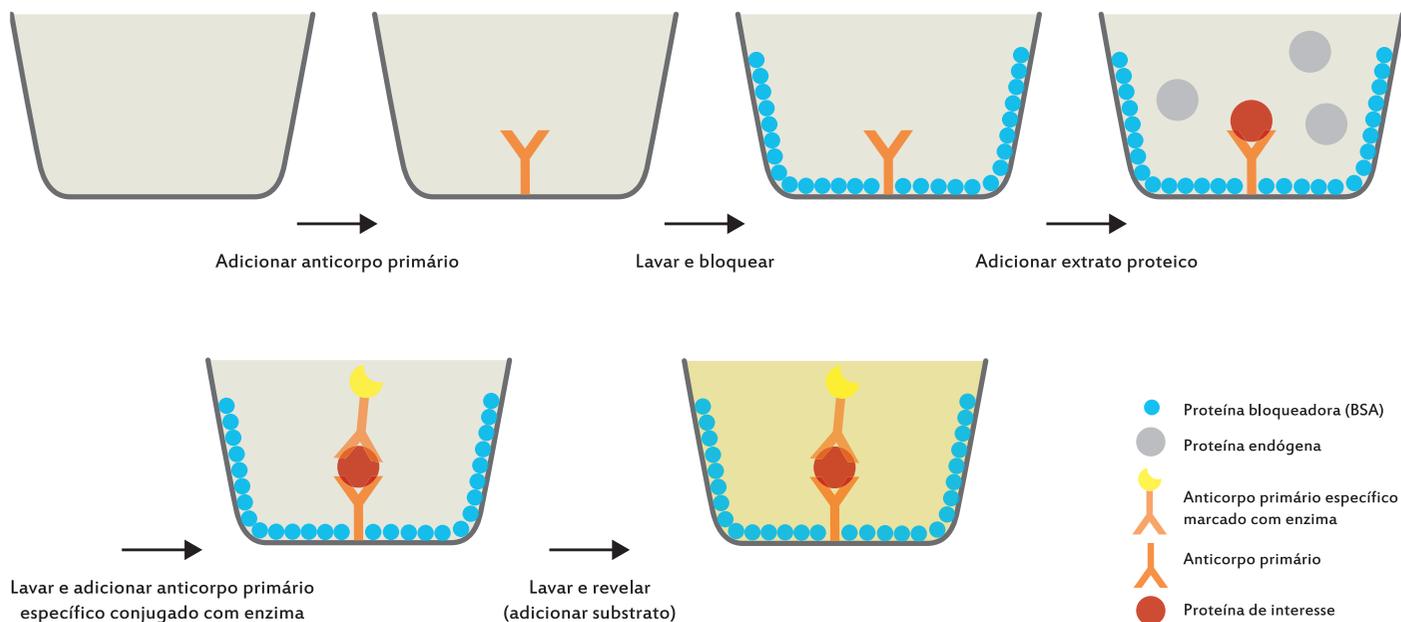


Figura 3. Etapas do ensaio de ELISA-sanduiche.

Fonte: adaptado de Aragão e Ribeiro (1998).

de proteínas da planta. Os protocolos descritos servem como referência e devem ser adaptados para a detecção de cada tipo de proteína-alvo.

2 Extração de proteínas totais

Neste capítulo, apresenta-se um exemplo de protocolo de extração de proteína de plantas para detecção por ensaio de ELISA.

2.1 Material

- Almofariz e pilão.
- Agitador do tipo Vortex.
- Microcentrífuga.
- Nitrogênio líquido.

- Tampão de extração (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,2	10 mL	10 mM
NaCl	2,9 g	500 mM
β -mercaptoetanol	71 μ L	10 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	



β -mercaptoetanol é volátil e altamente tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,2 (diluir 10 vezes a solução-estoque a 1 M; Apêndice 4).
- Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL (microtubos).

2.2 Procedimento

1. Triturar o tecido em nitrogênio líquido até que se forme um pó fino.
2. Transferir o pó obtido para um microtubo contendo tampão de extração (250 mg de tecido por mililitro de tampão).
3. Homogeneizar por 30 minutos, a 4 °C, em agitador do tipo Vortex.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 rpm.

5. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo.

O sobrenadante pode ser armazenado a -20 °C para futuras análises.

6. Determinar a concentração de proteína total da amostra pelo método de Bradford (Capítulo 19).

2.3 Observações

Pode-se também macerar o tecido em presença do tampão de extração sem o uso de nitrogênio líquido. Esse procedimento pode ser empregado sem problemas quando se tratar de folhas e outros tecidos de fácil maceração. Nesse caso, as amostras podem também ser maceradas em sacos plásticos apropriados para essa finalidade.

Dependendo do tipo de tecido, pode-se adicionar um ou mais inibidores de proteases ao tampão de extração (Tabela 3).

3 ELISA-indireta

3.1 Material

- Anticorpo primário, isto é, anticorpo específico para a proteína que se deseja detectar.
- Anticorpo secundário: *anti-mouse* IgG ou *anti-rabbit* IgG, produzido em cavalo ou cabra e conjugado com fosfatase alcalina.

Tabela 3. Inibidores de protease que podem ser adicionados ao tampão de extração.

Inibidor	Protease-alvo	Concentração usual	Solução-estoque	Comentário
Aprotinina	Serinas	0,1 µg/mL a 2 µg/mL	10 mg/mL em PBS	Evitar congelar e descongelar repetidamente
EDTA	Metaloproteases	0,5 mM a 2 mM	500 mM em água, pH 8,0	
Leupeptina	Serinas e tioproteases	0,5 µg/mL a 2 µg/mL	10 mg/mL em água	
α-macroglobulina	Largo espectro	1 U/mL	100 U/mL em PBS	Evitar agentes redutores
Pepsina	Proteases ácidas	1 µg/mL	1 mg/mL em metanol	
PMSF	Serinas	20 µg/mL a 100 µg/mL	10 mg/mL em isopropanol	Usar soluções novas

- Espectrofotômetro com microleitor de placa de 96 poços com filtro de 405 nm.
- Pastilhas de 5 mg de p-Nitrofenil fosfato (pNPP).



pNPP é tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Pisseta com água destilada.
- Placa de ELISA de poliestireno ou PVC com 96 poços.
- Tampão de bloqueio: adicionar BSA (albumina de soro bovino) 0,25% (p/v) ao tampão PBST.
- Tampão do substrato (TS): medir 97 mL de dietanolamina, completar o volume até 1 L com água destilada e ajustar o pH para 9,6 com HCl.
- Tampão fosfato salina – PBS 10X (Apêndice 4).
- Tampão PBST: adicionar surfactante polisorbato 20 a 0,05% (v/v) ao tampão PBS 1X.

3.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 1.

Ligação do antígeno à placa

1. Adicionar 50 µL do extrato proteico total de cada amostra (da seção 2 deste capítulo) a cada poço de uma placa de ELISA. Agitar manualmente a placa para garantir que o extrato esteja bem distribuído no fundo do poço. Fechar a placa, colocar em uma câmara úmida, como esquematizada na Figura 4. Incubar durante 14 a 16 horas à temperatura ambiente, ou durante 4 horas, a 37 °C.

A quantidade limite de proteína que é capaz de se ligar a um poço de uma placa de ELISA é de 100 ng. Entretanto, dependendo da proporção da proteína-alvo no extrato proteico, devem-se adicionar de 500 ng a 2.000 ng de proteína total.

2. Lavar a placa com água destilada. Encher cuidadosamente cada poço com a ajuda de uma pisseta, evitando a mistura dos conteúdos dos poços durante a lavagem. Esperar por 5 minutos e eliminar a água invertendo a placa.

Pode-se também usar tampão PBS ou PBST para a lavagem da placa; entretanto, é mais prático o uso de água.

Nas etapas de lavagem, pode-se utilizar uma lavadora automática de placas de ELISA.

3. Repetir duas vezes a etapa 2 deste item. Remover qualquer líquido residual, invertendo a placa sobre papel de filtro.

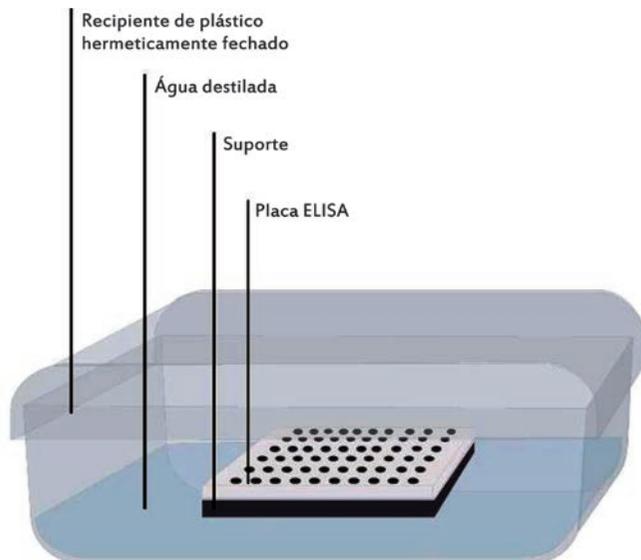


Figura 4. Câmara úmida para incubação de placas de ELISA.

Fonte: adaptado de Aragão e Ribeiro (1998).

Bloqueio dos sítios residuais de ligação na placa

4. Adicionar 100 μL de tampão de bloqueio. Incubar em câmara úmida, como esquematizada na Figura 4, durante 14 a 16 horas, à temperatura ambiente.
5. Lavar a placa três vezes com água destilada, como descrito na etapa 2 deste item.

Adição do anticorpo primário

6. Adicionar 50 μL do anticorpo primário (diluído entre 1:1.000 e 1:5.000 em tampão de bloqueio) a cada poço. Incubar durante um tempo mínimo de 2 horas, à temperatura ambiente.

Um tempo de incubação de 2 horas é suficiente na maioria dos casos; entretanto, um sinal mais forte pode ser obtido com uma incubação de 5 a 10 horas.

7. Lavar a placa três vezes, como na etapa 2 deste item.
8. Adicionar 100 μL de PBST, agitar e incubar durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
9. Lavar a placa três vezes, como descrito na etapa 2 deste item. Remover qualquer líquido residual, invertendo a placa sobre papel de filtro.

Adição do anticorpo secundário

10. Adicionar 50 μL do anticorpo secundário (diluído entre 1:2.000 e 1:5.000 em PBS). Incubar por, no mínimo, 2 horas à temperatura ambiente.

A intensidade do sinal pode ser aumentada por incubações mais longas (5 a 10 horas).

11. Lavar a placa três vezes como descrito na etapa 2 deste item.
12. Remover qualquer líquido residual, invertendo a placa sobre papel de filtro.

Revelação

13. Preparar o tampão de reação: dissolver uma pastilha de pNPP (5 mg) em 5 mL de tampão TS.
14. Adicionar 50 μ L do tampão de reação a cada poço. Incubar à temperatura ambiente ou a 37 °C. Monitorar a hidrólise do substrato visualmente, verificada pelo aparecimento de uma coloração amarela (qualitativamente) (Figura 5) ou por meio de um leitor de placa, usando um filtro para comprimento de onda de 405 nm (quantitativamente).

A reação deve ser incubada em ambiente escuro, pois o pNPP é sensível à luz. O aparecimento da cor amarela se dá, geralmente, dentro de 30 a 60 minutos (Figura 5). Entretanto, em alguns casos, requer-se um maior tempo de incubação.

A reação pode ser interrompida pela adição de 50 μ L de NaOH 3N (Apêndice 4) em cada poço.

As lavagens podem ser automatizadas e mais bem padronizadas se uma lavadora de placa de ELISA for utilizada.

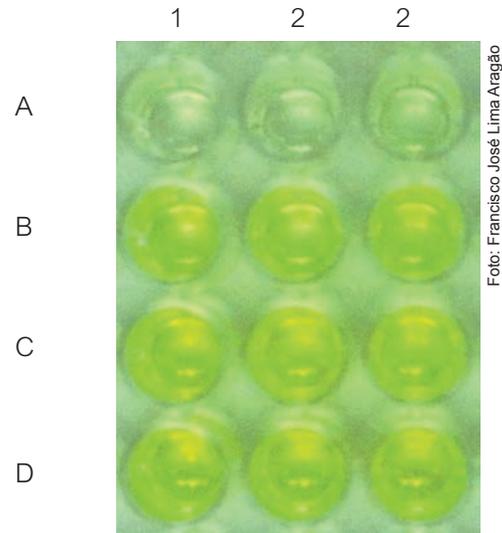


Figura 5. Placa de ELISA mostrando a detecção da proteína GCH1 [Guanosina-5'-Trifosfato (GTP) Ciclohidrolase I] em folhas de alface (*Lactuca sativa*). Linha A: controle negativo (planta não transgênica); Linha B: proteína GCH1 purificada de *Arabidopsis thaliana*; Linhas C e D: plantas geneticamente modificadas de alface, expressando o gene que codifica para a proteína GCH1. Os números 1 a 3 indicam as repetições.

4 ELISA-direta

4.1 Material

- Anticorpo específico conjugado com fosfatase alcalina.
- O mesmo descrito no item 3.1 Material, exceto os anticorpos.

4.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 2.

1. Proceder como nas etapas 1 a 5 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2 Procedimento).
2. Adicionar 50 μL de anticorpo específico conjugado com fosfatase alcalina.
3. Incubar durante 2 a 4 horas, à temperatura ambiente.
4. Proceder como nos itens de 11 a 14 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2. Procedimento).

5 ELISA-sanduíche

5.1 Material

- O mesmo descrito no item 3.1 Material, exceto os anticorpos.
- Anticorpo específico conjugado com fosfatase alcalina.
- Anticorpo primário específico (de captura).

5.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão esquematizados na Figura 3.

1. Adicionar 50 μL de anticorpo primário específico (de captura), diluído em tampão PBS 1X, a cada poço. Incubar durante 2 horas, a 37 °C, ou durante 14 a 16 horas, à temperatura ambiente, em câmara úmida (Figura 4).

Para determinados testes, pode ser necessário colocar de 100 μL a 150 μL de anticorpo primário específico em cada poço.

2. Lavar e bloquear a placa como descrito nas etapas 2 a 5 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2 Procedimento).
3. Adicionar 50 μL do extrato de proteínas e incubar, no mínimo, por 2 horas, à temperatura ambiente.
4. Lavar a placa como descrito nas etapas 7 a 9 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2 Procedimento).
5. Adicionar 50 μL de anticorpo específico conjugado com fosfatase alcalina e incubar durante 2 horas, à temperatura ambiente.
6. Lavar a placa como descrito nas etapas 7 a 9 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2 Procedimento).
7. Revelar como nas etapas 13 e 14 do protocolo de ELISA-indireta (item 3.2 Procedimento).

5.3 Observações

No tampão de bloqueio, pode-se, em alguns casos, aumentar a concentração de BSA para 3% (p/v) ou substituí-la por leite em pó desnatado (\leq 1% de gordura) a 5%

(p/v). Entretanto, pode ocorrer interferência na ligação do anticorpo. Esses reagentes bloqueadores competem com proteínas (anticorpos, antígenos ou outras proteínas presentes no extrato vegetal) pela ligação em sítios não ocupados nos poços da placa de ELISA.

Os anticorpos específicos e os anticorpos conjugados devem ser diluídos em recipientes de polietileno ou vidro que não interagem facilmente com os anticorpos. Evitar a utilização de recipientes de poliestireno, polipropileno ou policarbonato.

As concentrações ótimas dos anticorpos e do extrato proteico devem ser empiricamente determinadas. Para tanto, deve-se dispor de extratos positivos e de antígenos purificados ou semipurificados.

Tanto anticorpo policlonal quanto monoclonal podem ser utilizados nos imunoenaios.

Para uma quantificação mais acurada, incluir as amostras em triplicata, além de controle positivo (proteína-alvo purificada ou semipurificada), negativo (extrato proteico de planta não transgênica) e controle de tampão (apenas tampão de extração) em cada teste.

Anticorpos produzidos em qualquer animal podem ser utilizados. Embora o soro total seja geralmente utilizado, é recomendado, em alguns protocolos, o uso da fração das imunoglobulinas (principalmente imunoglobulina G-IgG).

Ao utilizar conjugados com peroxidase, deve-se levar em conta que extratos de plantas podem conter

polifenol oxidases ou peroxidases endógenas que podem hidrolisar os substratos utilizados pela peroxidase, levando a resultados falsamente positivos.

Durante a aplicação das amostras e anticorpos nos poços, deve-se evitar a formação de bolhas. Em determinadas placas, a utilização de poços nas bordas pode causar reações inespecíficas, portanto, recomenda-se cautela na utilização de poços nas bordas das placas.

Para que o resultado do teste seja válido, o controle positivo deve apresentar coloração intensa, e o controle do tampão deve permanecer incolor (Figura 5). Para testes quantitativos, o coeficiente de variação entre três poços (repetições) deve ser menor que 20%.

6 Preparação de anticorpo conjugado à fosfatase alcalina

6.1 Material

- Agitador do tipo Vortex.
- Anticorpo (> 0,2 mg/mL) em tampão PBS.
- Filtro de 0,2 µm.
- Fosfatase alcalina (≥ 2.000 U/mg).
- Glutaraldeído 25% (v/v), utilizado em microscopia eletrônica.



Glutaraldeído é altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Lã de vidro.
- Sephadex G-25.
- Seringa de 10 mL.
- Tampão fosfato salina PBS 10X (Apêndice 4).
- Tampão PBSEL (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tampão PBS 10X	10 mL	1X
Etanolamina (<i>free base</i>)	600 μ L	100 mM
Lisina (<i>free base</i>)	1,46 g	100 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL (microtubos).

6.2 Procedimento

1. Em um microtubo, preparar uma mistura de anti-corpo:fosfatase alcalina (1:3) em tampão PBS.

A concentração final da mistura deve ser maior que 0,2 mg/mL.

Normalmente, uma preparação com 0,5 mg de anticorpo e 1,5 mg de fosfatase alcalina irá produzir uma quantidade de anticorpo conjugado suficiente para analisar de 200 a 800 placas de ELISA.

2. Adicionar glutaraldeído à mistura para uma concentração final de 0,2%. Incubar por 2 horas, à temperatura ambiente.

Durante a adição de glutaraldeído, o microtubo deve ser agitado vigorosamente em agitador do tipo Vortex.

3. Parar a reação adicionando 1 volume de tampão PBSEL.
4. Preparar a coluna de Sephadex-G25 para dessalinizar IgG-conjugado: misturar 3 g de Sephadex e 15 mL de tampão PBS. Agitar por 1 a 2 minutos e depositar a suspensão em uma seringa de 10 mL (fechar a saída da seringa com uma porção de lã de vidro). Deixar o tampão fluir por gravidade e aplicar mais 5 mL a 10 mL de tampão PBS para empacotar a resina. Em seguida, aplicar a amostra.

Colunas de Sephadex-G25 pré-empacotadas são comercializadas por diversas empresas.

5. Dessalinizar a amostra por meio de cromatografia na coluna de Sephadex G-25 em tampão PBS.
6. Coletar em frações correspondentes a 1/4 do volume da reação.
7. Analisar cada fração, adicionando 2 μ L da fração a um microtubo contendo 50 μ L de tampão de reação (etapa 13 do item 3.2 Procedimento). Juntar as frações que apresentarem reações de hidrólise mais fortes.
8. Filtrar utilizando um filtro de 0,2 μ m e guardar a 4 °C.

7 Referências

- ARAGÃO, F. J. L.; SÁ, M. F. G. de; ALMEIDA, E. R.; GANDER, E. S.; RECH, E. R. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 357-359, 1992.
- ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. da G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CERNARGEN, 1998. p. 239-249.
- BALDONI, A. B.; ARAÚJO, A. C. G.; CARVALHO, M. H.; GOMES, A. C. M. M.; ARAGÃO, F. J. L. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 1, p. 61-65, 2010.
- CRAVEN, G. R.; STEERS, E.; ANFINSEN, C. B. Purification, composition, and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K12. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 240, p. 2468-2477, 1965.
- CUNHA, N. B.; MURAD, A. M.; RAMOS, G. L.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M.; ARAÚJO, A. C.; LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M.; SOUZA, G. H.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 20, n. 4, p. 841-855, 2011.
- DODO, H. W.; KONAN, K. N.; CHEN, F. C.; EGNIN, M.; VIQUEZ, O. M. Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut Allergenicity. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 135-145, 2008.
- ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.
- HARLOW, E.; LANE, D. P. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 p.
- HOLLAND, V. R.; SAUNDERS, B. C.; ROSE, F. L.; WALPOLE, A. L. Safer substitute for benzidine in detection of blood. **Tetrahedron**, Oxford, v. 30, n. 18, p. 3299-3302, 1974.
- HORNBECK, P. Enzyme-linked immunosorbent assays. In: COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. (Ed.). **Current protocols in immunology**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 211-222.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, London, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.
- LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; MANSUR, E.; RECH, E. L. Particle bombardment of peanut (*Arachis hypogea* L.) cotyledons explants: transient expression of the 2S albumin gene from Brazil nut. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 9, p. 619-623, 1997.
- LI, B.; LEUNG, N.; CASWELL, K.; CHIBBAR, R. N. Recovery and characterization of transgenic plants from two spring wheat cultivars with low embryogenesis efficiencies by the bombardment of isolated scutella in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 39, n. 1, p. 12-19, 2003.
- MARCELLINO, L. H.; NESHICH, G.; SÁ, M. F. G. de; KREBBERS, E.; GANDER, E. S. Modified 2S albumins with improved tryptophan content are correctly expressed in transgenic tobacco plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 385, n. 3, p. 154-158, 1996.
- OLHOFT, P. M.; BERNAL, L. M.; GRIST, L. B.; HILL, D. S.; MANKIN, S. L.; SHEN, Y.; KALOGERAKIS, M.; WILEY, H.; TOREN, E.; SONG, H. S.; HILLEBRAND, H.; JONES, T. A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 536-549, 2007.
- POSTMANN, B.; POSTMANN, T.; NUGEL, E. Comparison of chromogens for the determination of horseradish peroxidase as a marker for enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v. 19, p. 435-439, 1981.
- SNYDER, S. L.; WILSON, I.; BAUER, W. The subunit composition of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in I M tris. **Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology**, Amsterdam, v. 258, n. 1, p. 178-187, 1972.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. **The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstract of microplate applications**. Alexania: Dynatech Laboratories, 1979.
- WEEMEN, B. K. van; SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 232-236, 1971.
- YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, London, v. 184, p. 1648-1649, 1959. Suppl. 21.

Capítulo 18

Imunocitoquímica

Ana Claudia Guerra de Araujo
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes

1 Introdução

A técnica de imuno-histoquímica é baseada na interação antígeno/anticorpo para localizar, por meio de microscopia, proteínas endógenas e exógenas em secções de tecidos fixados, ou seja, *in situ*. Essa técnica permite avaliar a distribuição espacial e temporal de proteínas, bem como de seus precursores, em tecidos, células, organelas e subestruturas celulares preservadas, como também acompanhar as etapas de processamento e translocação nos compartimentos. A imunodeteção pode ser de proteínas endógenas, tais como da ricina durante o desenvolvimento do fruto de mamona (BALDONI et al., 2010), ou de proteínas exógenas ou transgênicas, tais como proteínas humanas em vacúolos de sementes de soja (CUNHA et al., 2010), pré-protaumatina II em botões florais e frutos de pepino (SZWACKA et al., 2009), de alfa-zeína em endosperma de milho (COLEMAN et al., 2004), entre outros exemplos. Quando a detecção do antígeno é feita somente em células, a técnica de imuno-histoquímica é designada imunocitoquímica.

A técnica de imunocitoquímica, por envolver a interação antígeno-anticorpo e ser mais localizada e específica, traz vantagens em relação àquelas que utilizam colorações enzimáticas. A imunocitoquímica é normalmente utilizada quando não se têm maiores informações sobre a sequência nucleotídica ou proteica de interesse, visando a uma análise qualitativa e não quantitativa. Reproduzível, possui alta sensibilidade e especificidade, e tem potencial para detectar múltiplos antígenos si-

multaneamente, apesar de ser primariamente utilizada para revelar somente uma proteína. Utilizam-se, para imunodeteção, anticorpos ou imunoglobulinas, que são glicoproteínas que reconhecem antígenos, os quais são moléculas complexas contendo proteínas, polissacarídeos e/ou lipopolissacarídeos. O reconhecimento estrutural e químico desses componentes promove uma interação antígeno-anticorpo precisa, por meio de ligação não covalente. Os anticorpos distinguem a conformação estrutural e isômera do antígeno.

A interação antígeno-anticorpo pode ser detectada diretamente pelo anticorpo primário (detecção direta) conjugado a um marcador químico detectável. Na maioria das vezes, esse marcador é um fluorocromo. Entretanto, a interação antígeno-anticorpo é frequentemente detectada de forma indireta, por meio do uso de um anticorpo secundário que tem afinidade pelo anticorpo primário ou por proteínas com capacidade de reconhecer anticorpos (como a proteína A e G). Tanto o anticorpo secundário como essas proteínas estão conjugados a um marcador químico. Diferentes marcadores químicos podem ser conjugados aos anticorpos (primário e secundário) ou às proteínas A e G (BENDAYAN, 1984), tais como: radioisótopos, enzimas, fluoróforos para microscopia de luz (ML) ou, ainda, na microscopia eletrônica (ME), os marcadores são conjugados às partículas eletrondensas como tungstênio ou ouro coloidal (FAULK; TAYLOR, 1971), que aumentam a dispersão de elétrons e auxiliam na formação de imagens com alto contraste na forma de pontos pretos.

Para a correta detecção de antígenos, é necessário que o componente a ser detectado (alvo) esteja estabilizado, ou seja, com a sua composição química e conformação estrutural preservadas, principalmente seu epitopo. O processamento cuidadoso da amostra contendo o alvo é, portanto, primordial para o sucesso da detecção, pois caso o alvo esteja alterado ou, ainda, não acessível, o anticorpo não o reconhecerá. Além disso, a escolha do tipo de anticorpo, de sua especificidade e de sua concentração são fundamentais para que o complexo antígeno-anticorpo seja estável e em quantidade suficiente para detecção.

A escolha do tipo de microscopia a ser utilizada na detecção da interação antígeno-anticorpo por meio de imunocitoquímica está baseada no conceito de limite de resolução, definido como a distância mínima existente entre dois pontos, de modo a ser ainda possível distingui-los como entidades separadas. Quanto menor for a estrutura celular da amostra a ser observada, menor deve ser o limite de resolução, ou seja, os pontos ainda distintos como dois podem estar bem próximos entre si, mas poderão ser vistos como dois. Segundo a fórmula de Abbe [$d = \lambda / (2NA_{obj})$], o limite de resolução (d) é diretamente proporcional ao comprimento de onda da luz (λ) e inversamente proporcional ao tamanho da abertura numérica das lentes do microscópio escolhido (NA_{obj}). Portanto, quanto menor o comprimento de luz, menor será o limite de resolução e, conseqüentemente, maior a resolução da imagem. A ME utiliza a emissão do feixe de elétrons, que interage com a amostra e utiliza os diversos elétrons

resultantes dessa interação para formar a imagem. Como o comprimento de onda dos elétrons é bem menor do que das demais fontes de iluminação em microscopia, o limite de resolução (d) é menor. Portanto, a ME permite distinguir dois pontos bastante próximos entre si, que seriam observados como um único ponto em ML (luz visível), microscópio de epifluorescência (luz ultravioleta) ou, ainda, microscopia de varredura a laser confocal (laser). Por esse motivo, a imunocitoquímica ultraestrutural, que corresponde à técnica de imunocitoquímica por meio da ME, traz mais sensibilidade e maior resolução das estruturas que outras técnicas de imunodetecção com outros microscópios, como a coloração enzimática em ML e, conseqüentemente, uma informação mais acurada sobre a localização das proteínas *in situ* (FAULK; TAYLOR, 1971).

Pode-se aplicar a imunocitoquímica ultraestrutural para análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual o alvo deve estar na superfície da amostra, ou em microscopia eletrônica de transmissão (MET), que, por suas características, juntamente com a forma de preparação de amostras, permite a visualização de compartimentos internos da estrutura celular e tecidual que contém a proteína-alvo.

A preparação de amostras para análise por imunocitoquímica ultraestrutural para observações em MET requer atenção quanto à fixação, desidratação e espessura das secções das amostras para garantir a formação da imagem com qualidade. Recomenda-se que a detecção do complexo antígeno-anticorpo seja realizada por via

indireta, isto é, usando anticorpos ou proteínas conjugadas às partículas elétron-densas (BENDAYAN, 1984; FAULK; TAYLOR, 1971). Partículas de ouro coloidal com diâmetros entre 5 nm e 50 nm conjugadas ao anticorpo secundário ou às proteínas, comercialmente disponíveis, são visualizadas em MET como pontos uniformes pretos, bastante densos.

Neste capítulo, serão apresentados os procedimentos experimentais da técnica de imunocitoquímica

ultraestrutural para MET que são utilizados rotineiramente na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As principais etapas da técnica estão esquematizadas na Figura 1. Variações nos protocolos e etapas experimentais adicionais, bem como adaptações para preparação de amostras e formas de detecção em ML e microscópio de fluorescência, podem ser encontradas na literatura (BOZZOLA; RUSSELL, 1999; BUCHWALOW; BÖCKER, 2010; DASHEK, 2000; DYKSTRA, 1993; HAYAT, 2000; RENSHAW, 2007).

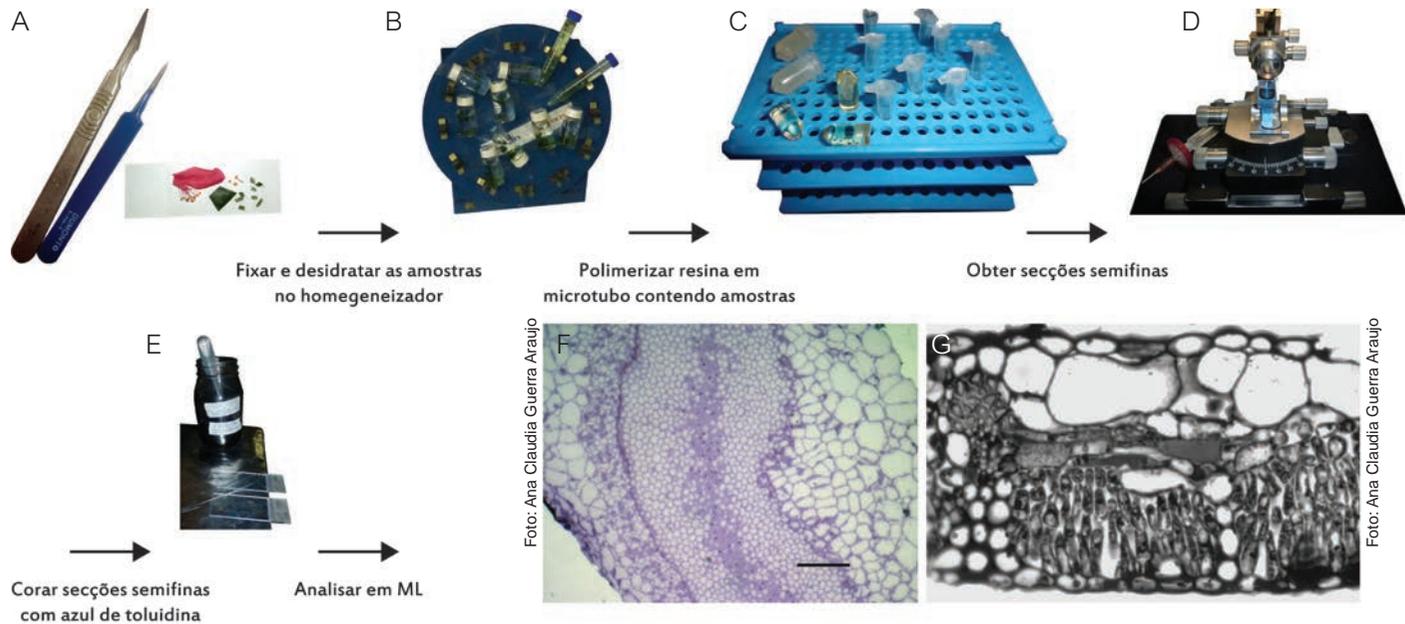


Figura 1. Principais etapas do processamento de amostras (A–C) e obtenção de seções semifinas (D–E) para análise da qualidade da amostra em microscopia de luz (ML). Micrografia de secção longitudinal de semente 10 dias após polinização de mamona (*Ricinus communis*) (F) e secção transversal da epiderme foliar de amendoim (*Arachis hypogaea*) (G), ambas coradas com azul de toluidina.

2 Coleta e processamento de amostras

2.1 Material

- Caixa refletora de inox (ou caixa de isopor revestida por papel laminado), com lâmpada ultravioleta (UV) com 6 W a 8 W, com 15 cm a 20 cm de distância do suporte para cápsulas.
- Capela de exaustão.
- Cápsulas de gelatina transparente.
- Etanol absoluto.
- Homogeneizador para tubos ou vidros.
- Microscópio estereoscópico.
- Pinça com ponta fina (3 mm).
- Resina para imunocitoquímica ultraestrutural (polimerização a baixa temperatura, preferencialmente).

Para polimerização de **resinas**, normalmente são utilizados agentes tóxicos. Verificar, antes da preparação, quais os cuidados necessários para manipulação e descarte da resina utilizada. Sua manipulação deve ser feita com luvas em capela de exaustão.



- Solução de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 95% (v/v).

- Solução fixadora (100 mL):

Componente	Quantidade	Concentração
Glutaraldeído 25%	2 mL	0,5%
Solução de paraformaldeído 10%	20 mL	2%
Tampão cacodilato de sódio 0,2 M	25 mL	0,05 M
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Preparar imediatamente antes do uso.

A concentração de glutaraldeído e a de formaldeído podem variar de acordo com a origem da amostra. Combinações de 4% formaldeído contendo ou não glutaraldeído são frequentemente usadas para localização de proteínas de origem vegetal ou animal.

- Solução de glutaraldeído 25% (v/v) comercial.



Glutaraldeído é altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Solução de formaldeído 10%: aquecer 90 mL de água destilada a 65 °C e adicionar 10 g de paraformaldeído, sob agitação, em capela de exaustão. Após total dissolução do pó, ajustar o pH da solução para o valor de 7,2 utilizando gotas de NaOH 10N (Apêndice 4) e, então, completar o volume para 100 mL. Distribuir em alíquotas de 5 mL em tubos plásticos, sem deixar ar em excesso (pois este altera as propriedades do formaldeído), e armazenar a -20 °C.



Paraformaldeído é considerado provável agente mutagênico e altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Suporte para cápsulas, tipo estante, que permita a passagem de luz por toda a cápsula.
- Tampão cacodilato de sódio 0,2 M: dissolver 32 g de cacodilato de sódio tri-hidratado $[\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2]$ em 900 mL de água destilada. Ajustar o valor do pH para 7,2 com gotas de HCl 5 N e então completar o volume para 1 L. Armazenar a 4 °C.



Cacodilato de sódio possui ácido arsênico, o qual é altamente tóxico por inalação, ingestão e contato com pele. Pode provocar queimaduras e possíveis efeitos cancerígenos. Sua manipulação deve ser feita com luvas em capela de exaustão.

O tampão cacodilato pode ser substituído por PBS pH 7,0 ou tampão PIPES pH 6,9.

- Tubos para microcentrífuga (microtubos) de 1,5 mL (obrigatoriamente transparentes ou brancos leitosos e com tampa).
- Tubos plásticos ou vidros para cintilação de 3 mL.

2.2 Procedimento

1. Isolar porções da amostra com aproximadamente 1 mm² sobre uma lâmina ou superfície limpa, com auxílio de pinça fina e bisturi (Figura 1A). Incubar em

solução fixadora a 4 °C por 12 horas, sob movimentação no homogeneizador para tubos (Figura 1B).

Essa coleta de amostra pode ser efetuada sob um microscópio estereoscópico para melhor seleção da região de interesse. A troca de solução para fixação deve ser feita para incubações mais longas, como no caso de amostras mais sólidas e difíceis de ser infiltradas.

A solução fixadora deve ser preparada em volume cinco vezes maior que da amostra e utilizada logo após sua preparação. A identificação de tubos deve ser feita à caneta permanente e recoberta com fita adesiva transparente.

2. Remover solução fixadora com auxílio de uma pipeta e adicionar tampão cacodilato de sódio (com volume pelo menos cinco vezes superior ao da amostra) por 15 minutos. Manter em rotação no homogeneizador por 10 minutos. Repetir esta etapa duas vezes.
3. Remover quase todo o tampão com auxílio de uma pipeta, deixando um pouco para que a amostra não sofra dessecação. Adicionar solução de etanol 30% e manter por 1 hora a 4 °C. Repetir procedimento com etanol 50%, 70%, e, por duas vezes, com etanol 90% e duas vezes com etanol 95%. A amostra deve permanecer por 1 hora em cada solução.

Material mais sólido pode ser desidratado por 2 horas ou mais; para tanto, fazer uma interrupção da incubação a 70% por 12 horas e dar prosseguimento no dia seguinte. Não se deve interromper em concentração de etanol outra que não 70%. Diluição é feita em água.

As soluções de etanol devem ser preparadas logo antes da utilização e colocadas em volume ao menos cinco vezes maior que o da amostra.

Fazer as trocas de soluções rapidamente, sem deixar a amostra dessecar.

Todas as etapas de lavagem com tampão e desidratação devem ser realizadas em rotação no homogeneizador.

4. Remover um terço do volume de etanol 95% e completar com resina a 4 °C, manter em rotação por 12 a 24 horas.
5. Remover metade do volume do tubo e completar com resina a 4 °C, manter em rotação por 12 a 24 horas. Repetir uma vez essa etapa.
6. Remover o volume total do tubo e completar com resina a 4 °C, manter em rotação por 12 a 24 horas. Repetir essa etapa pelo menos por mais uma vez.

Todas as etapas de infiltração das amostras com resina devem ser realizadas em rotação no homogeneizador.

As amostras podem ser armazenadas na resina a 4 °C por semanas ou até meses, caso seja necessário antes de proceder à polimerização.

7. Identificar a amostra a lápis em pequeno pedaço de papel e encostá-lo, com a ajuda de uma pinça de ponta fina, à parede interna da cápsula. Logo após, colocar um pouco de resina na cápsula, e inserir a amostra no fundo do tubo, dispondo-a na posição desejada.
8. Completar o volume do tubo com resina a 4 °C até o topo e fechar bem a cápsula.

A presença de oxigênio interfere na polimerização da resina. Portanto, a cápsula deve estar completa com resina e bem tampada.

A orientação da amostra deve ser feita no tubo (na vertical ou na horizontal) de acordo com a intenção em se obterem em secções transversais ou longitudinais.

9. Colocar as cápsulas no suporte, e este, na caixa refletora de inox no congelador a -20 °C por 24 a 72 horas.

10. Proceder à microtomia da amostra para obtenção de secções semifinas e ultrafinas.

2.3 Observações

A preparação das amostras é etapa fundamental para o sucesso de imunocitoquímica ultraestrutural, cujos principais objetivos são manter as características químicas e estruturais do antígeno da proteína em estudo e preservar toda a ultraestrutura celular. Portanto, desde a coleta até a obtenção das secções ultrafinas, é importante considerar o tipo de amostra, a acessibilidade ao sítio antigênico, o anticorpo e o método de detecção, fazendo as alterações necessárias e ajustando o protocolo.

Se as células possuem parede celular espessa, com quitina, queratina ou lignina, a penetração das soluções será mais difícil. Pode-se, então, aumentar o tempo de fixação, ou utilizar a condição de baixo vácuo por 1 hora, ou uma combinação dessas duas estratégias. Caso a amostra possua alto teor de lipídeos, sugere-se o tampão PIPES 0,2 M, pH 7,4 e um cuidado maior durante a desidratação, com períodos maiores a 4 °C.

A desidratação anterior à infiltração (etapas 3 a 5 do item 2.2 Procedimento) é importante e deve finalizar a 90% ou 95% de etanol, dependendo da resina escolhida para inclusão das amostras.

Uma variedade de resinas desenvolvidas para a infiltração de amostras utilizadas em imunocitoquímica ultraestrutural está disponível comercialmente. Essas

- Papel de filtro.
- Pinça de ponta fina (0,3 mm).
- Pisseta com água bidestilada.
- Placa de Petri.
- Solução aquosa de acetato de uranila 2%: dissolver 0,2 g de acetato de uranila em 10 mL de água destilada. Armazenar em frasco escuro, à temperatura ambiente, em ambiente de contenção.



Acetato de uranila é um componente radioativo.

A manipulação de **material radioativo** deve ser realizada com luvas cirúrgicas, óculos de proteção, jaleco de manga comprida e sempre utilizando uma proteção de acrílico. Deve-se checar a limpeza das bancadas e do material utilizado com um contador Geiger e proceder à limpeza, com água e sabão, caso sejam detectadas eventuais contaminações.

- Solução de azul de toluidina 0,5%: dissolver 0,5 g de azul de toluidina em 100 mL de água destilada. Filtrar a solução e estocar em frasco escuro, à temperatura ambiente.
- Ultramicrótomo.

3.2 Procedimento

Microtomia, obtenção de secções semifinas (Figura 1)

1. Remover a cápsula plástica envoltória da amostra polimerizada com auxílio de uma lâmina de inox, expondo a inclusão com a amostra.
 2. Prender a base da inclusão (oposto ao da amostra) ao porta-amostra do micrótomo e remover o excesso de resina em torno da amostra com lâmina, utilizando o microscópio estereoscópico e deixando, aproximadamente, 2,5 mm² de superfície.
 3. Prender o porta-amostra ao braço giratório do ultramicrótomo, colocar a navalha de vidro no micrótomo e ajustar a distância entre a face da superfície da inclusão, onde está a amostra, e o fio cortante da navalha.
- Verificar instruções específicas de uso do ultramicrótomo utilizado.
4. Proceder à microtomia para obter secções semifinas com 2 µm a 4 µm de espessura. Recolher cada secção individualmente, com auxílio de uma pinça, e depositar 4 a 5 secções em uma pequena gota de água (15 µL) sobre uma lâmina histológica limpa. Secar a gota na chama da lamparina ou em placa aquecedora a 37 °C.
 5. Adicionar uma gota do corante azul de toluidina sobre as secções, aquecer rapidamente a gota em chama ou placa aquecedora e remover o excesso de corante por meio de lavagens repetitivas com a pisseta contendo água.
- Deve-se colocar o bico da pisseta na parte posterior, que não contém a amostra da lâmina, e deixar a água escorrer por 1 ou 2 minutos sobre toda a área da lâmina.

- Colocar uma gota de água sobre as secções e colocar uma lamínula sobre a gota. Remover o excesso de água entre lâmina e lamínula pressionando com um papel de filtro e examinar secções sob microscópio de luz.

Deve-se verificar se a secção contém área de interesse, se está preservada e bem infiltrada, e a superfície lisa.

- Documentar as imagens das secções semifinas. Uma vez confirmada a qualidade da preparação da amostra nas secções semifinas em microscopia de luz e selecionada a área da amostra onde a presença da proteína será detectada, proceder à ultramicrotomia. Para tal, a área para seccionamento ultrafino deve ser reduzida a 0,5 mm² e, portanto, é necessário desbastar, com uma lâmina cortante, o excesso de resina e amostra que não serão seccionadas.

Ultramicrotomia: obtenção de secções ultrafinas (Figura 2)

- Remover ainda mais o excesso de resina em torno da amostra na inclusão (etapa 2 deste item), deixando a superfície com, aproximadamente, 0,3 mm².

A remoção da resina deve ser cautelosa, e a área de seccionamento deve incluir somente aquela que interessa na amostra.

- Prender o porta-amostra no braço giratório do ultramicrotomo, trocar a navalha de vidro pela de diamante e encher com água destilada a superfície da navalha até formar uma superfície espelhada,

utilizando uma seringa com um filtro, para inserir a água e evitar que impurezas contaminem a amostra quando a secção for coletada.

Verificar as instruções específicas de uso do ultramicrotomo utilizado.

- Aproximar a amostra ao fio cortante da navalha e proceder à ultramicrotomia para obtenção de secções ultrafinas com, aproximadamente, 70 nm de espessura.
- Segurar, com o auxílio de uma pinça, a grade de níquel na borda fosca e, por meio da imersão da grade na água da navalha, recolher aproximadamente 10 a 20 secções ultrafinas por grade, em um único movimento de inserção da grade na água.

A pinça deve ser antimagnética, e as secções devem ser esticadas, antes de serem recolhidas, em éter ou clorofórmio por meio da aproximação (sem encostar) de uma haste flexível de plástico com algodão na ponta, embebido no líquido.

- Depositar a grade contendo as secções ultrafinas coletadas sobre papel de filtro. Colocar o papel de filtro com a grade em uma placa de Petri para secar, à temperatura ambiente, por 12 horas.
- Contrastar a grade para aumentar a elétron-densidade dos componentes celulares no MET, colocando o lado que contém as secções em contato com a gota de acetato de uranila, que está sobre superfície plástica dentro de placa de Petri recoberta por papel alumínio, em condição escura, por 30 a 40 minutos. Esta etapa deve ser realizada dentro da caixa de contenção de radioatividade,

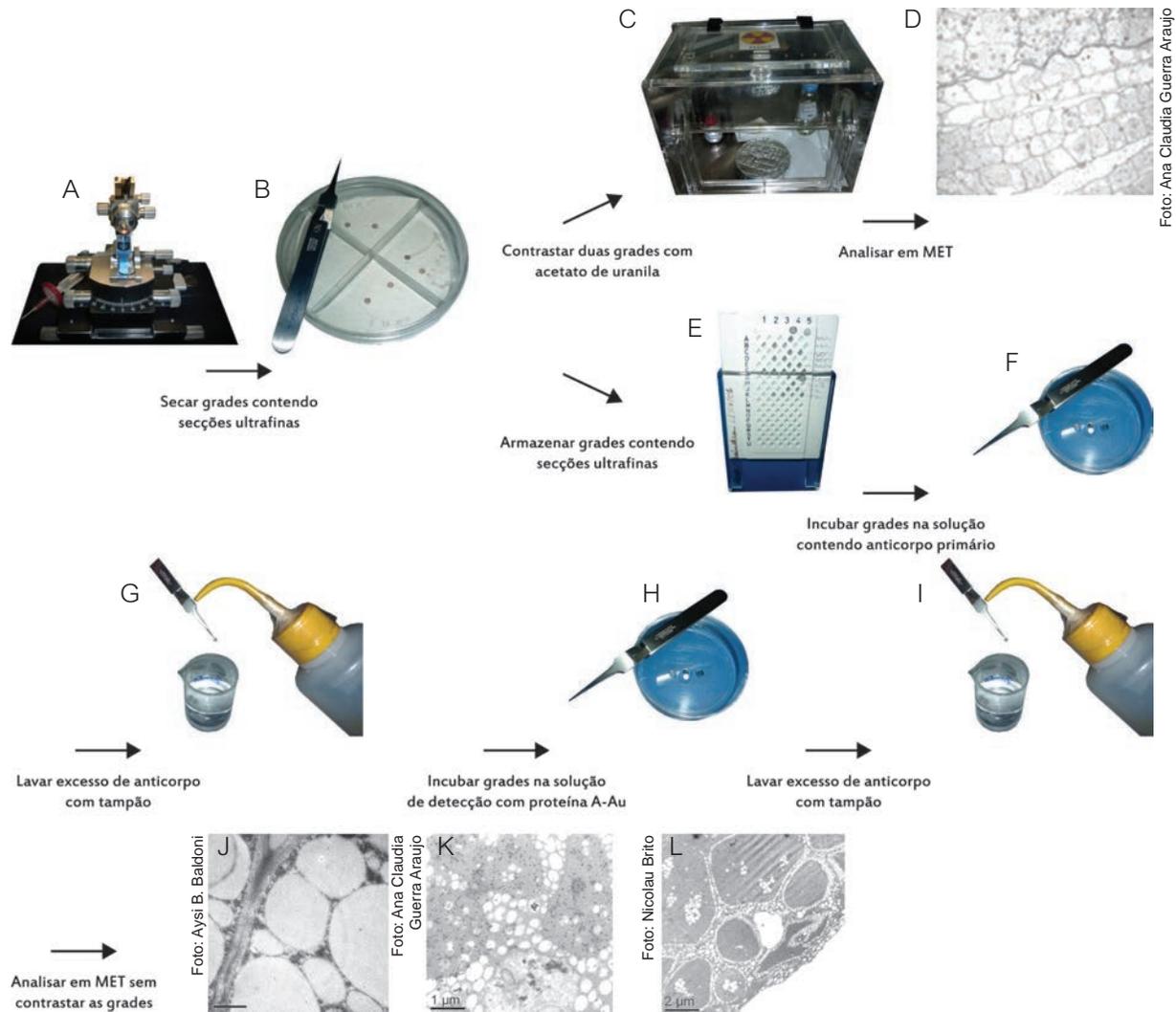


Foto: Ana Claudia Guerra Araujo

Figura 2. Principais etapas de obtenção de secções ultrafinas (A–B), análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (C–D), imunocitoquímica ultraestrutural (E–I) e observações em MET (J–L). Secções de semente de mamona (*Ricinus communis*) (J) e soja (*Glycine max*) (K–L) após realização de imunocitoquímica ultraestrutural utilizando, para detecção, anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal, detectáveis nas estruturas de armazenamento das sementes.

resinas podem ser polimerizadas a baixa temperatura e apresentam tolerância a uma pequena quantidade de água durante sua polimerização, permitindo que a amostra guarde um pouco de umidade e, assim, altere menos sua estrutura, graças à manutenção da polaridade proteica.

A escolha da resina deve considerar o menor grau de extração de componentes celulares e extracelulares, maior solubilidade em solventes orgânicos utilizados no processo de desidratação, facilidade para penetração na amostra e polimerização, facilidade para o seccionamento ao ultramicrotomo, menor variação de seu volume durante a polimerização e estabilidade ao feixe de elétrons ao MET (revisto por NEWMAN; HOBOT, 1999). Existem resinas à venda que atendem à maior parte desses requisitos, além de apresentarem uma viscosidade próxima à da água, o que permite a utilização em qualquer tipo de célula ou tecido, principalmente naquelas de difícil penetração, como as células vegetais.

A polimerização sob UV traz algum aquecimento à resina e, conseqüentemente, à amostra. Por isso, deve-se polimerizar a resina com as amostras a baixas temperaturas. Agentes aceleradores da polimerização a baixa temperatura normalmente acompanham os kits das resinas, visando aumentar a chance de preservação das ultraestruturas celulares. Deve-se ter atenção ao completar a cápsula contendo a amostra com resina até o topo, e, assim, diminuir a presença de ar, fator que dificulta a polimerização.

3 Microtomia e ultramicrotomia

3.1 Material

- Caixa em acrílico para contenção de radioatividade (Capítulo 11).
- Filme plástico de PVC.
- Grades de níquel para MET com 200 mesh (= 200 malhas em grade com 2,54 cm de diâmetro) recobertas com Formvar (polímero de álcool polivinila e formaldeído, como copolímeros com acetato de polivinila, usado como suporte para grades para TEM), que podem ser comercialmente adquiridas.
- Lâmina de inox para barbeador.



Evitar ferimentos causados pela lâmina.

- Lâminas histológicas.
- Lamparina.
- Microscópio de luz.
- Microscópio eletrônico de transmissão (MET).
- Microscópio estereoscópico.
- Navalhas de vidro para microtomia.
- Navalha de diamante para ultramicrotomia.

em capela de exaustão (Capítulo 11). Guardar as demais grades em caixa coberta para proteger de poeira.

A face da grade contendo as secções deve estar voltada para a gota de acetato de uranila.

Não há necessidade de contrastar todas as grades ao mesmo tempo, pois podem ser armazenadas para posterior contrastação (ver o item 3.3 Observações).

14. Lavar repetidamente a grade utilizando uma pisseta com água.
15. Depositar a grade contrastada sobre papel de filtro e colocar dentro de placa de Petri para secar por 12 horas.
16. Analisar em MET a qualidade do material (Figura 2).

A qualidade da amostra deve ser obrigatoriamente avaliada antes de prosseguir com a imunocitoquímica. A secção deve conter a área desejada, e a grade deve ter a repetição dessa área. Deve-se confirmar se a fixação foi adequada (estruturas celulares íntegras), se houve limpeza da preparação, e estabilidade da secção quando exposta ao feixe.

3.3 Observações

Durante o seccionamento das amostras, deve-se selecionar a área onde se espera a presença da proteína a ser detectada pela técnica de imunocitoquímica.

A qualidade das secções ultrafinas depende, principalmente, da preparação da amostra. Por isso, o tecido deve estar bem preservado e a seleção de área deve ser previamente avaliada em microscopia de luz. A etapa de

retirada do excesso de resina em torno da amostra pode ser feita sob microscópio estereoscópico, desde que a amostra esteja presa em base fixa para evitar acidentes com a lâmina. Deve haver um compromisso entre a área da amostra a ser observada e a menor face adequada para seccionamento (quanto menor a área de seccionamento, maior será a qualidade das secções).

As navalhas de vidro utilizadas para microtomia de secções semifinas são produzidas a partir de barras de vidro comercialmente adquiridas, com espessura e qualidade adequadas, utilizando-se equipamento adequado para confecção de navalhas (*knifemaker*). As navalhas de vidro também podem ser usadas para ultramicrotomia, desde que um suporte plástico para permitir a formação da superfície de água, para contenção das secções ultrafinas, seja colado à navalha.

A coloração de secções semifinas com azul de toluidina, corante acidófilo, para avaliação da qualidade de preparação da amostra, é a mais comumente utilizada. Mas pode ser substituída por carmim acético, azul de metileno ou outros corantes. Quando a coloração azul fica muito fraca nas estruturas, pode-se colorir a lâmina novamente. Quando muito forte, pode-se removê-la com etanol, mas essa remoção não é uniforme.

Células produzem pouco contraste quando observadas em MET, em razão de sua composição elementar (C, H, O, N). Para aumentar o contraste e facilitar a visualização das estruturas celulares, agentes contrastantes tais como uranila e citrato de chumbo são utilizados para

contrastar negativamente a secção ultrafina (REYNOLDS, 1963).

A utilização de grades limpas é essencial, pois um grão de poeira pode sobrepor-se à área de interesse. Podem-se usar caixas específicas para armazenagem de grades, comercialmente disponíveis, ou utilizar papel de filtro em placas de Petri.

Grades contendo secções podem ser armazenadas para posterior contrastação. Para tanto, a grade pode ser recoberta, após limpeza, com solução de Formvar ou colódio e armazenadas à temperatura ambiente por, no máximo, 2 a 3 meses, resguardada de poeira.

A ultramicrotomia deve gerar secções ultrafinas, mas que permitam algum contraste e resistam ao feixe eletrônico do MET. A espessura recomendada é de 50 nm até 90 nm caso as secções estiverem se rompendo.

A avaliação da qualidade das secções em MET deve considerar: a estabilidade da película sob o feixe eletrônico, sua limpeza, o contraste da amostra, a adequação da espessura para o foco, a estabilidade da secção na área desejada, e a preservação e repetição das estruturas de interesse. Em caso positivo, pode-se continuar o procedimento de imunocitoquímica com as grades que não foram contrastadas. Aquelas já contrastadas nas etapas 13 e 14 deste item podem ser úteis para micrografias das estruturas.

4 Imunocitoquímica ultraestrutural por meio indireto (Figura 2)

4.1 Material

- Albumina de soro bovino (BSA).
- Anticorpo primário: diluir anticorpo primário em solução de bloqueio 1:250 (v/v).
- Béqueres de 20 mL.
- Detergente não iônico (detergente neutro).
- Filme plástico de PVC.
- Grades com secções ultrafinas da amostra sem contraste (item 3.2 Procedimento).
- Microscópio eletrônico de transmissão (MET) com câmera para fotografia, com filme fotográfico ou com captação digital de imagens.
- Papel de filtro.
- Pinça de ponta fina (0,3 mm).
- Pisseta com água bidestilada.
- Placa de Petri.
- Proteína A conjugada com partícula de ouro coloidal 15 nm (comercial).

- Solução aquosa de acetato de uranila 2% (item 3.1 Material).
- Solução de bloqueio: detergente não iônico a 0,5% e BSA 2% (p/v) em tampão PBS 1X.
- Solução de detecção: proteína A conjugada com partícula de ouro coloidal com 15 nm de diâmetro diluída 1:500 (v/v) em tampão PBS 1X.
- Tampão Fosfato Salina – Tampão PBS (Apêndice 4).

4.2 Procedimento

1. Colocar gotas da solução de bloqueio sobre um filme plástico, em placa de Petri. Incubar as grades contendo secções ultrafinas flutuando sobre a gota da solução de bloqueio, por 1 hora, à temperatura ambiente.
2. Retirar as grades da gota com auxílio de uma pinça e remover o excesso de solução encostando a grade em papel de filtro.
3. Colocar uma gota de anticorpo primário sobre o filme plástico, em placa de Petri, e incubar a grade, por 1 hora, à temperatura ambiente.

Reservar duas grades sem incubar em anticorpo primário como controle negativo, deixando-as em tampão PBS (etapa 6 deste item) até a etapa de incubação na solução de detecção.

4. Incubar a grade em gota de tampão PBS 1X por 30 minutos. Repetir duas vezes o procedimento.

5. Incubar a grade em solução de detecção por 1 hora.
6. Incubar a grade em gota de tampão PBS 1X por 15 minutos. Repetir duas vezes o procedimento.
7. Lavar repetidamente a grade utilizando pisseta com água.
8. Remover o excesso de água e guardar a grade sobre papel de filtro, com a face contendo as secções voltadas para cima. Deixar as grades sobre papel, dentro de placa de Petri, secando por, pelo menos, 12 horas.
9. Contrastar a grade com acetato de uranila por 15 minutos.

Lembrar que a face da grade contendo as secções deve estar voltada para a gota, e também de não contrastar todas as grades.

10. Lavar repetidamente a grade com água utilizando pisseta.
11. Depositar a grade contrastada sobre novo papel de filtro, com a face contendo as secções voltadas para cima. Deixar as grades dentro de placa de Petri secando por, pelo menos, 12 horas.
12. Analisar e fotodocumentar em MET sem contrastação negativa.

4.3 Observações

A vantagem da utilização das partículas de ouro, tanto conjugadas à proteína A como ao anticorpo se-

cundário, está na maior definição da imagem em razão da elétron-densidade do ouro e da uniformidade morfológica. Além disso, pode-se fazer a detecção de dois antígenos ao mesmo tempo, utilizando dois diâmetros diferentes de partículas de ouro no mesmo experimento.

Existem diversas estratégias para realização da imunocitoquímica, como a pré ou pós-inclusão. A pré-inclusão consiste na detecção da proteína na amostra antes da inclusão em resina, enquanto a pós-inclusão é a que aqui foi detalhada. No método de pré-inclusão, primeiro se faz a detecção imunocitoquímica da proteína alvo, e depois se fixa, desidrata e inclui a amostra em resina. No método pós-inclusão, primeiro processa-se a amostra, secciona-se e, então, faz-se a detecção. A escolha pelo método vai depender se o alvo é suficientemente estável para a detecção antes do processamento da amostra.

A etapa de bloqueio é uma forma de hidratar as secções, facilitando a penetração do anticorpo, e de bloquear grupamentos reativos presentes na amostra e na resina. Outros agentes bloqueadores, além de detergente não iônico e de BSA, também podem ser usados, como cloreto de amônio, albumina, polietilenoglicol, detergentes iônicos, entre outros.

A concentração e o tempo de incubação da grade no anticorpo primário devem ser estabelecidos experimentalmente. Esse tempo dependerá da afinidade/especificidade do anticorpo e da disponibilidade dos sítios antigênicos. Também para o anticorpo primário, a concentração e o tempo de incubação com o anticorpo

secundário ou proteína A marcados dependerão do número e da disponibilidade do complexo antígeno-anticorpo formado. O aumento no tempo de incubação normalmente não traz benefícios, somente aumenta as ligações inespecíficas (*background*).

5 Referências

BALDONI, A. B.; ARAÚJO, A. C. G.; CARVALHO, M. H.; GOMES, A. C. M. M. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 1, n. 2, p. 61-65, 2010.

BENDAYAN, M. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications, and limitations. **Journal of Electron Microscopy Technique**, New York, v. 1, n. 3, p. 243-270, 1984.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Sudbury: Jones and Bartlett, 1999. 670 p.

BUCHWALOW, I. B.; BÖCKER, W. **Immunohistochemistry: basics and methods**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. 168 p.

COLEMAN, C. E.; YOHO, P. R.; ESCOBAR, S.; OGAWA, M. The accumulation of alpha-zein in transgenic tobacco endosperm is stabilized by co-expression of beta-zein. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, n. 7, p. 864-871, 2004.

CUNHA, N. B.; ARAÚJO, A. C. G.; LEITE, A.; MURAD, A. M.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. **Genetic Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 1163-1170, 2010.

DASHEK, W. V. **Methods in plant electron microscopy and cytochemistry**. Totowa: Human Press, 2000. 257 p.

DYKSTRA, M. J. **A manual of applied techniques for biological electron microscopy**. New York: Plenum Press, 1993. 257 p.

FAULK, W. P.; TAYLOR, G. M. An immunocolloid method for the electron microscope. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 1081-1083, 1971.

HAYAT, M. A. **Principles and techniques of electron microscopy:** biological applications. New York: Cambridge University Press, 2000. 543 p.

NEWMAN, G. R.; HOBOT, J. A. Resins for combined light and electron microscopy: a half century of development. **The Histochemical Journal**, Dordrecht, v. 31, n. 8, p. 495-505, 1999.

RENSHAW, S. (Ed.). **Immunohistochemistry:** methods express. Oxfordshire: Scion Publishing, 2007. 300 p. (Methods Express Series).

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

SZWACKA, M.; SIEDLECKA, E.; WOJTASIAK, R. Z. Expression pattern of the pre-prothaumatin II gene under the control of the CaMV 35S promoter in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) flower buds and fruits. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2009.

Capítulo 19

Detecção e análise
de proteínas pela
técnica *Western blot*

Lucília Helena Marcellino
Maria Fátima Grossi de Sá

1 Introdução

Recentes estudos em genômica vegetal resultaram em um aumento significativo do conhecimento a respeito de diversos genes, como sequência nucleotídica, localização no cromossomo, níveis de expressão e função. Entre esses estudos, cita-se o sequenciamento de diversos genomas de plantas como: arábida (*Arabidopsis thaliana*), soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), videira (*Vitis vinifera*) e álamo (*Populus trichocarpa*) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2012). Esses conhecimentos ampliaram as possibilidades de utilização dos genes em sistemas heterólogos, em particular em plantas, permitindo a expressão de proteínas para estudos de estrutura, função ou para fins biotecnológicos. A detecção específica de proteínas é, então, uma importante ferramenta auxiliar para esses estudos, e a técnica *Western blot* (ou *immunoblot*) é muito utilizada para tal fim.

Na técnica *Western blot*, a detecção de proteínas específicas ocorre após a separação de uma mistura de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida e sua transferência para membranas de nitrocelulose ou náilon. A detecção é feita pelo uso de anticorpos, que reagem especificamente com epitopos da proteína em estudo e de reações colorimétricas ou radiográficas. Dessa maneira, a técnica combina a resolução de uma eletroforese com a especificidade da detecção imunológica. A Figura 1 ilustra o uso de *Western blot* para a análise de sementes de variedades de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*). Nesse

exemplo, a arcelina, proteína potencialmente envolvida no processo de resistência a pragas de armazenamento, é identificada no extrato proteico de sementes do acesso selvagem, mas não nas variedades domesticadas.

Essa técnica é uma importante ferramenta para a análise de plantas transgênicas. Por meio dela, a expressão de uma proteína, resultante da tradução de um transgene, pode ser avaliada. Pode-se determinar a presença e a quantidade da proteína e se ela mantém suas características de peso molecular e processamento ou, ainda, identificar o local de expressão na planta transgênica, ou seja, raiz, folha, semente, etc. Essa técnica, por exemplo, foi utilizada para avaliar a expressão do transgene HNL (codante para a hidroxinitrilo liase, uma enzima envolvida na degradação de compostos cianogênicos) em folha e raiz de mandioca (*Manihot esculenta*) (NARAYANAN et al., 2011). É possível também utilizar *Western blot* para detecção da expressão transiente de proteínas (DUBIN et al., 2008). Outro exemplo é a sua utilização em estudos para produção de vacinas em plantas ou para obtenção de plantas resistentes a patógenos. Recentemente, foi demonstrada a expressão de uma proteína componente do vírus HIV em *Nicotiana benthamiana* (LOMBARDI et al., 2009) e de uma proteína do *Bean golden mosaic virus* (BGMV) na obtenção de feijoeiro resistente a esse vírus (FARIA et al., 2006).

O termo *Western blot* é uma alusão às técnicas de *Southern* e *Northern blot* (capítulos 12 e 14, respectivamente), nas quais a análise dos ácidos nucleicos, de forma semelhante, é feita em uma membrana após a separação

de fragmentos de DNA ou RNA por eletroforese em gel de agarose. Embora o termo tenha sido proposto por Burnette (1981), o princípio da técnica já havia sido estabelecido an-

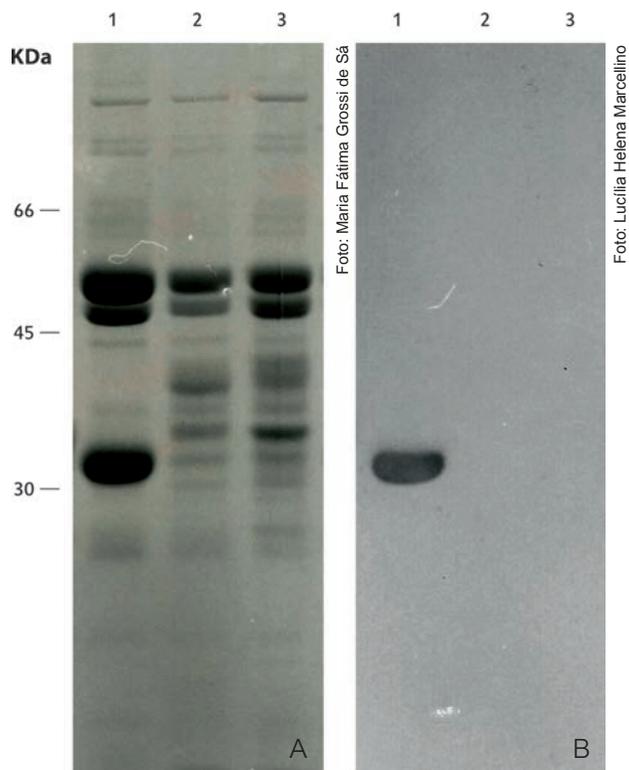


Figura 1. Detecção da proteína arcelina em acesso de *Phaseolus vulgaris* selvagem, pela técnica de *Western blot*. A) Análise em SDS/PAGE 13% de proteína total de sementes de feijoeiro: linha 1 – extrato proteico de sementes do acesso selvagem de *P. vulgaris*; linhas 2 e 3 – extrato proteico de sementes de variedades domesticadas. B) *Western blot* de um gel idêntico ao apresentado em A, utilizando antiarcelina como anticorpo primário. A arcelina é detectada no acesso selvagem, mas não nas variedades domesticadas.

teriormente. Inicialmente, as proteínas eram detectadas diretamente sobre o gel de poliacrilamida (BURRIDGE, 1976; SHOWE et al., 1976); posteriormente foram estabelecidas as condições de transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979).

A técnica de *Western blot* envolve seis etapas principais, esquematizadas na Figura 2.

Obtenção de extratos proteicos

Obtém-se um extrato proteico de células ou tecidos. No caso de plantas, o material (folha, raiz, semente, etc.) que se deseja analisar é, normalmente, congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, macerado. As proteínas são, então, solubilizadas em tampão adequado.

Separação dos polipeptídeos por eletroforese em géis de poliacrilamida

O extrato proteico é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, geralmente em condições desnaturantes, na presença de SDS. Nesse caso, as proteínas migram através da matriz do gel, de acordo com o seu peso molecular, e em direção ao polo positivo (ânodo).

Transferência dos polipeptídeos separados em gel de poliacrilamida para uma membrana

A transferência pode ser feita colocando a membrana de nitrocelulose ou náilon em contato com o gel e submetendo todo o conjunto a um campo elétrico. Dessa

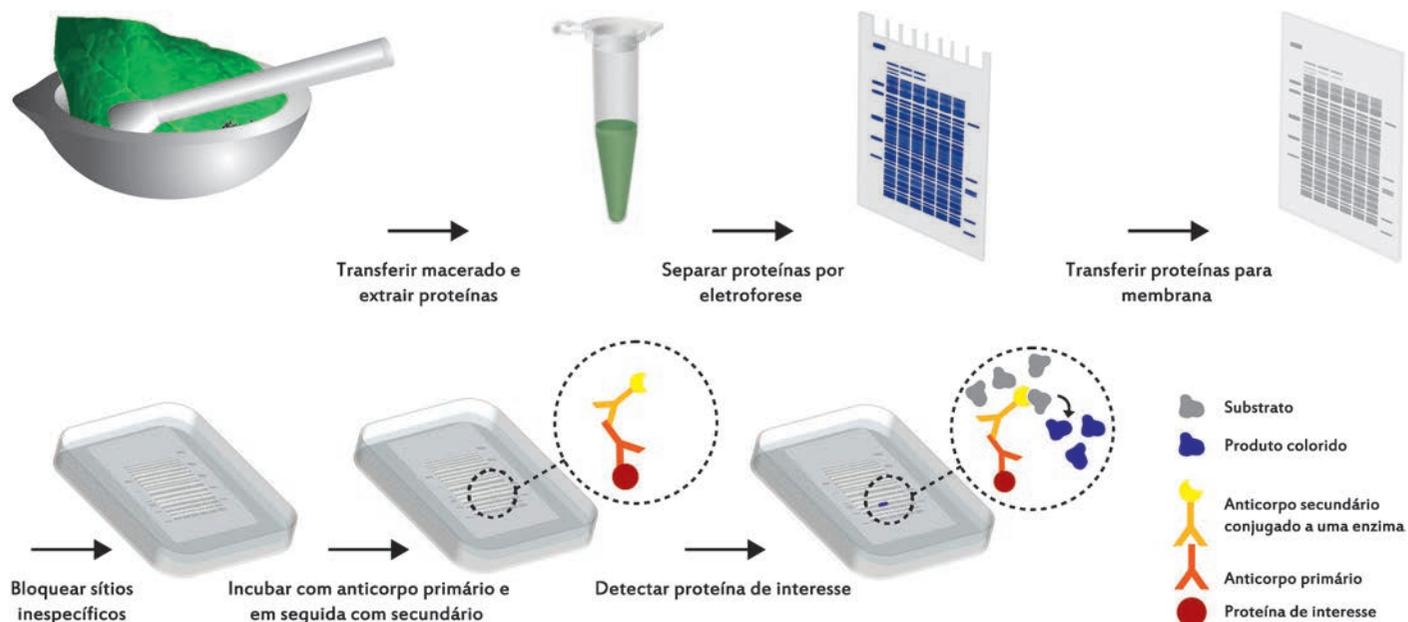


Figura 2. Esquema da técnica de *Western blot*. A técnica envolve seis etapas: obtenção de extratos proteicos; eletroforese em gel de poliacrilamida; transferência para uma membrana; bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação; incubação com anticorpos; detecção do complexo antígeno-anticorpo.

Fonte: adaptado de Marcellino e Grossi de Sá (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi

forma, as proteínas migram do gel para a membrana, guardando as mesmas posições relativas que se encontravam no gel. Por suas propriedades químicas, essas membranas são capazes de ligar-se inespecificamente às proteínas, retendo-as em sua matriz. Embora existam variações de método de transferência, o mais utilizado envolve a eletrotransferência (BURNETTE, 1981; TOWBIN et al., 1979).

Bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos na membrana

Os locais da membrana não ocupados pelas proteínas transferidas do gel estão livres para a ligação com qualquer tipo de proteína. Assim, para evitar que esses locais interajam inespecificamente com o anticorpo durante as incubações posteriores, eles devem ser blo-

queados com uma solução contendo alta concentração de proteína, geralmente BSA 3% (albumina de soro bovino) ou gelatina 3% ou, ainda, leite em pó desnatado na concentração de 5%.

Incubação com anticorpo

Após o bloqueio dos sítios inespecíficos, a localização da proteína de interesse normalmente é feita pelo anticorpo específico contra essa proteína (anticorpo primário), seguido pelo anticorpo secundário (contra o anticorpo primário) acoplado a um marcador, que pode ser uma enzima (por exemplo, fosfatase alcalina, peroxidase) ou um radioisótopo (por exemplo, ^{125}I), etc. Pode-se utilizar também detecção direta, na qual o marcador é acoplado ao anticorpo primário.

Detecção do complexo antígeno-anticorpo

Esse complexo é visualizado por meio colorimétrico, ou radiográfico, dependendo do tipo de marcador utilizado. Se o anticorpo estiver acoplado a uma das enzimas, utiliza-se um substrato que produz um produto insolúvel colorido (HARLOW; LANE, 1988). No caso de estar acoplado a um radioisótopo, a detecção é feita por autorradiografia. Existe também a detecção luminescente. Nesse caso, o anticorpo secundário é acoplado à peroxidase e utiliza-se, para a revelação, um substrato que emite luz ao ser oxidado pela enzima. Essa luz pode ser então detectada na autorradiografia. O limite de detecção depende de vários fatores, entre eles, o tipo de membrana e o sistema de detecção utilizados. Na maioria

dos casos, esse limite corresponde a cerca de 20 femtomoles (10^{-15} moles); isso significa que, para uma proteína de 50 kDa, é possível detectar 1 ng.

Neste capítulo, é apresentado um protocolo bem estabelecido para a análise de proteínas por *Western blot*. Entretanto, inúmeras variações desse protocolo básico são possíveis, dependendo, entre outros fatores, das características da proteína de interesse ou mesmo da planta a ser analisada. Serão descritas a extração de proteínas de sementes e folhas (utilizando, como modelo, a planta de fumo, *Nicotiana tabacum*), a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE), e a transferência e a imunodeteção de proteínas em membrana.

2 Extração e quantificação de proteínas

2.1 Material

- Albumina de soro bovino (BSA) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Almofariz e pilão.
- Corante para quantificação proteica.

No procedimento aqui descrito, utiliza-se corante comercial, baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976).

- Espectrofotômetro para medir absorvância a 595 nm.
- Microcentrífuga.

- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Nitrogênio líquido.
- Tampão de extração I (sementes):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 7,5	0,5 mL	50 mM
NaCl 5 M	60 µL	30 mM
β-mercaptoetanol	100 µL	1%
Surfactante octil fenol etoxilado-100 10%	100 µL	0,1%
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

Filtrar utilizando filtro de 0,45 µm; estocar a -20 °C.

A esse tampão, podem-se adicionar, no momento da utilização, inibidores de protease: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2 mM e leupeptina 0,13 mg/mL, concentração final.



β-mercaptoetanol é volátil e altamente tóxico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão de extração II (folhas):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	0,5 mL	50 mM
β-mercaptoetanol	100 µL	1%
Polivinilpirrolidona (PVP)	20 mg	0,2%
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

Ver a nota descrita para o tampão I.

- Tris-HCl 1 M, pH 6,8 (Apêndice 4).
- Tris-HCl 1 M, pH 7,5 (Apêndice 4).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

2.2 Procedimento

Extração de proteínas

1. Pesar 200 mg de sementes ou folhas e triturar em um almofariz na presença de nitrogênio líquido.
2. Colocar o macerado em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionar 0,5 mL de tampão de extração I (no caso de sementes) ou tampão II (no caso de folhas). Incubar durante 1 hora, sob forte agitação, a 4 °C.
3. Centrifugar em microcentrífuga a 10.000 rpm durante 30 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
4. Determinar a concentração de proteínas no sobrenadante como descrito a seguir.

Determinação da concentração proteica

A determinação da concentração proteica aqui descrita é feita pelo ensaio colorimétrico baseado no método desenvolvido por Bradford (1976). Este protocolo descreve um microensaio (1 µg a 10 µg de proteína/mL) e se inicia com o estabelecimento de uma curva padrão.

1. Para o estabelecimento da curva padrão, numerar nove tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Preparar oito dilui-

ções a partir de uma solução de BSA 25 µg/mL, como indicado:

Tubo	BSA 25 µg/mL	H ₂ O	µg de BSA
1	0 µL	800 µL	0,0 µg
2	50 µL	750 µL	1,25 µg
3	100 µL	700 µL	2,50 µg
4	150 µL	650 µL	3,75 µg
5	200 µL	600 µL	5,00 µg
6	250 µL	550 µL	6,25 µg
7	300 µL	500 µL	7,50 µg
8	350 µL	450 µL	8,75 µg
9	400 µL	400 µL	10,0 µg

2. Adicionar 200 µL do corante citado anteriormente para quantificação proteica.
3. Agitar manualmente, evitando a formação de bolhas.
4. Após 10 minutos, medir a absorvância A_{595} a 595 nm das nove diluições. Não exceder o tempo de 60 minutos para iniciar a medida.
5. Colocar em um gráfico os valores de A_{595} em relação a microgramas de BSA. Esta será a curva padrão.

Determinação da concentração proteica nos extratos

6. Colocar um volume de extrato em um tubo de ensaio. Geralmente utilizam-se de 5 µL a 10 µL.
7. Completar o volume com água até 800 µL.

8. Adicionar 200 µL do corante. Agitar cuidadosamente, evitando a formação de bolhas. Observar se a cor obtida está dentro da curva padrão. Caso não esteja, repetir a partir da etapa 6, aumentando ou diminuindo a quantidade de extrato conforme for necessário.
9. Após 10 minutos, medir a absorvância a 595 nm (A_{595}). Determinar a concentração da amostra, comparando a absorvância obtida com a curva padrão.

2.3 Observações

Muitos tampões podem ser usados para extração de proteínas e análise em gel de poliacrilamida. A escolha do tampão mais apropriado depende do tipo de proteína ou tecido que se pretende analisar.

Na determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, o corante é uma solução contendo azul de Coomassie G-250 0,01% (p/v), etanol 4,7% (v/v) e ácido fosfórico 8,5% (p/v). O princípio da técnica é que, em uma solução ácida, o azul de Coomassie muda o seu máximo de absorvância de 365 nm para 595 nm quando ocorre ligação a proteínas (BRADFORD, 1976).

A presença de detergentes pode interferir na quantificação das proteínas. Dessa forma, deve-se observar a composição do tampão no qual a amostra está dissolvida e usar os controles adequados.

3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

3.1 Material

- Isobutanol saturado com água: misturar um volume de isobutanol com dois volumes de água destilada. Esperar a formação de duas fases.
- Persulfato de amônio 10% (p/v): dissolver 100 mg de persulfato de amônio em 1 mL de água destilada e estocar a 4 °C. A solução é estável por uma semana.
- Solução acrilamida/bisacrilamida: dissolver 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida em 100 mL de água destilada. Filtrar utilizando filtro 0,45 µm. Estocar a 4 °C em recipiente escuro. A solução é estável por 1 mês.



Acrilamida e bisacrilamida são tóxicos e potentes neurotóxicos de efeito cumulativo e podem ser absorvidos pela pele e são. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão. O material polimerizado não possui efeito tóxico, no entanto, o uso de luvas não deve ser dispensado, pois existem resíduos de acrilamida não polimerizada nesse material. Recomenda-se também não submeter soluções de acrilamida/bisacrilamida a forte agitação para evitar efeito aerossol e respingos.

A acrilamida, com o tempo, vai se transformando em ácido acrílico que pode causar distorções no gel; por essa razão, não é recomendável o estoque prolongado dessa solução.

- SDS 20% (p/v) (Apêndice 4).
- Solução para coloração do gel:

Componente	Quantidade	Concentração final
Azul de Coomassie R-250	2,5 g	0,25%
Metanol	450 mL	45%
Ácido acético	100 mL	10%
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Dissolver o azul de Coomassie no metanol, filtrar em papel filtro de celulose de 11 µm, adicionar o ácido acético. Completar o volume com água destilada.

- Solução para descoloração:

Componente	Quantidade	Concentração final
Metanol	450 mL	45%
Ácido acético glacial	100 mL	10%
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

- Tampão de corrida 5X:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris base	15,1 g	125 mM
Glicina	72 g	960 mM
SDS	5 g	0,5%
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Estocar à temperatura ambiente. O pH deverá ser de aproximadamente 8,3.

- Tampão de amostra 2X:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL	125 mM
SDS 20%	2,0 mL	4%
β -mercaptoetanol	1,0 mL	10%
Glicerol	2,0 mL	20%
Azul de bromofenol	4 mg	0,04%
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

- TEMED (N', N', N', N', tetrametiletilenodiamina).
- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8: dissolver 18,16 g de Tris base em 80 mL de água. Ajustar o pH para 8,8. Completar o volume com água até 100 mL. Filtrar utilizando filtro 0,45 μ m e estocar a 4 °C.
- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (Apêndice 4). Filtrar utilizando filtro 0,45 μ m e estocar a 4 °C.

3.2 Procedimento

O sistema de eletroforese aqui descrito foi baseado no sistema descrito por Laemmli em 1970 (LAEMMLI, 1970), sendo um dos mais utilizados para a análise de proteínas por eletroforese. É composto pelos chamados gel concentrador e gel separador. O primeiro possui pH 6,8 e, geralmente, tem uma concentração de poliacrilamida que varia de 3,5% a 5%. O separador possui pH 8,8, é mais concentrado que o primeiro e nele ocorre a separação

das proteínas após a eletroforese. O gel é preparado entre duas placas de vidro cuidadosamente limpas. Será descrita a seguir a preparação de um gel utilizando placas de 160 mm x 140 mm e espaçadores de 0,75 mm.

Preparação do gel separador

1. Preparar a seguinte solução de acordo com a concentração de poliacrilamida desejada:

Componente	Concentração de poliacrilamida			
	8%	10%	12%	15%
H ₂ O	7,0 mL	6,0 mL	5,0 mL	3,5 mL
Acrilamida/ bisacrilamida	4,0 mL	5,0 mL	6,0 mL	7,5 mL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL
SDS 10%	150 μ L	150 μ L	150 μ L	150 μ L
Persulfato de amônio 10%	75 μ L	75 μ L	75 μ L	75 μ L
TEMED	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L

Misturar rapidamente, evitando a formação de bolhas (a polimerização se iniciará assim que o TEMED for adicionado).

2. Verter a solução entre as placas de vidro, previamente montadas conforme indicação do fabricante, deixando um espaço suficiente para a montagem do gel concentrador (cerca de 4 cm).
3. Antes da polimerização, verter isobutanol saturado com água (volume suficiente para cobrir a superfície do gel). Aguardar por 30 minutos, retirar o álcool,

lavar com água destilada, retirando o excesso com papel de filtro.

O isobutanol impede a oxigenação da solução (o oxigênio dificulta o processo de polimerização), além de uniformizar a superfície do gel.

Preparação do gel concentrador (5%)

4. Preparar 5 mL da seguinte solução:

Componente	Quantidade
H ₂ O	2,8 mL
Acrilamida/bisacrilamida	830 µL
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	1,26 mL
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amônio 10%	50 µL
TEMED	5 µL

Misturar rapidamente, evitando a formação de bolhas (a polimerização se inicia assim que o TEMED for adicionado).

5. Verter a solução sobre o gel separador, preparado anteriormente, e inserir o pente. Aguardar a polimerização. Retirar o pente, lavar os poços com água destilada para eliminar vestígios de acrilamida.

A polimerização é visível entre 15 e 20 minutos, mas ela continua ocorrendo por mais tempo. É aconselhável aguardar por 90 minutos para a utilização do gel.

6. Montar o gel na cuba de eletroforese. Adicionar tampão de corrida 1X nos reservatórios superior e inferior, evitando a formação de bolhas. Neste ponto, o gel está pronto para receber as amostras.

Não deve ser realizada pré-corrída, pois esse procedimento eliminaria a descontinuidade do gel, estabelecida pelos géis concentrador e separador.

Aplicação das amostras no gel e eletroforese

7. Para cada volume de extrato proteico, adicionar um volume de tampão de amostra 2X.

A quantidade de proteína (extrato total) a ser aplicada deve ser entre 50 µg e 150 µg por poço. Quantidades superiores a 150 µg podem causar distorções no perfil proteico.

Além dos extratos proteicos das plantas a serem analisados, deve-se incluir um controle positivo (20 ng da proteína de interesse) e um negativo (por exemplo, extrato proteico da planta não transgênica).

8. Aquecer as amostras por 3 a 5 minutos, a 100 °C. Aplicar no gel.

Considerando a sensibilidade da técnica de *Western blot*, deve-se evitar qualquer extravasamento de amostra de um poço para o outro. Os poços que não foram ocupados com amostras devem ser preenchidos com tampão de amostra 1X. Isso permite que a migração seja mais uniforme.

9. Proceder à eletroforese. Iniciar com cerca de 10 mA, corrente constante (até que o azul de bromofenol alcance o gel separador). Em seguida, aumentar para 15 mA a 30 mA, até que o azul de bromofenol atinja o final do gel separador (aproximadamente 4 horas).

10. Desmontar o aparato, retirar o gel concentrador e proceder à transferência das proteínas para a membrana.

A próxima etapa se destina à coloração do gel com azul de Coomassie para avaliação do perfil proteico do extrato em PAGE.

Caso pretenda-se dar prosseguimento ao *Western blot*, o gel não deve ser corado. Proceder diretamente à transferência das proteínas para a membrana.

11. Imergir o gel em solução para coloração, incubar durante a noite, à temperatura ambiente. Em seguida, imergir o gel em solução para descoloração e incubar sob leve agitação, trocando a solução quando necessário.

A solução utilizada para coloração pode ser reaproveitada.

4 Transferência para a membrana

4.1 Material

- Membrana de nitrocelulose ou náilon.
- Papel de filtro de celulose de 11 μm .
- Solução vermelho-Ponceau 2% (opcional): dissolver 2 g de vermelho-Ponceau S em 100 mL de uma solução contendo ácido tricloroacético 30% (v/v) e ácido sulfosalicílico 30% (v/v).

Essa solução também está disponível comercialmente.



Ácido tricloroacético é irritante para as vias respiratórias, causa queimaduras na pele e lesões oculares. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Tampão de transferência (Tris/Glicina/metanol 20%): dissolver 20 mL de metanol em 60 mL de água e adicionar em 20 mL de tampão Tris/Glicina 5X.

O metanol deve ser dispensado quando se usa a membrana do tipo *zeta-probe*. Para proteínas de alto peso molecular, pode-se reduzir o metanol para 10% no tampão de transferência.

- Tampão fosfato salina – PBS 10X (Apêndice 4).
- Tampão Tris/Glicina 5X:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris base	15,15 g	125 mM
Glicina	72 g	960 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

O pH deverá ser de aproximadamente 8,3.

Para a transferência de proteínas de alto peso molecular, pode-se adicionar SDS até uma concentração final de 0,05%. Entretanto, deve-se atentar à possibilidade de o SDS reduzir a eficiência de ligação à membrana.

4.2 Procedimento

Embora o uso de um campo elétrico para a transferência de polipeptídeos de géis para a membrana seja o mais utilizado, outros métodos foram relatados. A difusão (BOWEN et al., 1980; RENART et al., 1979) e a eluição a vácuo (PEFEROEN et al., 1982) são exemplos que podem ser citados. Entretanto, o método de eletrotransferência é o mais eficaz. A eletrotransferência pode ser semisseca

ou molhada. Na primeira, o gel é colocado em contato com a membrana. Esse conjunto gel/membrana é colocado entre papéis de filtro embebidos com o tampão de transferência, e todo o conjunto é, então, submetido a um campo elétrico. Na segunda, o conjunto gel/membrana é submerso em tampão e também submetido a um campo elétrico. Os dois sistemas dão excelentes resultados. A vantagem do sistema semissecos, em relação ao molhado, é ser mais rápido e econômico.

Serão descritos a seguir dois métodos para a transferência:

Transferência semiseca

1. Equilibrar o gel no tampão de transferência por 15 minutos.

Esta etapa facilita a remoção de sais e detergentes provenientes da eletroforese. Para proteínas de peso molecular menor do que 10 kDa, recomenda-se que o tempo da incubação seja menor que 10 minutos.

2. Cortar a membrana nas dimensões do gel. Imergir lentamente a membrana em tampão de transferência e incubar por 15 a 30 minutos.

Esta etapa permitirá que a membrana fique uniformemente umedecida, evitando a formação de bolhas que podem prejudicar a retenção dos polipeptídeos.

A presença de óleos na membrana também prejudica a retenção dos polipeptídeos; por isso, devem-se usar luvas ou pinças para manipulá-la.

3. Cortar quatro pedaços de papel de filtro nas dimensões do gel. Umedecê-los em tampão de transferência.

As etapas a seguir referem-se à montagem da unidade de transferência, esquematizada na Figura 3.

4. Remover a tampa de segurança e o catodo (polo negativo; unidade imediatamente inferior à tampa).
5. Colocar sobre o anodo (polo positivo) dois pedaços de papel de filtro umedecidos em tampão de transferência (etapa 3 deste item), evitando a formação de bolhas.

As eventuais bolhas podem ser retiradas rolando-se um tubo de ensaio ou uma pipeta Pasteur sobre os papéis.

6. Sobrepor a membrana completamente umedecida (etapa 2 deste item). Novamente retirar as bolhas de ar.
7. Sobrepor o gel a ser transferido, previamente equilibrado (etapa 1 deste item). Nenhuma parte do gel deve ultrapassar as dimensões da membrana.
8. Sobrepor dois pedaços de papel de filtro umedecidos em tampão de transferência (etapa 3 deste item). Remover as bolhas de ar.
9. Repor o catodo cuidadosamente para não interferir no conjunto acima montado.
10. Transferir, por 30 minutos a 1 hora, entre 15 V e 25 V (no caso de minigéis, transferir, por 15 a 30 minutos, entre 10 V e 15 V).
11. Após a transferência, desmontar o aparato. Descartar os papéis de filtro e cortar no canto da membrana,

indicando a posição número 1 do gel. A membrana pode ser corada para o monitoramento da eficiência de transferência ou identificação do marcador de peso molecular (MPM). Essa coloração não é permanente e pode ser feita com vermelho-Ponceau S.

Proteínas de peso molecular menor qdo que 10 kDa ligam-se com menor eficiência às membranas. Pode-se aumentar a fixação destas à membrana de náilon por tratamento com glutaraldeído, conforme descrito por Karey e Sirbasku (1989):

1. Imediatamente após a transferência, incubar a membrana em PBS 1X contendo glutaraldeído 0,5% (v/v) por 5 minutos.
2. Transferir a membrana para uma nova solução de PBS 1X/glutaraldeído e incubar por mais 10 minutos.
3. Transferir a membrana para uma solução de PBS 1X contendo glicina 50 mM.
4. Transferir a membrana para a solução de bloqueio e seguir as etapas subsequentes de bloqueio e detecção.

12. O gel transferido poderá ser corado com azul de Coomassie, para verificar a eficiência de transferência.

Transferência molhada

1. Cortar a membrana (de nitrocelulose ou náilon) e quatro folhas de papel de filtro nas dimensões do gel a ser transferido.
2. Imergir lentamente a membrana em tampão de transferência e incubar durante 5 minutos.
3. Montar o aparato de transferência na seguinte ordem: um suporte plástico, uma esponja, duas folhas de papel de filtro umedecidas em tampão de transferência, o gel e a membrana (retirar as bolhas entre o gel e a

membrana). Sobre a membrana, colocar duas folhas de papel de filtro também umedecidas em tampão de transferência, uma esponja e um suporte em plástico (Figura 3). Prender todo o conjunto com ligas de borracha.

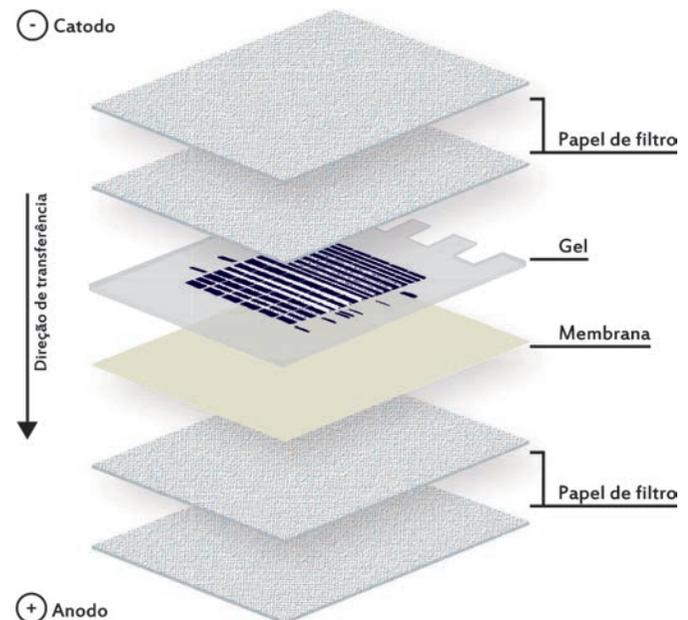


Figura 3. Transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana. O gel e a membrana são colocados em contato e dispostos entre papéis de filtro embebidos em tampão de transferência, conforme a ordem apresentada. Todo o conjunto é submetido a um campo elétrico, e as proteínas migram em direção ao polo positivo (anodo), ficando retidas na membrana.

Fonte: adaptado de Marcellino e Grossi de Sá (1998).

Ilustração: Laura de Alencar Dusi.

Nesta etapa, deve-se atentar para que todos os componentes do conjunto estejam completamente embebidos no tampão. As espumas, bem como cada camada do conjunto, não devem conter bolhas. Recomenda-se montá-lo em uma vasilha contendo o tampão de transferência.

- Colocar dentro da cuba de eletroforese, com a membrana voltada para o eletrodo positivo (ânodo). Transferir a 30 V durante aproximadamente 16 horas, ou 100 V por 1 hora. Para evitar aquecimento, colocar a cuba de transferência dentro de um recipiente com gelo.
- Após transferência, desmontar o aparato. Descartar os papéis de filtro e cortar o canto da membrana para indicar a posição do primeiro poço do gel. Proceder como nas etapas 11 e 12 do protocolo de transferência a semisseca.

Coloração da membrana com vermelho-Ponceau S (opcional)

Esta é uma coloração não permanente das proteínas na membrana. Ela permite verificar se a transferência das proteínas foi efetiva e se estas estão em quantidades equivalentes nos diferentes poços, além de identificar o marcador de peso molecular.

Essa coloração não deve ser realizada quando se usa membrana de náilon.

- Lavar a membrana uma vez com vermelho-Ponceau S 0,2% (diluir a solução estoque em água).
- Trocar uma vez a solução de vermelho-Ponceau 0,2% e incubar à temperatura ambiente, sob leve agitação.

- Transferir a membrana para tampão PBS 1X e incubar por 1 a 10 minutos com agitação, até que as proteínas sejam evidenciadas.
- Identificar o marcador de peso molecular (MPM) e marcar as bandas a lápis.

MPM previamente corados estão disponíveis no mercado. A vantagem destes é que podem ser identificados na membrana sem a necessidade de coloração com vermelho-Ponceau.

- Descorar, lavando com tampão PBS 1X.

4.3 Observação

As membranas de nitrocelulose são comercialmente disponíveis, com tamanho de poro variando de 0,1 μm a 0,45 μm . Embora a eficiência de transferência dependa de um grande número de fatores, como peso molecular das proteínas, tempo de transferência, corrente, entre outros, o uso de nitrocelulose com poro de 0,45 μm permite a retenção de polipeptídeos de uma ampla faixa de peso molecular. Para proteínas de baixo peso molecular (menores que 20 kDa), pode-se considerar a utilização de uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,2 μm , ou uma membrana de náilon carregada positivamente, conhecida como *zeta-probe*. Essa membrana tem um maior poder de retenção de polipeptídeos, aumentando as possibilidades de detecção de proteínas de baixo peso molecular. Outra opção é a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), que possui maior resistência

química e mecânica, além de uma capacidade superior de retenção de polipeptídeos (100 µg/cm² a 200 µg/cm²).

5 Bloqueio, incubação com anticorpo e detecção

5.1 Material

- Anticorpo primário: anticorpo contra a proteína que se pretende analisar. Normalmente o anticorpo é feito em coelho ou camundongo.
- MgCl₂ 1M (Apêndice 4).
- NaCl 5 M (Apêndice 4).
- Solução de bloqueio; pode-se optar por uma das seguintes: a) albumina de soro bovino (BSA) 3% (p/v) em PBS 1X; b) leite em pó desnatado 5% (p/v) em PBS 1X, ou c) gelatina 3% (p/v) em PBS 1X.

Se o sistema de detecção for com fosfatase alcalina substituir o PBS por TBS.

- Solução de incubação do anticorpo; pode-se optar por uma das seguintes: a) albumina de soro bovino (BSA) 1% (p/v) em PBS 1X; b) leite em pó desnatado 1% (p/v) em PBS 1X, ou c) gelatina 1% (p/v) em PBS 1X.

Se o sistema de detecção for com fosfatase alcalina, substituir o PBS por TBS.

- Tampão fosfato salina – PBS 10X (Apêndice 4).

Se o sistema de detecção for com fosfatase alcalina, usar o tampão Tris-Salina (TBS) (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM).

- Tris-HCl 1 M, pH 7,5 (Apêndice 4).

Soluções para sistema de detecção com peroxidase

- Anticorpo secundário: anti-IgG de camundongo ou coelho, dependendo do anticorpo primário utilizado, conjugado com peroxidase.
- Solução A: 30 mg de 4-cloro-1-naftol em 10 mL metanol gelado (-20 °C). Preparar imediatamente antes da utilização.
- Solução B: 30 µL de água oxigenada (H₂O₂) 30% (v/v) em 50 mL de PBS. Preparar imediatamente antes da utilização.

Soluções para o sistema de detecção com fosfatase alcalina

- Tampão de revelação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1 M, pH 9,5	100 mL	100 mM
NaCl 5 M	20 mL	100 mM
MgCl ₂ 1 M	5 mL	5 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

- Anticorpo secundário: anti-IgG de camundongo ou coelho, dependendo do anticorpo primário utilizado, conjugado com fosfatase alcalina.

- EDTA 20 mM, pH 8,0 em PBS 1X (Apêndice 4).
- Solução NBT (*Nitro blue tetrazolium*): dissolver 50 mg de NBT em 1 mL de dimetilformamida 70% (v/v). Estocar a 4 °C em frasco escuro. Estável por 1 ano.
- Solução BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato): dissolver 25 mg de BCIP em 1 mL de dimetilformamida. Estocar a 4 °C em frasco escuro. Estável por 1 ano.

5.2 Procedimento

Bloqueio de sítios inespecíficos na membrana

1. Lavar a membrana com tampão PBS 1X ou TBS.

Dar preferência ao TBS, se a detecção for com fosfatase alcalina.

2. Incubar a membrana com a solução de bloqueio, durante 2 horas, à temperatura ambiente, ou durante a noite, a 4 °C, com leve agitação.
3. Remover a membrana da solução de bloqueio e lavar brevemente com PBS 1X ou TBS. A membrana está pronta para incubação com o anticorpo.

Incubação com o anticorpo e detecção

4. Incubar a membrana em solução de incubação contendo o anticorpo primário na diluição adequada, durante 4 a 6 horas, à temperatura ambiente ou por aproximadamente 16 horas, a 4 °C. Nesta etapa,

utiliza-se uma vasilha plástica fechada ou saco plástico selado, evitando a presença de bolhas.

Diluição do anticorpo primário: no caso de sobrenadante em cultura, utilizar sem diluição ou diluído 1:10. Para policlonais, fluido ascítico ou anticorpo purificado, a diluição deverá ser determinada pela titulação dos anticorpos.

A seguir, serão descritos dois métodos muito usuais para detecção das proteínas em *Western blot*, utilizando anticorpo conjugado com peroxidase (a) e utilizando anticorpo conjugado com fosfatase alcalina (b):

(a) Anticorpo conjugado com peroxidase

Neste caso, a detecção se dá pela atividade enzimática da peroxidase sobre um substrato cromogênico, por exemplo, 4-cloro-1-naftol. O produto gerado pela ação da enzima é azul-escuro. Essa coloração não é permanente e esvanece com o tempo.

5. Após a incubação com o anticorpo primário, lavar a membrana em PBS 1X, três vezes, por 15 minutos.

*Para diminuir as ligações inespecíficas (*background*), recomenda-se o uso de PBS contendo o surfactante polisorbato 20 a 0,05% (v/v) durante a lavagem.*

6. Transferir a membrana para a solução de incubação contendo o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante. Incubar por 3 a 4 horas, à temperatura ambiente.

7. Lavar três vezes com PBS 1X, por 15 minutos cada vez.

Para diminuir as ligações inespecíficas (*background*), recomenda-se o uso de PBS contendo o surfactante polisorbato 20 a 0,05% (v/v) durante a lavagem.

8. Para a revelação, misturar as soluções A e B (1:1) e adicionar a mistura sobre a membrana. Agitar levemente até que a coloração das bandas seja visível. O tempo médio para o aparecimento da coloração é de aproximadamente 30 minutos.
9. Parar a reação, lavando a membrana em água corrente, por 10 minutos.

Geralmente, tecidos de plantas contêm altos níveis de atividade peroxidase endógena. Para identificar essa atividade, caso ela exista, deve-se adicionar um controle apropriado (material de planta não transformada).

(b) Anticorpo conjugado com fosfatase alcalina

Neste caso, o substrato cromogênico usado é o BCIP associado ao NBT. O produto gerado pela ação da enzima é de cor púrpura. O sistema com fosfatase alcalina é mais sensível que o sistema com peroxidase, e a cor gerada é estável.

5. Após a incubação com o anticorpo primário, lavar a membrana três vezes, por 15 minutos, em TBS.
6. Incubar em solução de incubação contendo o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, na diluição recomendada pelo fabricante (normalmente 1:2.000), durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Nesta etapa, utiliza-se uma vasilha de

plástico fechada ou saco de plástico selado, evitando a presença de bolhas.

A melhor diluição deve ser verificada experimentalmente. Uma diluição entre 1:200 e 1:2.000 normalmente produz resultados satisfatórios.

7. Lavar a membrana quatro vezes em TBS, por 5 minutos, cada vez.

Para diminuir as ligações inespecíficas, recomenda-se o uso de TBS contendo o surfactante polisorbato 20 a 0,05% (v/v) durante a lavagem.

8. Para a revelação, preparar a seguinte solução imediatamente antes do uso: 66 µL de solução NBT em 10 mL de tampão de revelação. Misturar bem e adicionar 33 µL de solução BCIP.
9. Incubar a membrana nessa solução. Agitar suavemente, monitorando o aparecimento da cor. O tempo médio de incubação é de aproximadamente 30 minutos.

Incubação por tempos superiores (por exemplo, durante a noite) pode ser utilizada para intensificar o sinal desejado. Entretanto, deve-se atentar para o aumento de sinais inespecíficos.

10. Retirar a solução de revelação e adicionar EDTA 20 mM em PBS 1X, para parar a reação.

O EDTA é um quelante de íons de Mg⁺² essenciais para a atividade da fosfatase alcalina.

6 Referências

BOWEN, B.; STEINBERG, J.; LAEMMLI, U. K.; WEINTRAUB, H. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 8, n. 1, p. 1-20, 1980.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BURNETTE, W. N. "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

BURRIDGE, K. Changes in cellular glycoproteins after transformation: identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 73, n. 12, p. 4457-4461, 1976.

DUBIN, M.; BOWLER, C.; BENVENUTO, G. A modified gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants. **Plant Methods**, London, v. 4, n. 1, p. 3, 2008.

FARIA, J. C.; ALBINO, M. M. C.; DIAS, B. B. A.; CANCADO, L. J.; CUNHA, N. B. da; SILVA, L. D.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. Partial resistance to Bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene. **Plant Science**, Shannon, v. 171, n. 5, p. 565-571, 2006.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: CSHL Press, 1988. 726 p.

KAREY, K. P.; SIRBASKU, D. A. Glutaraldehyde fixation increases retention of low-molecular weight proteins (growth-factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 178, n. 2, p. 255-259, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LOMBARDI, R.; CIRCELLI, P.; VILLANI, M.; BURIANI, G.; NARDI, L.; COPPOLA, V.; BIANCO, L.; BENVENUTO, E.; DONINI, M.; MARUSIC, C. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. **BMC Biotechnology**, London, v. 9, n. 1, p. 96, 2009.

MARCELLINO, L. H.; GROSSI DE SÁ, M. F. Detecção e análise de proteínas pela técnica *Western blot*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CENARGEN, 1998. p. 251-267.

NARAYANAN, N. N.; IHEMERE, U.; ELLERY, C.; SAYRE, R. T. Overexpression of hydroxynitrile lyase in cassava roots elevates protein and free amino acids while reducing residual cyanogen levels. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. e21996, 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html>>. Acesso em: 28 jun. 2012.

PEFEROEN, M.; HUYBRECHTS, R.; DE LOOF, A. Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 145, n. 2, p. 369-372, 1982.

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 76, n. 7, p. 3116-3120, 1979.

SHOWE, M. K.; ISOBE, E.; ONORATO, L. Bacteriophage T4 prehead proteinase: II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 107, n. 1, p. 55-69, 1976.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

Capítulo 20

Análise proteômica por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa

Angela Mehta
Thales Lima Rocha
Maria Fátima Grossi de Sá

1 Introdução

A proteômica é definida como a análise da expressão de proteínas em larga escala em uma célula, organismo ou fluido biológico. O estudo do proteoma representa um grande desafio, uma vez que a expressão gênica de uma célula é muito dinâmica e dependente do estágio de desenvolvimento, da presença de ativadores e inibidores e de condições ambientais. Entretanto, a análise proteômica constitui uma importante abordagem para a compreensão de como os genes funcionam, pois representa a análise do produto final da expressão gênica, que é a proteína. O estudo do proteoma pode levar a importantes resultados, com implicações diretas em várias áreas da biologia e biotecnologia, como a descoberta de vias metabólicas, e identificação de novas moléculas bioativas e de marcadores para uma determinada condição biológica.

A análise proteômica por meio de eletroforese bidimensional (2-DE) é bastante complexa e envolve várias etapas, incluindo a extração, quantificação e separação das proteínas por pI (ponto isoelétrico) e massa molecular. Posteriormente, é realizada a digestão in gel das proteínas selecionadas para identificação por espectrometria de massa (MS). Atualmente, vários avanços nas técnicas de MS e métodos computacionais têm sido descritos, visando a uma maior identificação de proteínas. Esses avanços têm levado a uma utilização crescente de técnicas independentes de gel, como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). A Tabela 1, baseada em Garbis et al. (2005), apresenta algumas vantagens e

limitações da técnica de 2-DE. Apesar dessas limitações, 2-DE constitui, ainda, a metodologia mais bem estabelecida e amplamente utilizada em análises proteômicas, permitindo o estudo de misturas complexas de proteínas e a criação de bancos de dados de proteínas identificadas de uma grande variedade de espécies e tecidos.

A técnica de 2-DE envolve a migração diferencial de proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (primeira dimensão) e, posteriormente, pelas suas massas moleculares (segunda dimensão). Após a eletroforese, as proteínas são coradas com nitrato de prata (BLUM et al.,

Tabela 1. Vantagens e limitações da eletroforese bidimensional de proteínas.

Vantagens	Limitações
Método mais bem estabelecido até o momento para análise global de proteínas	Necessidade de grande quantidade de proteínas (400 µg/gel a 600 µg/gel)
Visualização de centenas de proteínas em um gel	Dificuldade de solubilização de proteínas hidrofóbicas
Capacidade de detecção de modificações pós-traducionais	Limitações na detecção de proteínas pouco abundantes
Permite análise qualitativa e quantitativa	Dificuldades na reprodutibilidade em razão de problemas na quantificação de proteínas
Compatibilidade com métodos de identificação por imunossaios e espectrometria de massa	

1987) ou azul de coomassie (*coomassie brilliant blue*, CBB), os quais são os principais métodos de coloração, permitindo a visualização de centenas de proteínas que devem ser validadas estatisticamente por softwares especiais (VALLEDOR; JORRÍN, 2011). O método de coloração das proteínas é crucial para a obtenção de reprodutibilidade e posterior identificação por espectrometria de massa. Para a obtenção de um maior índice de identificação das proteínas, recomenda-se a utilização de CBB e, portanto, somente esse método será descrito neste capítulo.

A qualidade dos reagentes utilizados e os cuidados para evitar contaminações, principalmente com queratina, são também de extrema importância para maximizar o número de proteínas identificadas. A queratina está presente na pele, no cabelo, na saliva e na poeira e possui alta capacidade de ionização. Dessa forma, a presença de queratina na amostra suprime o sinal da proteína que está sendo analisada, impedindo a sua identificação. Portanto, cuidados devem ser tomados em todas as etapas da análise proteômica para evitar contaminações e obter uma maior eficiência na identificação das proteínas.

Este capítulo descreve um método de extração de proteínas, utilizado para diversos tipos de amostra, bem como métodos de 2-DE, coloração de proteínas com CBB e digestão in gel para posterior identificação por espectrometria de massa. Inúmeras variações desses protocolos estão disponíveis e, portanto, as metodologias apresentadas podem ser complementadas e adaptadas para os diferentes tipos de amostra a serem analisados.

2 Extração de proteínas totais

2.1 Material

- Acetato de amônio 0,1 M em metanol (Apêndice 4).
- Acetona 80% (v/v).
- Almofariz e pilão.
- DTT 1 M (Apêndice 4).
- Nitrogênio líquido.
- Solução de fenol equilibrado (pH 7,0 a 8,0).



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Solução de hidratação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Ureia	12 g	8 M
CHAPS	0,5 g	2% (p/v)
Tampão IPG	500 µL	2% (v/v)
Azul de bromofenol	Traços	-
H ₂ O	q.s.p. 25 mL	

Adicionar 90 µL de DTT 100 mM para cada 500 µL de solução de hidratação e utilizar imediatamente.

CHAPS = (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato). O tampão IPG (immobilized pH gradient I) deve estar de acordo com a faixa de pH da tira de IPG.

- Tampão de extração (estocar a 4 °C):

Componente	Quantidade	Concentração final
Sacarose	29,9 g	0,7 M
Tris base	7,57 g	0,5 M
HCl concentrado 37%	310 µL	30 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	2,32 g	50 mM
KCl	0,93 g	0,1 M
H ₂ O	q.s.p. 125 mL	

Apenas no momento da extração, adicionar 0,4 mL de DTT 1 M para cada 10 mL de tampão de extração (concentração final de 40 mM).



Ácido clorídrico é um ácido forte, altamente tóxico e corrosivo. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

2.2 Procedimento

1. Triturar todo o material vegetal em almofariz, com adição sucessiva de pequenos volumes de nitrogênio líquido até que se forme um pó fino.
2. Transferir de 100 mg a 200 mg do tecido macerado para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionar 750 µL de tampão de extração (contendo DTT 40 mM) e deixar à temperatura ambiente por 15 minutos.

Um total de 150 mg de tecido macerado ocupa um volume equivalente a, aproximadamente, 0,3 mL em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

3. Adicionar 750 µL de fenol e deixar sob forte agitação, preso com fita crepe, em agitador do tipo Vortex, por 15 minutos.
4. Centrifugar à velocidade máxima em microcentrífuga, por 3 minutos, recuperar o sobrenadante e transferi-lo para outro tubo de microcentrífuga. Repetir esse procedimento duas vezes.

Ao recuperar o sobrenadante, deve-se recuperar o maior volume possível, evitando contaminação com a interfase, para maximizar o rendimento da extração proteica. Recomenda-se utilizar uma pipeta de 200 µL.

5. Centrifugar à velocidade máxima em microcentrífuga por 3 minutos, recuperar o sobrenadante (aproximadamente 500 µL) e dividir o volume em dois tubos (aproximadamente 250 µL cada um).
6. Adicionar 5 volumes (aproximadamente 1.250 µL) de acetato de amônio 0,1 M em metanol, inverter para misturar e manter a -20 °C por 2 a 16 horas.
7. Centrifugar por 15 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 500 µL de acetato de amônio. Repetir este processo duas vezes.
8. Centrifugar por 15 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 500 µL de acetona 80%.
9. Centrifugar por 10 minutos, descartar o sobrenadante e secar o precipitado a 37 °C por 5 a 10 minutos e armazenar a -20 °C.

Deve-se observar um precipitado branco ao final da última centrifugação.

- Hidratar o precipitado pela adição de 50 μL a 100 μL de tampão de hidratação.
- Quantificar as proteínas pelo método de Bradford (1976), conforme Capítulo 19.

O método de Bradford (1976) é o mais utilizado para a quantificação de proteínas. Recomenda-se fazer várias quantificações para confirmação dos resultados antes da realização da focalização isoeétrica, além de utilizar um gel (minigel) para confirmar a homogeneidade da quantidade de proteínas em cada amostra.

O rendimento médio de proteínas obtido a partir de 100 mg a 200 mg de material vegetal é bastante variável em função do tecido e da espécie em estudo. Recomenda-se realizar duas extrações (dois tubos de microcentrífuga) visando estimar o rendimento médio de proteínas para cada novo material.

2.3 Observação

Existem inúmeros protocolos para extração de proteínas; dessa forma, esse protocolo pode ser complementado ou adaptado de acordo com a amostra a ser analisada. O protocolo descrito foi adaptado do método reportado por De Mot e Vanderleyden (1989).

3 Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

3.1 Material

- Azul de bromofenol.
- Immobiline dry strip cover fluid*.
- Solução de hidratação (item 2.1 Material).
- Tiras de IPG (*immobilized pH gradient*).
- Tiras de papel para eletrodo.

3.2 Procedimento

Para a focalização isoeétrica, existem diferentes sistemas e fabricantes disponíveis no mercado. Neste capítulo, serão descritos os sistemas Multiphor II e IPGPhor 3.

Multiphor II

- Solubilizar 600 μg de amostra de proteína em solução de hidratação e aplicar na bandeja de hidratação (*reswelling tray*), evitando a formação de bolhas de ar.

Volume de solução de hidratação necessário para cada tira IPG:

Tamanho da tira de IPG	Volume total por tira (μL)
7	125
11	200
13	250
18	350

- Deslizar a tira IPG com o lado contendo o gel voltado para baixo na canaleta contendo a solução de proteína (Figura 1).
- Cobrir a tira com *immobiline dry strip cover fluid* ou óleo mineral e deixar por 16 horas.

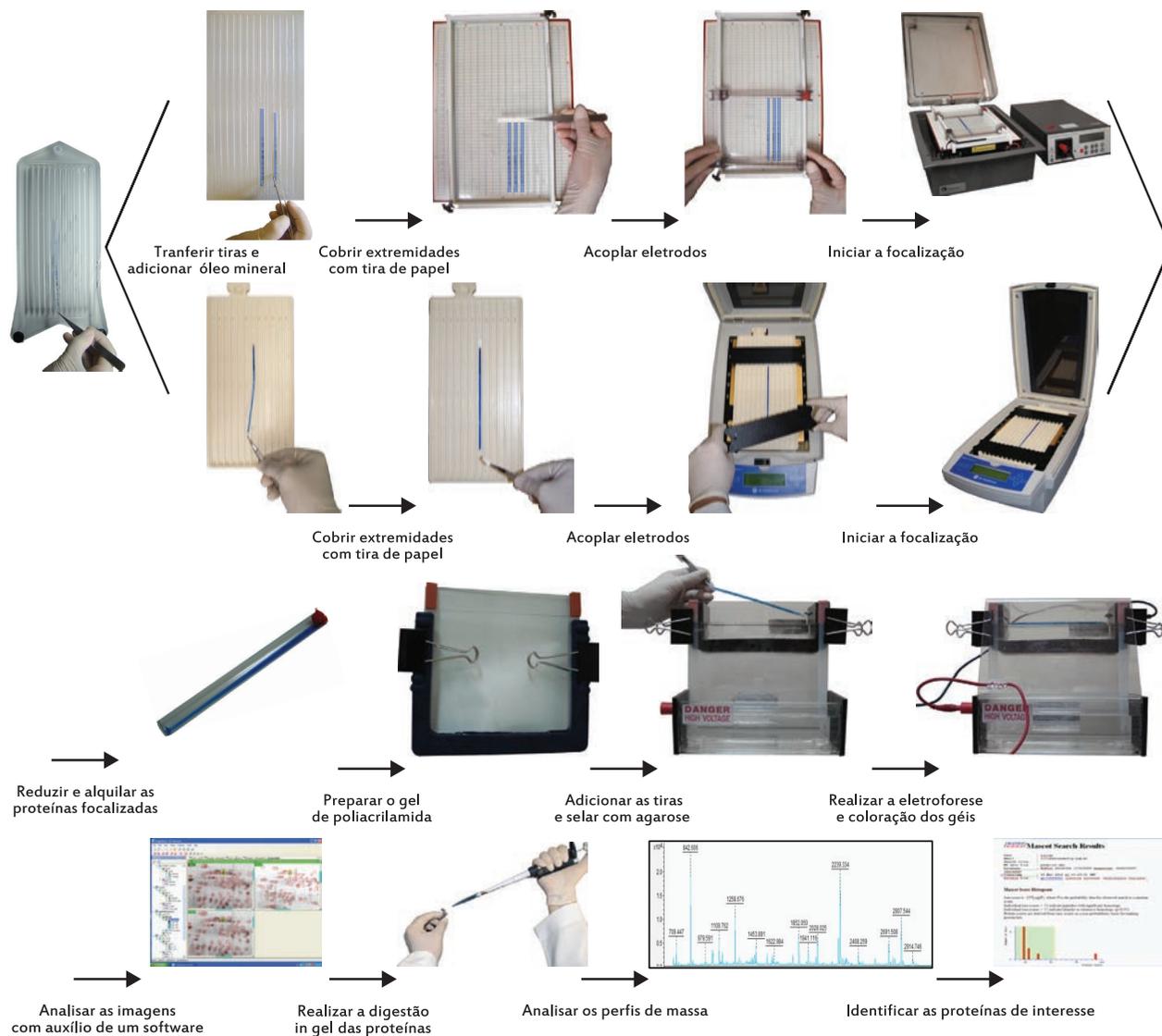


Figura 1. Fluxograma da análise proteômica por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Parte superior da figura: sistema Multiphor II (acima) e sistema IPG-Phor 3 (abaixo).

4. Verificar a homogeneidade da hidratação das tiras e colocá-las com o lado do gel voltado para cima no *aligner*.
5. Preparar a cuba para focalização isoelétrica: colocar 10 mL de *immobiline dry strip cover fluid* sobre a placa de resfriamento e posicionar a bandeja *immobiline dry strip* sobre a placa de resfriamento.

Remover apenas as bolhas grandes entre a bandeja e a placa de resfriamento.

6. Adicionar aproximadamente 15 mL de *immobiline dry strip cover fluid* na bandeja *immobiline dry strip*.
7. Deslizar o *aligner* na bandeja *immobiline dry strip*, evitando bolhas de ar (Figura 1).

Colocar a parte ácida da tira de IPG voltada para o lado negativo (vermelho) da cuba.

8. Cobrir as extremidades das tiras IPG com tiras para eletrodo umedecidas de forma perpendicular às tiras IPG (Figura 1). As tiras para eletrodo deverão tocar as extremidades das tiras IPG.
9. Colocar os eletrodos sobre as tiras para eletrodo e realizar a eletroforese de acordo com o tamanho da tira de IPG e faixa de pH (Tabela 2).
10. Após a eletroforese, armazenar as tiras de IPG a -20 °C até a eletroforese de segunda dimensão.

Ettan IPGphor 3

1. Seguir procedimento de solubilização de amostra e reidratação da tira conforme descrito para o sistema Multiphor II (etapas de 1 a 4 da seção 3.2 Procedimento).
2. Posicionar a placa resfriadora sobre o Ettan IPGphor 3 (Figura 1).
3. Transferir as tiras de IPG do *reswelling tray* para os sulcos da placa resfriadora.

Atentar para o posicionamento das extremidades ácidas e básicas (Figura 1).

4. Acomodar pedaços de tiras para eletrodo previamente umedecidos com água destilada nas extremidades das tiras a fim de proteger o gel do contato direto com o eletrodo (Figura 1).
5. Adicionar em torno de 10 mL de *immobiline dry strip cover fluid* em cada sulco contendo a tira.
6. Acomodar os eletrodos sobre os papéis de filtro em contato com as tiras e acoplá-los a placa de resfriamento (Figura 1).
7. No programa de controle do equipamento, determinar as condições elétricas de acordo com a quantidade e as características dos géis (comprimento, intervalo de pH, linear ou não linear) (Tabela 3).

Tabela 2. Condições para focalização isoeétrica utilizando o sistema Multiphor II.

Tamanho da tira (cm)	Faixa de pH	Fase	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Duração (horas:minutos)
11	4-7 L	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	2	2:20 a 3:30
		Total				3:50 a 5:00
11	3-10 L	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	5	1:45 a 2:35
		Total				3:15 a 4:05
13	4-7 L	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	5	3:45 a 4:20
		Total				5:15 a 5:50
13	3-10 L e 3-10 NL	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	5	3:10 a 4:00
		Total				4:40 a 5:30
18	4-7 L	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	5	5:40 a 7:40
		Total				7:10 a 9:10
18	3-10 L e 3-10 NL	1	300	2	5	0:01
		2	3.500	2	5	1:30
		3	3.500	2	5	4:50 a 6:20
		Total				6:20 a 7:50

Nota: durante a fase 2, a voltagem será aumentada do valor determinado para a fase 1 até 3.500 V. Na fase 3, a voltagem irá permanecer em 3.500 V.

Tabela 3. Condições para focalização isoelétrica utilizando o sistema Ettan IPGPhor 3.

Tamanho da tira (cm)	Faixa de pH	Modo de voltagem	Voltagem (V)	Tempo (h:min)	kVh
11	4–7 L	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3 Gradient	6.000	2:30	8,8
		4 Step and hold	6.000	0:10 a 0:50	0,9–4,9
		Total		4:40 a 5:20	11,0–15,0
11	3–10 L	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3 Gradient	6.000	2:00	7,0
		4 Step and hold	6.000	0:10 a 0:40	0,7–3,7
		Total		4:10 a 4:40	9,0–12,0
13	4–7 L e 3–10 NL	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3 Gradient	8.000	2:30	11,3
		4 Step and hold	8.000	0:25 a 0:55	3,4–7,4
		Total		4:55 a 5:25	16,0–20,0
13	3–10 L	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3 Gradient	8.000	2:30	11,3
		4 Step and hold	8.000	0:10 a 0:30	1,4–4,4
		Total		4:40 a 5:00	14,0–17,0
18	4–7 L e 3–10 NL	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3a Gradient	8.000	3:00	13,5
		4a Step and hold	8.000	1:30 a 2:40	12,2–21,2
		3b Gradient	10.000	3:00	16,5
		4b Step and hold	10.000	0:55 a 1:50	9,2–18,2
		Total			27,0–36,0
18	3–10 L	1 Step and hold	500	1:00	0,5
		2 Gradient	1.000	1:00	0,8
		3a Gradient	8.000	3:00	13,5
		4a Step and hold	8.000	0:46 a 1:30	6,2–12,2
		3b Gradient	10.000	3:00	16,5
		4b Step and hold	10.000	0:20 a 0:55	3,2–9,2
		Total			21,0–27,0

8. Ao final da programação, é recomendável adicionar um passo de espera de, pelo menos, 3 horas a 300 V.

Para uma eletroforese de 12 horas nas tiras de 11 cm e 13 cm, aumentar a fase 1 para 6 horas e diminuir a fase 4 em 3 kVh.

Para uma eletroforese de 12 horas nas tiras de 18 cm, aumentar a fase 1 para até 8 horas e diminuir a fase 4 com a quantidade de kVh adicionada na fase 1 para atingir o valor total de kVh.

4 SDS-PAGE (segunda dimensão)

4.1 Material

- Acrilamida:bisacrilamida 49:1, solução 50% (Apêndice 4).
- Agarose.
- Água bidestilada.
- Cubas para eletroforese vertical.
- DTT.



DTT é considerado irritante para vias respiratórias, pele e olhos. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscaras.

- Espaçadores.

- Gel de acrilamida 12%:

Solução estoque	Volume
Acrilamida:bisacrilamida 50%	10,8 mL
Tris 1 M, pH 8,8	25,8 mL
SDS 10%	0,44 mL
Persulfato de amônio	55 mg em 1 mL de água bidestilada
TEMED	50 µL
Água bidestilada	6,36 mL

Composição para 1 gel de acrilamida 12% de 16 cm x 16 cm, para os sistemas V-16 e V16-2 (Biometra) com espaçador de 0,75 mm.



Acrilamida e bisacrilamida são tóxicos e potentes neurotóxicos de efeito cumulativo e podem ser absorvidos pela pele e são. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão. O material polimerizado não possui efeito tóxico, no entanto, o uso de luvas não deve ser dispensado, pois existem resíduos de acrilamida não polimerizada nesse material. Recomenda-se também não submeter soluções de acrilamida/bisacrilamida a forte agitação para evitar efeito aerossol e respingos.

Adicionar todos os reagentes, exceto o TEMED, e misturar bem por alguns segundos. Quando estiver tudo preparado, adicionar o TEMED, misturar rapidamente e verter nas placas imediatamente. Adicionar 1 mL de n-butanol ou isopropanol sobre o gel para acelerar a polimerização e evitar bolhas.

- Iodoacetamida.
- N-butanol ou isopropanol.
- Papel de filtro.
- Persulfato de amônio.

- Placas de vidro.
- SDS 10% (p/v; Apêndice 4).
- Solução de equilíbrio:

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris HCl 1 M, pH 8,8	10 mL	50 mM
Ureia	72 g	6 M
Glicerol	60 mL	30%
SDS	4 g	2%
Azul de bromofenol	Traços	
H ₂ O	q.s.p. 200 mL	

- Tampão glicina (solução estoque 5X):

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris base	15 g	125 mM
Glicina	72 g	960 mM
SDS	5 g	0,5% (p/v)
H ₂ O	q.s.p. 1.000 mL	

Para obter a solução de trabalho, diluir 300 mL da solução estoque 5X em 1.200 mL de água destilada.

- TEMED.
- Tira de papel.
- Tris HCl 1 M, pH 8,8 (Apêndice 4).

4.2 Procedimento

Os principais passos deste procedimento estão descritos na Figura 1.

1. Limpar as placas de vidro com álcool e montá-las com os espaçadores.
2. Verter a solução de gel de acrilamida 12%, imediatamente após o preparo, entre as placas de vidro, previamente montadas conforme indicação do fabricante, deixando um pequeno espaço para colocar a tira IPG (cerca de 1 cm).
3. Adicionar, imediatamente, 1 mL de n-butanol ou isopropanol na superfície do gel. Aguardar por 10 minutos, retirar o n-butanol ou isopropanol, invertendo as placas, e lavar com água destilada a superfície dos géis, retirando o excesso com papel de filtro.

O isobutanol facilita o processo de polimerização e mantém a superfície do gel homogênea.

4. Após a polimerização do gel de acrilamida, utilizá-lo dentro de poucas horas ou armazenar na geladeira até o dia seguinte.
5. Incubar cada tira com 3 mL de solução de equilíbrio contendo 30 mg de DTT sob agitação suave por 15 minutos.
6. Descartar a solução anterior e adicionar 3 mL de solução de equilíbrio contendo 75 mg de iodoacetamida e manter sob agitação suave por 15 minutos.
7. Preencher o compartimento inferior da cuba com tampão glicina e colocar as placas na cuba. Retirar todas as bolhas formadas na placa.

8. Mergulhar rapidamente as tiras em tampão glicina e acomodar as tiras sobre o gel de acrilamida.

Todas as bolhas de ar formadas entre a tira IPG e o gel de acrilamida devem ser retiradas.

9. Aplicar o marcador de massa molecular em uma tira de papel e colocar sobre o gel em uma das extremidades.
10. Cobrir a tira de IPG e a tira de papel com agarose 1%. Após a polimerização da agarose, preencher os compartimentos superiores com tampão glicina.
11. Iniciar a eletroforese a 90 V por 30 minutos e, posteriormente, aumentar para 130 V por, aproximadamente, 6 horas ou até que a linha de corrida formada pelo azul de bromofenol esteja a 0,5 cm do final do gel.

4.3 Observação

O protocolo apresentado acima é baseado no método descrito por Laemmli (1970). Existem vários modelos de cuba para 2-DE. O método descrito neste capítulo refere-se à eletroforese em gel de 16 cm x 16 cm com espaçador de 0,75 mm de espessura, por exemplo, em sistema V16 e V16-2 da Biometra. Outro sistema disponível, que vem sendo muito utilizado, é a unidade de eletroforese *Ettan DALT six* (Figura 1). Esse sistema permite a eletroforese de seis géis ao mesmo tempo.

5 Coloração com azul de Coomassie (CBB) coloidal

5.1 Material

- Ácido acético glacial.



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Ácido fosfórico.
- Água bidestilada.
- Álcool comercial (hidratado 96 °GL).
- Metanol.
- Solução CBB coloidal:

Componente	Quantidade	Concentração final
Azul de Coomassie (CBB) G-250	0,1 g	0,1% (p/v)
Ácido fosfórico 1 M	2 mL	20 mM
Sulfato de amônio	10 g	0,76 M
Metanol	20 mL	20% (v/v)
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Dissolver completamente o sulfato de amônio em um pouco de água bidestilada e, somente depois, adicionar o azul de Coomassie (CBB) G-250 e, em seguida, o ácido fosfórico. Completar o volume para 80 mL e adicionar o metanol (somente quando for utilizar) e misturar bem.

- Solução de fixação:

Componente	Quantidade	Concentração final
Álcool comum	50 mL	50%
Ácido acético	12 mL	12%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

- Sulfato de amônio.

5.2 Procedimento

1. Limpar uma travessa, preparar a solução de fixação e verter na travessa.
2. Colocar o gel na travessa contendo a solução de fixação e manter por, pelo menos, 1 hora.

O gel pode ficar armazenado na solução de fixação por vários dias.

3. Retirar a solução de fixação e adicionar a solução de CBB coloidal e manter sob agitação suave por 16 a 18 horas.
4. Retirar a solução e lavar o gel várias vezes com água destilada até que as proteínas estejam bem visíveis.

6 Digestão in gel de proteínas para identificação por espectrometria de massa

6.1 Material

- Acetonitrila.



Acetonitrila é facilmente inflamável, irritante aos olhos, pele, e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Agitador do tipo Vortex.
- Água bidestilada.
- Bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM (Apêndice 4).
- Capela de fluxo laminar.
- Centrífuga a vácuo (*Speed-Vac*).
- Luva de látex sem talco.
- Máscara.
- Ponteira (para 1 mL) com a ponta cortada.
- Solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM (Apêndice 4).
- Solução da matriz (preparar conforme descrito no Capítulo 21).
- Solução de tripsina (Apêndice 4).

6.2 Procedimento

1. Excisar a proteína do gel utilizando uma ponteira com a ponta cortada.
2. Lavar os pedaços de gel com 400 mL de solução acetonitrila/bicarbonato de amônio durante 15 minutos em agitador do tipo Vortex. Repetir este procedimento três vezes até que os pedaços de gel estejam transpa-

rentes. Não há necessidade de retirar todo o corante do gel.

3. Adicionar 200 mL de acetonitrila e colocar em agitador do tipo Vortex por 5 minutos ou até que os pedaços de gel estejam esbranquiçados.
4. Secar as proteínas em centrífuga a vácuo por 20 minutos.
5. Adicionar 15 μ L de solução de tripsina e manter no gelo por 30 minutos.
6. Adicionar 40 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM ou o volume necessário para cobrir os pedaços de gel.
7. Incubar em estufa a 37 °C por 16 horas.
8. Armazenar a solução de digestão a -20 °C ou aplicar na placa do espectrômetro.
9. Misturar 1 μ L da solução de digestão com 1 μ L de solução da matriz e aplicar na placa do espectrômetro para análise.

6.3 Observação

Utilizar somente tubos da marca recomendada pelo fabricante do espectrômetro de massa. Outras marcas podem liberar elementos que interferem na identificação da proteína.

O protocolo descrito acima é baseado no método descrito por Shevchenko et al. (1996). Para aumentar a eficiência na identificação das proteínas, pode-se realizar a digestão de dois *spots* da mesma proteína. Existem inú-

meros protocolos de digestão in gel descritos na literatura e, portanto, adaptações podem ser realizadas de acordo com a amostra a ser analisada. A maioria dos protocolos descreve uma etapa adicional de extração dos peptídeos após a digestão com tripsina, entretanto, recomenda-se a aplicação direta da digestão na placa de MALDI para análise por espectrometria de massa.

Uma alternativa para digestão in gel de proteínas é o uso de kits como o *Trypsin Profile IGD kit* (Sigma) e *In-Gel Trypsin Digestion kit* (Thermo Scientific).

7 Referências

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DE MOT, R.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis of strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, n. 10, p. 960-967, 1989.
- GARBIS, S.; LUBEC, G.; FOUNTOLAKIS, M. Limitations of current proteomics technologies. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1077, n. 1, p. 1-18, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011.

Capítulo 21

Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa

Luciano Paulino da Silva
Marcelo Porto Bemquerer

1 Introdução

Espectrometria de massa (MS) é o termo utilizado para referir-se às técnicas envolvendo a ionização, separação e detecção de componentes moleculares em fase gasosa no intuito de determinar com acurácia a massa molecular, utilizando um espectrômetro de massa. Entre as aplicações biológicas da técnica, incluem-se: a) averiguação da identidade e grau de pureza de biomoléculas; b) confirmação e, em alguns casos, elucidação da estrutura molecular, tais como sequenciamento de peptídeos; c) análise de modificações estruturais, incluindo modificações pós-traducionais, interação entre proteínas ou de proteínas com ligantes, monitoramento de vias de degradação ou de biossíntese; d) filogenia e taxonomia; e) comparação de estados fisiológicos alterados por aspectos de desenvolvimento, nutricionais, patológicos, infecciosos ou devido à exposição a princípios ativos; f) análise forense (MILLER; TANNER, 2008).

As partes fundamentais de um espectrômetro de massa são a fonte de íons, o analisador de massa e o detector. Os íons são produzidos a partir da amostra em uma fonte de íons. Os íons são separados sob baixa pressão no analisador de massa de acordo com suas razões massa/carga (m/z), em que a massa é expressa em unidades de massa atômica ou Dalton (Da), que equivale à duodécima parte da massa de um átomo de carbono-12. Em seguida, os íons são detectados em um sistema normalmente constituído por um multiplicador de elétrons. Um sistema de processamento de dados gera o espectro

de massa, que é a representação gráfica da intensidade arbitrária do íon (eixo y) em relação à razão m/z (eixo x).

A espectrometria de massa progrediu rapidamente nas últimas três décadas em razão dos avanços nos métodos de ionização e análise de massa, que permitiram a utilização ampla dessa técnica para a investigação de questões biológicas relacionadas à química de macromoléculas e, mais especificamente, em aplicações em proteômica, geralmente como complementação de estudos genômicos.

Fundamentos e terminologias

Resolução, acurácia e sensibilidade constituem o tripé de fundamentos essenciais para o desempenho de um espectrômetro de massa. Resolução é a capacidade de distinguir dois picos inequivocamente em um espectro de massa, sendo calculada empiricamente como a massa molecular do íon em questão, dividida pela variação de massa (largura) do pico na metade do centroide da intensidade máxima. Acurácia fornece a confiabilidade da análise, correlacionando o valor de massa molecular mensurada com o valor esperado para um componente molecular (íon) conhecido, constituindo a diferença em massa entre o valor observado experimentalmente e o valor calculado teoricamente. Sensibilidade é uma medida estatística que representa a probabilidade de um íon ser detectado em uma amostra sob análise, geralmente sendo possível a detecção de compostos com limite na faixa de 10^{-13} (femto; f) a 10^{-19} (zepto; z) mols.

De acordo com a forma como os componentes moleculares são analisados em um espectrômetro de massa, o valor medido pode ser definido como a massa média ou massa monoisotópica. A massa média é determinada levando-se em consideração a composição elementar do íon analisado, utilizando suas massas atômicas médias, que no espectro correspondem ao centroide de um conjunto de íons não resolvidos. A massa média é utilizada em situações em que os instrumentos apresentam resolução insuficiente para discriminar isótopos. A massa monoisotópica é determinada levando-se em consideração a composição elementar do analito, utilizando como referência apenas as massas atômicas dos isótopos mais abundantes na natureza. Nesse caso, é possível observar a distribuição isotópica do componente molecular sob investigação, que é a representação gráfica da presença e abundância relativa de isótopos nas moléculas naturais conforme a sua composição elementar e na qual o valor da massa do primeiro pico dessa distribuição é, por convenção, a massa monoisotópica. Um aspecto importante a destacar nos padrões de distribuição isotópica é que, apesar da frequência relativamente baixa de ocorrência dos isótopos com uma ou mais unidades de massa atômica a mais (por exemplo, ^{13}C com 1,1%), a contribuição relativa em relação aos isótopos mais abundantes vai aumentando progressivamente, conforme um maior número dos respectivos elementos na macromolécula investigada e, conseqüentemente, com o aumento da massa molecular.

Aplicações em proteômica

Há pelo menos três estratégias de identificação de proteínas que utilizam espectrometria de massa: a) mapeamento de massa dos peptídeos ou impressão digital de peptídeos oriundos de uma proteína (*peptide mass fingerprint* – PMF); b) mapeamento da massa dos fragmentos de peptídeos por meio de tandem MS (MS/MS); c) sequenciamento *de novo* de íons em espectros de MS/MS.

O mapeamento de massa dos peptídeos é um procedimento que possibilita a identificação de uma proteína desconhecida mediante sua hidrólise enzimática, catalisada por peptidases a fragmentos menores, seguida da medida acurada dos peptídeos resultantes utilizando um espectrômetro de massa e comparando os íons resultantes aos íons esperados, a partir de seqüências de proteínas disponíveis em bancos de dados (JAMES et al., 1993).

O mapeamento da massa dos fragmentos de peptídeos obtidos por meio de MS/MS é um procedimento pelo qual um íon detectado em modo MS é fragmentado, e os íons resultantes desse processo são comparados com íons que haviam sido obtidos por fragmentação teórica esperada a partir de segmentos de proteínas conhecidas e disponíveis em bancos de dados. Esse procedimento é adotado nos casos em que há uma mistura de duas ou mais proteínas entre os íons constituintes de um mesmo espectro de MS submetido previamente a PMF ou para confirmação de identificações realizadas pelo método de PMF.

O sequenciamento *de novo* de peptídeos oriundos de íons obtidos de espectros de MS/MS consiste em um

procedimento em que uma sequência desconhecida ou ausente nos bancos de dados pode ser elucidada a partir de um espectro de massa, por meio de interpretação manual ou automática, com auxílio de programas computacionais (BIEMANN; PAPAYANNOPOULOS, 1994).

A confiabilidade da maioria desses procedimentos de identificação requer sustentação por meio de técnicas estatísticas que geralmente têm relação direta com o tamanho dos peptídeos identificados e com o grau de cobertura da sequência completa esperada. Além disso, a fidedignidade das identificações depende da qualidade dos espectros utilizados, que podem ser avaliados por meio da razão sinal/ruído, resolução, acurácia, calibração, ausência de contaminantes, entre outros fatores. Estratégias de verificação devem ainda ser conduzidas, tais como as existências de modificações químicas, por exemplo, oxidação, fosforilação e sulfatação, e a não ocorrência de clivagens específicas por peptidases.

Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa

Espectros de massa de peptídeos e proteínas são obtidos como uma estratégia de caracterização de moléculas em estudos de bioprospecção (FARROKHI et al., 2008), especialmente para a análise de amostras compostas por peptídeos ou metabólitos secundários. Para as investigações mais clássicas de proteoma ou de análise de proteínas naturais ou daquelas obtidas por meio de expressão heteróloga, os peptídeos são obtidos por clivagem de proteínas com tripsina e outras peptida-

ses (HEDSTROM, 2002). A etapa inicial da análise é a obtenção do espectro de massa dos peptídeos (modo MS). O resultado obtido desses experimentos é a razão m/z e, conseqüentemente, é a massa molecular dos peptídeos presentes na amostra, que é o requisito para a análise por PMF descrita anteriormente. Essa análise permite, ainda, a seleção de íons com razão sinal/ruído e resolução adequadas à fragmentação (modo MS/MS), seguida pela identificação dos peptídeos, que é a segunda etapa da análise de proteínas.

Existe uma vasta literatura para a aplicação de estratégias de espectrometria de massa em estudos de proteoma em larga escala (AEBERSOLD; MANN, 2003). Esses métodos são quase sempre automatizados, e a análise de massas moleculares obtidas, bem como o sequenciamento de segmentos de alguns peptídeos escolhidos, segue também procedimentos automatizados e bem estabelecidos. Ao contrário dessas abordagens, o enfoque dos procedimentos descritos neste capítulo é possibilitar ao usuário da espectrometria de massa obter espectros de qualidade alta, assim como conduzir o sequenciamento manual dos peptídeos, permitindo a obtenção de resultados mais acurados e, principalmente, o entendimento dos processos que governam a ionização e fragmentação de peptídeos e das particularidades inerentes a cada sequência.

Os procedimentos descritos neste capítulo aplicam-se especificamente à ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e à análise de íons por tempo de voo (TOF). Na modalidade de MALDI (ZENOBI; KNOCHENMUSS,

1998), a ionização favorece a formação de espécies com número baixo de cargas. Para os peptídeos, a probabilidade maior é que espécies monocarregadas ($z=1$) sejam observadas (TANAKA, 2003). Peptídeos com $z=1$ têm a desvantagem de poder ter um sítio muito básico, como um resíduo de arginina, o que pode dificultar a fragmentação (BYTHELL et al., 2009). A razão do desfavorecimento da fragmentação homogênea em peptídeos contendo sítios básicos é que o mecanismo da fragmentação requer a mobilidade do próton para o nitrogênio da ligação peptídica que é rompida (PAIZS; SUHAI, 2005). Por esta razão, o sequenciamento de peptídeos por outra modalidade de ionização, denominada de *electrospray ionization* (ESI), é preferencialmente conduzido para peptídeos com $z=2$, no qual é esperado que um dos prótons seja fixo em um sítio muito básico, e o outro próton seja mais móvel e possa ser transferido para os sítios de clivagem (PAIZS; SUHAI, 2005). Em contrapartida, a fragmentação e o sequenciamento de peptídeos por MALDI-TOF/TOF (MS/MS) apresenta grande versatilidade, acurácia e rapidez de obtenção de dados, o que compensa uma possível maior dificuldade de fragmentação (BYTHELL et al., 2009).

Novos métodos de ionização e de fragmentação de peptídeos foram descritos. Um avanço interessante, aplicável a biomoléculas purificadas, é a possibilidade de fragmentar íons de proteínas diretamente na fonte de equipamentos com fonte de ionização do tipo MALDI. A descrição metodológica e mecanística dessas fragmentações, que é de natureza radicalar (KÖCHER et al., 2005; ZUBAREV, 2003), foge ao escopo deste capítulo.

2 Análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF

2.1 Material

- 2-propanol, grau cromatográfico.
- Acetonitrila (ACN), grau cromatográfico.



Acetonitrila é facilmente inflamável, irritante aos olhos, pele, e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), grau analítico, recristalizado de $ACN:H_2O$.



Cianocinamatos são descritos como inibidores do transporte de ácidos orgânicos pelas membranas biológicas. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

- Ácido trifluoroacético 3% (v/v), grau cromatográfico.
- Água ultrapura (deionizada) ou água tipo 1.
- Amostras de proteínas ou peptídeos separados por cromatografia, excisão de bandas de eletroforese unidimensional ou bandas (*spots*) de eletroforese bidimensional (Capítulo 20).

- Luvas de látex, preferencialmente luvas isentas de talco.
- Máscaras contra pó.
- Metanol, grau cromatográfico.



Metanol é altamente tóxico por inalação, contato com pele e por ingestão, provoca cegueira e queimaduras profundas. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

- Microtubo de 1,5 mL para microcentrífuga.
- Placa de MALDI em aço inoxidável.

2.2 Procedimento

É apresentado, em seguida, um protocolo detalhado para obtenção de espectros de MS e de MS/MS em um equipamento de MALDI-TOF/TOF. Exceto por pequenas variações, os procedimentos de aquisição são semelhantes na maioria dos instrumentos desse tipo.

1. Lavar a placa de aço inoxidável com água e um solvente orgânico (metanol, 2-propanol ou acetonitrila) em uma capela de exaustão. Fazer a aspersão do solvente sobre a placa com auxílio de pisseta. Lavar alternadamente com água e o solvente orgânico. Repetir o procedimento pelo menos quatro vezes. Secar as placas levemente com um lenço de papel de rugosidade baixa e que não libere partículas (*line-free*).

As lavagens removem a maior parte das biomoléculas e da matriz aplicadas anteriormente sobre a placa. Entretanto, se, por inspeção visual simples, verificar-se que a placa ainda apresenta resíduos de compostos, deve-se submergir a placa em mistura de água:acetonitrila (1:1; v:v) e aplicar ultrassom durante 30 a 60 minutos. Pode-se substituir a mistura água:acetonitrila por água:metanol (1:1; v:v) ou água:2-propanol (1:1, v:v). Mesmo com esse procedimento mais vigoroso, compostos podem permanecer em quantidades da ordem de femtomol, que poderão ser detectados em análises posteriores. Portanto, o usuário deve estar sempre atento às possíveis contaminações quando analisar seus espectros.

2. Preparar a solução da matriz (CHCA 10 mg/mL ou 50 mmol/L): pesar 5 mg de CHCA e transferir para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. Dissolver o CHCA em 250 μ L de acetonitrila, 200 μ L de água ultrapura e 50 μ L de solução aquosa de ácido trifluoroacético a 3%. Os solventes devem ser adicionados, preferencialmente, nessa ordem. É importante ressaltar que a solução preparada estará no limite de solubilidade, devendo-se agitar vigorosamente em um agitador do tipo Vortex para solubilização.

A matriz mais amplamente utilizada para ionização de peptídeos obtidos por purificação cromatográfica ou digestão de proteínas por peptidases a partir de bandas ou *spots* de géis é o CHCA (ZENOBÍ; KNOCHENMUSS, 1998).

3. Preparar a solução da biomolécula a ser analisada: dissolver a amostra (nanogramas a microgramas) em um volume mínimo de água (em geral, entre 10 μ L e 30 μ L) ou solução aquosa de acetonitrila (até 50% em volume de acetonitrila). Quando necessário, realizar diluições seriadas.

Considerando-se os estudos mais clássicos de proteoma, a amostra terá sido obtida por tratamento com peptidases a partir de proteínas

separadas por métodos cromatográficos ou por eletroforese bidimensional (KOSHINO et al., 2008), sendo em geral pouco abundante.

4. Misturar 1 μL de solução do analito com 3 μL de solução da matriz e aplicar sobre a placa de MALDI em três posições consecutivas (triplicata). Esse procedimento deve ser repetido para a aplicação de todas as amostras obtidas para o estudo proteômico.

Sabendo-se que as funções primordiais da matriz são transferir energia radiativa para promover a dessorção da biomolécula e contribuir para sua ionização, deve-se ressaltar o caráter bimolecular das reações fotoquímicas entre a matriz e o composto a ser ionizado (ZENOBI; KNOCHENMUSS, 1998). Portanto, uma preparação correta da mistura entre matriz e analito é um pré-requisito para obtenção de um bom espectro.

5. Deixar a placa secar à temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. Reservar alguns *spots* na primeira linha da placa para aplicação do calibrante de massa molecular, o qual é uma mistura de peptídeos ou proteínas utilizada para estabelecer correlação entre a razão m/z e o tempo de voo (TANAKA, 2003).

Para a aplicação do calibrante de massa molecular, deve-se seguir a recomendação do fabricante. Em geral, dissolve-se o sólido em 1 μL a 2 μL da solução da matriz (CHCA 10 mg/mL) preparada de acordo com a etapa 2 deste item. Distribuir a solução de calibrante em três a cinco posições da placa de aço inoxidável. O calibrante é uma mistura de peptídeos (ou proteínas) de massa molecular determinada de modo acurado e com capacidade elevada de ionização.

6. Introduzir a placa metálica no espectrômetro de massa de acordo com as indicações do fabricante do equipamento.

Para a aquisição do espectro de massa, a fonte de íons e o analisador devem estar em ambiente de quase vácuo, com pressões máximas

recomendadas da ordem de 10^{-6} mbar. Quando essas pressões são atingidas, a aquisição do espectro pode ser iniciada. Para a análise de peptídeos, deve-se selecionar uma faixa de detecção de m/z de 1.000 a 6.000, e para proteínas, faixa de m/z de 4.000 a 12.000 ou maior, selecionando-se o método apropriado.

7. Iniciar a aquisição do espectro dos calibrantes. Incidir o laser sobre a amostra e, assim, obter o primeiro espectro. Adquirir uma somatória de espectros até que a intensidade atinja a ordem de aproximadamente 10^4 (unidades arbitrárias, u.a.).

Após a aquisição dos espectros da mistura dos peptídeos presentes na mistura de calibrantes (por exemplo, *peptide calibration standard*), a calibração propriamente é conduzida de acordo com recomendações do fabricante do equipamento. É absolutamente indispensável que a calibração seja conduzida cada vez que uma nova placa de amostras for introduzida no equipamento, ou a mesma placa for removida e reinserida uma nova placa com amostras no equipamento.

8. Adquirir os espectros das amostras dos peptídeos (Figura 1) ou proteínas (Figura 2). Gravar os espectros em formato definido pelo fabricante do equipamento.

De forma semelhante ao que ocorreu para a aquisição dos espectros dos peptídeos calibrantes, deve-se utilizar a menor intensidade de laser possível para a obtenção de cada espectro e fazer a somatória de vários espectros para que se obtenha uma razão sinal/ruído da ordem de 10^4 . O espectro é gravado em um formato de arquivo determinado pelo fabricante. A análise dos espectros é conduzida elaborando-se uma lista dos produtos que forneçam os valores mais altos de intensidade (com razão sinal/ruído maior que 10^3). Posteriormente, a tentativa de identificação das proteínas segue os procedimentos descritos no item 3.2 Procedimento.

9. Fazer a seleção de espectros para a fragmentação e sequenciamento. Selecionar espectros correspondentes a íons com razão sinal/ruído da ordem de 10^4 e que não tenham contaminantes em uma faixa de 0,4% a 0,6% (no eixo x, m/z).

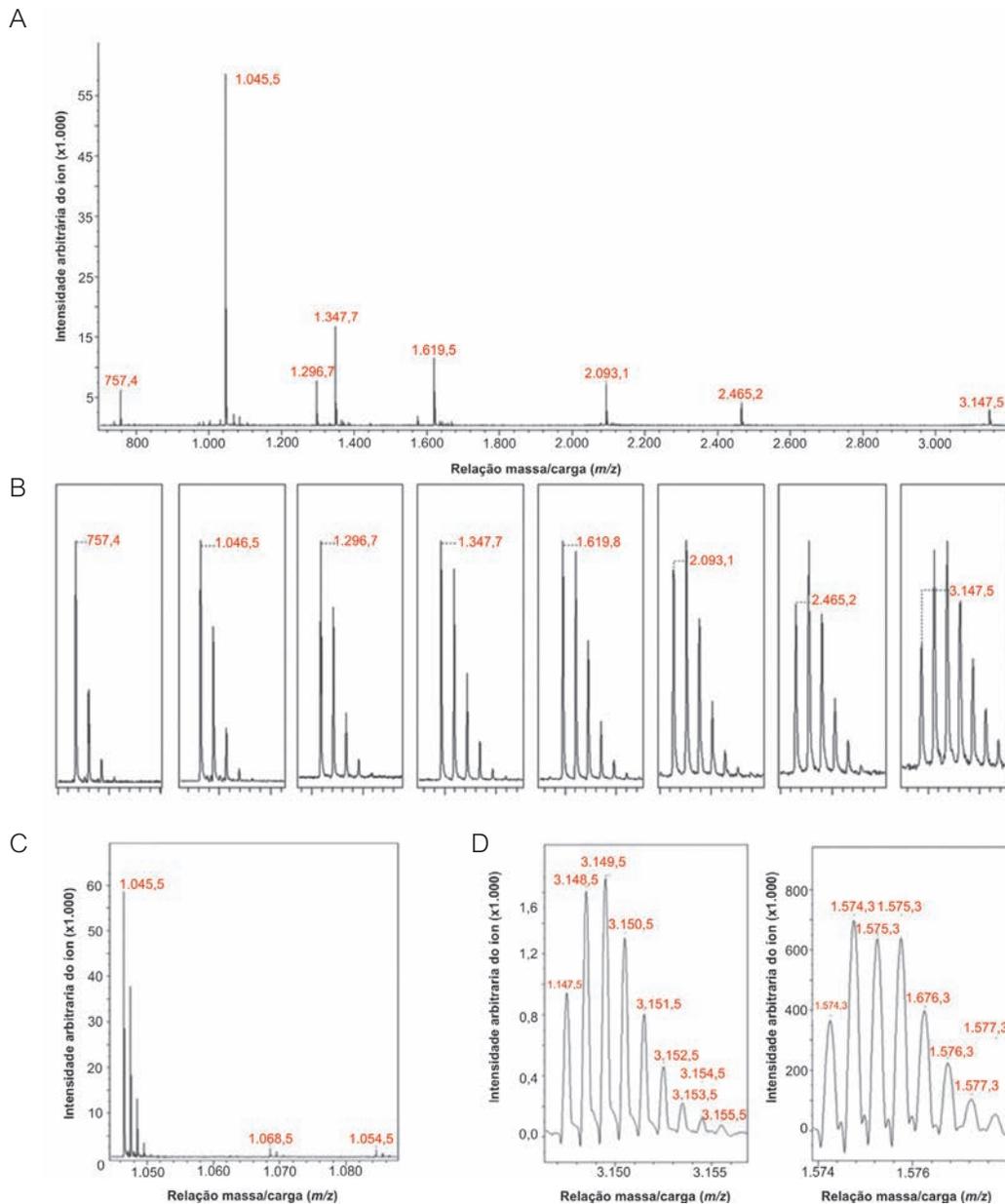


Figura 1. A) Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operando em modo refletido/positivo a partir de uma mistura de peptídeos. As razões m/z assinaladas ilustram componentes moleculares com maior abundância no espectro. B) Detalhe do espectro de massa que ilustra as diferenças entre os padrões de distribuição isotópica de acordo com a razão m/z dos componentes investigados. C) Destaque para os adutos com íons sódio (+22) e potássio (+38) a partir do componente $[M+H]^+ = 1046,5$. D) Detalhes das distribuições isotópicas do íon monocarregado $[M+H]^+ = 3.147,5$ e seu estado duplamente carregado $[M+2H]^+ = 1.574,3$.

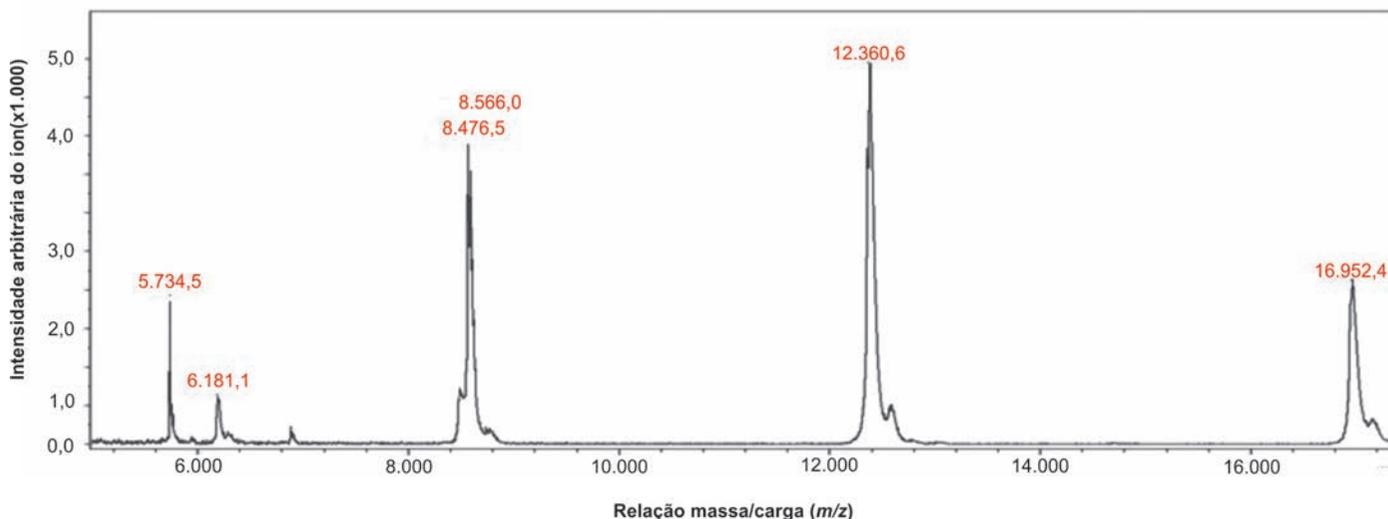


Figura 2. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operando em modo linear/positivo a partir de uma mistura de proteínas. Detalhe para a resolução baixa desse modo de operação em comparação com o modo refletido ilustrado na Figura 1.

Para a identificação inequívoca da proteína, alguns peptídeos obtidos por clivagem com a peptidase devem ser sequenciados. Esse procedimento é conduzido pela metodologia *tandem* MS, MS/MS ou MS2 uma vez que ele acopla duas etapas de espectrometria de massa, nas quais o íon precursor é selecionado e subsequentemente fragmentado. Os fragmentos obtidos são então analisados. É importante analisar cuidadosamente o espectro de MS (obtido de acordo com a etapa 8 deste item) para evitar a seleção de adutos de Na^+ (22 unidades de massa a mais) e de K^+ (38 unidades de massa a mais) em relação ao íon do peptídeo ionizado por um próton $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figura 1C) ou a íons duplamente carregados $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (Figura 1D).

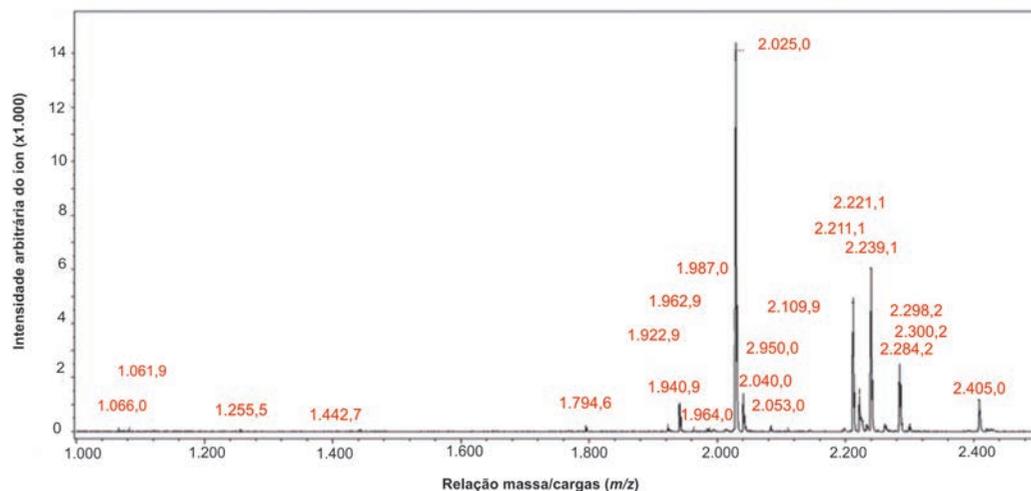
10. Uma vez selecionado o íon, fragmentar por LIFT™ (Figura 3) (SUCKAU et al., 2003) ou por dissociação induzida por colisão (CID) (MEDZIHRADSKY et al., 2000).

As voltagens e demais condições experimentais empregadas para seleção do íon precursor, fragmentação e análise dos fragmentos gerados são otimizadas pelo fabricante do equipamento, mas valores para os parâmetros (voltagens na fonte e célula de colisão) mais importantes podem ser sugeridos para os modos LIFT™ ou CID, como $\text{IS1} = 8 \text{ kV}$; $\text{IS2} = 7,15 \text{ kV}$; $\text{LIFT1} = 19 \text{ kV}$.

Fragmentação de íons na fonte do MALDI na presença de DAN

11. De modo análogo ao processo de fragmentação por dissociação por colisão com elétron (ECD), a fragmentação de íons na fonte do MALDI na presença do 1,5-diaminonaftaleno (DAN) ou outras matrizes leva

A



B

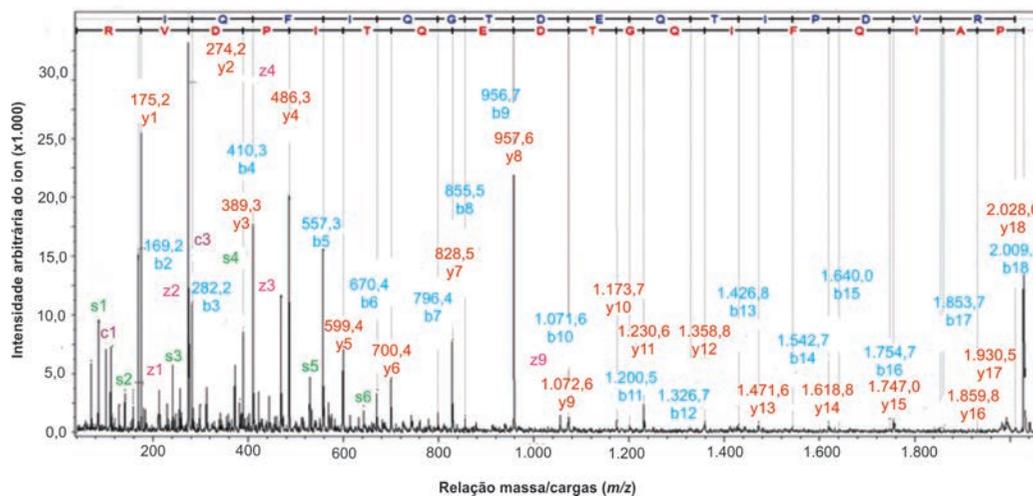


Figura 3. A) Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF, com o equipamento operando em modo refletido/positivo em amostra derivada da digestão tripsínica de spot de eletroforese bidimensional de extrato proteico de arroz (*Oryza sativa*). B) Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operada em modo LIFT™ a partir de íon precursor de $[M+H]^+ = 2.028,0$ no espectro mostrado em (A), sendo assinalados íons das séries y (vermelho), b (azul), a (verde), z (magenta) e c (roxo).

à formação de íons das séries c (Figura 4), preferencialmente, assim como de íons da série z, e também ao aparecimento de alguns íons da série y. Para tanto, uma solução de DAN a 10 mg/mL (60 mmol/L) deve ser preparada utilizando os mesmos solventes anteriormente relatados para o preparo da matriz CHCA (etapa 2 do item 2.2 Procedimento) e seguindo os mesmos procedimentos de preparo (etapa 3 do item 2.2 Procedimento) e aplicação de amostra (etapa 4 do item 2.2 Procedimento).



Os derivados de **naftaleno**, como o DAN, são considerados prováveis agentes mutagênicos, inflamáveis e irritantes aos olhos, pele e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

2.3 Observações

Muitas outras matrizes podem ser utilizadas para ionização de biomoléculas e análise por espectrometria de massa MALDI-TOF. A escolha da matriz mais apropriada

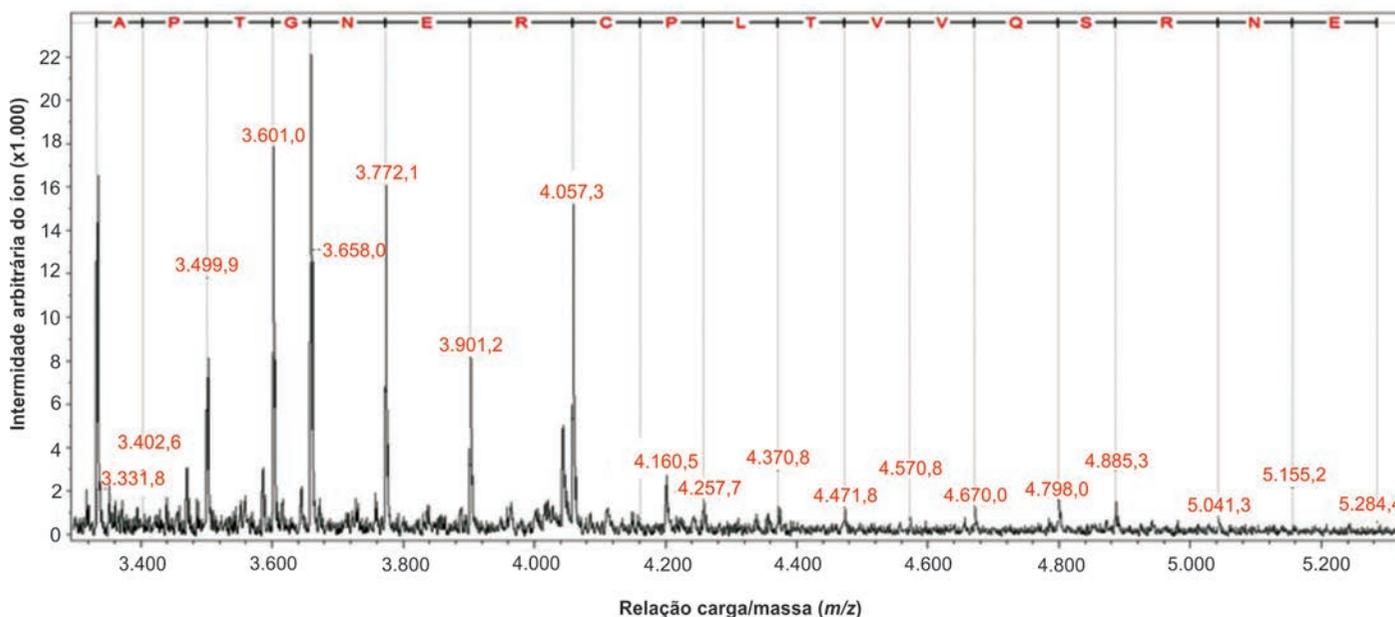


Figura 4. Espectro de massa obtido por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF operando em modo ISD a partir de uma proteína de soja (*Glycine max*) intacta (inibidor de peptidases) previamente separada por meio de cromatografia, sendo assinalados os íons da série c (vermelho).

da depende do tipo de biomolécula e do comprimento de onda de excitação do laser do equipamento (ZENOBÍ; KNOCHENMUSS, 1998). As matrizes são usualmente moléculas orgânicas aromáticas com capacidade de transferência de prótons. A escolha do modo de operação (linear ou refletido) e polaridade (positivo ou negativo) do espectrômetro de massa MALDI-TOF está relacionada com o tipo de analito investigado. O modo linear é escolhido nas situações em que o usuário deseja aquisições em faixa de massa alta ampla (geralmente m/z maior que 4.000); entretanto, acarreta em resolução e acurácia de massa baixas, sendo tipicamente utilizado para determinação da massa média de proteínas. O modo refletido é escolhido nas situações em que o usuário pretende realizar aquisições com resolução e acurácia de massa altas, mas em uma faixa de massa mais baixa limitada (geralmente m/z entre 600 e 4.000), sendo tipicamente utilizado para determinação da massa monoisotópica de peptídeos. O modo positivo ou negativo é escolhido quando se deseja a detecção de cátions ou ânions, respectivamente, sendo o modo positivo mais comumente utilizado na literatura para análise de peptídeos e proteínas.

A fragmentação de proteínas na fonte de ionização de equipamentos que operam em modalidade MALDI-TOF tem recebido uma atenção crescente na literatura, em razão da possibilidade de obtenção de sequências parciais de proteínas sem a necessidade do tratamento com peptidases para a produção de peptídeos de 1.000 a 2.500 Da, que são o objeto de estudo dos procedimentos descritos nas etapas 9 e 10 do item 2.2 Procedimento.

A fragmentação na fonte é um processo de clivagem homolítica (radicalar) da cadeia peptídica, que favorece a quebra da ligação N-C e a consequente geração de íons das séries *c* e *z* (Figura 5). Em comparação, a clivagem mais convencional por LIFT™ ou CID na presença de CHCA ocorre por meio de clivagens heterolíticas e favorecimento de ruptura da ligação peptídica e produção de íons das séries *b* e *y* (Figura 5) (KÖCHER et al., 2005; PAIZS; SUHAI, 2005; ZUBAREV, 2003).

3 Identificação de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa

3.1 Material

- Acesso a bancos de dados de sequências de proteínas.
- Microcomputador com acesso à internet.
- Programas e plataformas computacionais de análise de peptídeos e comparações de sequências.
- Tabela de massas moleculares de resíduos e imônios de aminoácidos, dipeptídeos e modificações pós-traducionais.

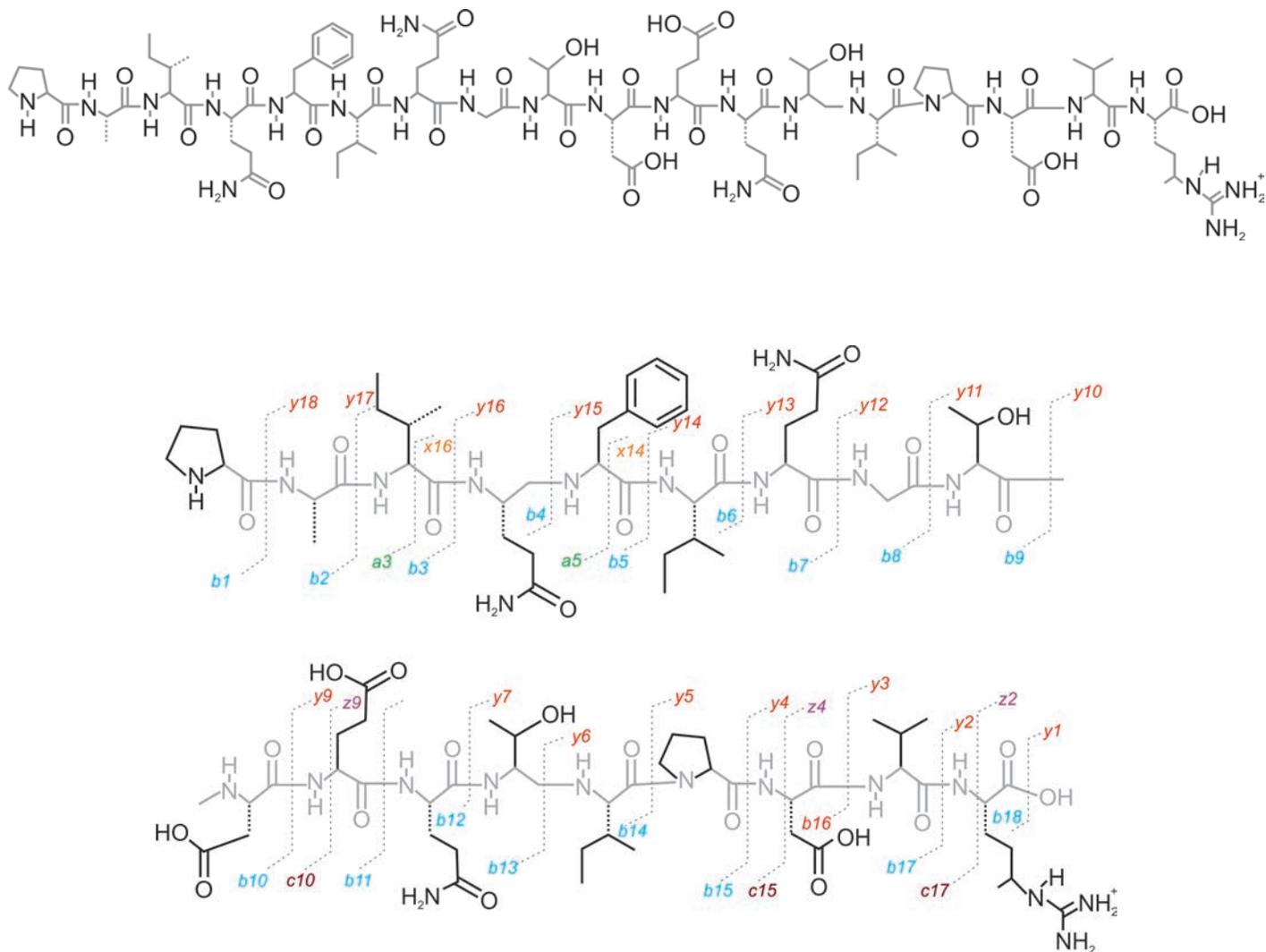


Figura 5. A) Estrutura de uma cadeia peptídica, correspondente ao espectro de MS/MS que foi apresentado na Figura 3B. Observar o padrão repetitivo dos átomos da cadeia principal: N, C (alfa), C (carbonila). B) Modos de fragmentação para gerar as séries a, b e c e x, y e z. Os íons assinalados em cores correspondem àqueles observados no espectro da Figura 3B, e os íons x14 e x16, mostrados em cor laranja, não foram detectados.

3.2 Procedimento

1. Comparar as massas moleculares dos peptídeos obtidos com as massas moleculares de produtos teóricos de digestão enzimática de proteínas, que são disponíveis em bancos de dados por meio do método de PMF (JAMES et al., 1993).

Em geral, identificações significativas não são obtidas apenas com esse procedimento, em razão de uma série de fatores descritos no item 2.2 Procedimento, sendo comum a necessidade de aquisição de espectros de MS/MS. Uma vez obtidos e registrados os espectros de MS/MS, é conveniente que o sequenciamento seja conduzido manualmente, com a utilização de programas computacionais fornecidos pelos fabricantes de equipamentos ou que sejam descritos na literatura científica e possam ser obtidos livremente na internet, como o programa Mmass (STROHALM et al., 2010).

2. Analisar o espectro de fragmentação (MS/MS) do peptídeo, procurando por diferenças de m/z correspondentes aos resíduos de aminoácidos naturais ou modificados, com o auxílio de programas computacionais.

Na literatura, são encontradas tabelas com massas moleculares esperadas para modificações pós-traducionais ou reações conduzidas pelo operador.

3. Verificar a presença de imônios na região de m/z menor que 200 do espectro. Os imônios são impressões digitais da presença de determinados resíduos, sendo particularmente estáveis e intensos os imônios provenientes dos resíduos aromáticos (His, Phe, Tyr e Trp), assim como os imônios de cadeias alquílicas

como Val, Leu/Ile (AMBIHAPATHY et al., 1997) e de Cys modificada por alquilação.

Os imônios são produzidos por clivagens das duas ligações amida que o resíduo de aminoácido forma na cadeia peptídica, seguidas de perda de CO (AMBIHAPATHY et al., 1997) ou outros mecanismos, como uma fragmentação secundária de íons da série y . Os imônios são acompanhados por íons acessórios. Existem limitações nas metodologias clássicas de sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa, como a quase impossibilidade de distinção entre os resíduos isoméricos de Leu/Ile, em razão da intensidade baixa de íons resultantes de clivagens da cadeia lateral quando se conduz a fragmentação por LIFT™ ou CID. Outra dificuldade é a distinção entre resíduos isobáricos de Gln (massa monoisotópica = 128,0586) e Lys (massa monoisotópica = 128,0950), que apenas pode ser conduzida em espectrômetros de massa de alta resolução, que são equipamentos de custo elevado, além de não serem os modelos mais comumente empregados em proteômica.

4. Fazer a busca de similaridade para a identificação da proteína, com a utilização de bancos de dados como o *Uniprot database* ou o *Swiss-Prot database* e de ferramentas como o *Local Alignment Search Tool* (BLAST) e o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1997).
5. Observar a possível presença de contaminantes comuns em análise de proteomas, os quais devem ser excluídos da análise de resultados.

Alguns contaminantes são comuns em análises de proteínas por espectrometria de massa, tais como fragmentos de autólise de tripsina ou outras peptidases empregadas para clivagem das proteínas, assim como fragmentos de queratina de pele humana. A detecção dessas proteínas indica a necessidade de um cuidado maior na manipulação das amostras ou que a quantidade de peptidase utilizada na clivagem enzimática pode ser reduzida.

3.3 Observação

- A fragmentação de peptídeos obtidos por meio de clivagem com tripsina deve fornecer preferencialmente íons da série *y* (BYTHELL et al., 2009). Para os peptídeos contendo Lys como resíduo C-terminal, o íon *y1* pode ser identificado com $m/z = 147$; e para os peptídeos que possuem Arg como resíduo C-terminal, o íon *y1* tem $m/z = 175$ (Figura 3). O sequenciamento de peptídeos tripsínicos pode começar pela identificação do íon *y1*, seguida da busca pelo íon seguinte da mesma série, o íon *y2*. A perda neutra de amônia (17 unidades de massa) fornece um íon acessório que é valioso para a identificação do íon *y2* e para os demais íons da série *y*. Para a confirmação da sequência, é importante também que seja encontrado pelo menos um segmento de íons da série *b*, que pode ser identificada pela série acessória *a*, resultante da perda de 28 unidades de massa. O íon *b1* raramente é observado, de modo que a busca pelos íons da série *b* pode começar com a procura do íon *b2*, para o dipeptídeo N-terminal. Especialmente para o caso de peptídeos obtidos por clivagem com peptidases, como a quimotripsina, pepsina e glutamil-peptidase (HEDSTROM, 2002), os íons da série *y* não serão tão amplamente favorecidos quanto os íons de peptídeos obtidos por tripsinólise. Nesses casos, a identificação de segmentos das séries *y* e *b* é fundamental (Figura 5). Quando se conduz o sequenciamento,

é importante estar atento à presença de modificações pós-traducionais e às modificações feitas durante o tratamento da amostra, tal como a alquilação de resíduos de cisteína. Uma tabela com massas moleculares de dipeptídeos pode ser encontrada na Internet¹.

4 Referências

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, London, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMBIHAPATHY, K.; YALCIN, T.; LEUNG, H.-W.; HARRISON, A. G. Pathways to immonium ions in the fragmentation of protonated peptides. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 32, n. 2, p. 209-215, 1997.
- BIEMANN, K.; PAPAYANNOPOULOS, I. A. Amino acid sequencing of proteins. **Accounts of Chemical Research**, Washington, DC, v. 27, n. 11, p. 370-378, 1994.
- BYTHELL, B. J.; SUHAI, S.; SOMOGYI, Á.; PAIZS, B. Proton-driven amide bond-cleavage pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 131, n. 39, p. 14057-14065, 2009.
- FARROKHI, N.; WHITELEGGE, J. P.; BRUSSLAN, J. A. Plant peptides and peptidomics. **Plant Biotechnology Journal**, Chichester, v. 6, n. 2, p. 105-134, 2008.
- HALESTRAP, A. P. The mitochondrial pyruvate carrier: kinetics and specificity for substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**, London, v. 148, n. 1, p. 85-96, 1975.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, Washington, DC, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

¹ Disponível em: <<http://prospector.ucsf.edu/prospector/html/misc/dipep.htm>>.

JAMES, P.; QUADRONI, M.; CARAFOLI, E.; GONNET, G. Protein identification by mass profile fingerprint. **Biochemical and Biophysical research Communications**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 58-64, 1993.

KÖCHER, T.; ENGSTRÖM, Å.; ZUBAREV, R. A. Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 77, n. 1, p. 172-177, 2005.

KOSHINO, L. L.; GOMES, C. P.; SILVA, L. P.; EIRA, M. T. S.; BLOCH JUNIOR, C.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Comparative proteomical analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, n. 22, p. 10922-10926 2008.

MEDZIHRADSKY, K. F.; CAMPBELL, J. M.; BALDWIN, M. A.; FALICK, A. M.; JUHASZ, P.; VESTAL, M. L.; BURLINGAME, A. L. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 72, n. 3, p. 552-558, 2000.

MILLER, A.; TANNER, J. Mass spectrometry and proteomics. In: MILLER, A.; TANNER, J. **Essentials of chemical biology: structure and dynamics of biological macromolecules**. Chichester: John Wiley & Sons, 2008. p. 475-512.

PAIZS, B.; SUHAI, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. **Mass Spectrometry Reviews**, Chichester, v. 24, n. 4, p. 508-548, 2005.

STROHALM, M.; KAVAN, D.; NOVÁK, P.; VOLNÝ, M.; HAVLÍČEK, V. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 11, p. 4648-4651, 2010.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 376, n. 7, p. 952-965, 2003.

TANAKA, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, Chichester, v. 42, n. 33, p. 3860-3870, 2003.

ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, Chichester, v. 17, n. 5, p. 369-431, 1998.

ZUBAREV, R. A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. **Mass Spectrometry Reviews**, Chichester, v. 22, n. 1, p. 57-77, 2003.

Apêndice 1

Meios para crescimento de bactérias

Tabela 1. Meio LB (*Luria-Bertani*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Triptona	10 g	1%
Extrato de levedura	5 g	0,5%
NaCl	10 g	171 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Miller (1972).

Ajustar o pH do meio para 7,0, com NaOH 1 N (aproximadamente 1 mL). Completar o volume para 1 L com água destilada e esterilizar o meio por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C. Para meio sólido, acrescentar ágar a 1,6% (p/v) antes da autoclavagem.

Tabela 2. Meio MYA (*Culture medium for Agrobacterium rhizogenes strains*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Extrato de levedura	5 g	0,5%
Caseína	500 mg	0,05%
Manitol	8 g	0,8%
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	15 mM
NaCl	5 g	85,5 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Tepfer e Casse-Delbart (1987).

Ajustar o pH do meio para 6,6, com NaOH 1 N (aproximadamente 1 mL). Completar o volume para 1 L com água destilada e esterilizar o meio por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C. Para meio sólido, acrescentar ágar a 1,6% (p/v) antes da autoclavagem.

O (NH₄)₂SO₄ pode ser substituído por 2 g/L de MgSO₄.

Tabela 3. Meio YMB (*Yeast Mannitol Broth*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Extrato de levedura	400 mg	0,04%
Manitol	10 g	1%
K ₂ HPO ₄	500 mg	2,8 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg	0,8 mM
NaCl	100 mg	1,7 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Hooykaas et al. (1977).

Ajustar o pH do meio para 6,8, com NaOH 1 N (aproximadamente 1 mL). Completar o volume para 1 L com água destilada e esterilizar o meio por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C. Para meio sólido, acrescentar ágar 1,6% a (p/v) antes da autoclavagem.

Tabela 4. Meio YEB (*Yeast Extract Broth*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Extrato de carne	5 g	0,5%
Extrato de levedura	1 g	0,1%
Peptona	5 g	0,5%
Sacarose	5 g	14,6 mM
MgSO ₄	240 mg	2 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Vervliet et al. (1975).

Ajustar o pH do meio para 6,8, com NaOH 1 N (aproximadamente 1 mL). Completar o volume para 1 L com água destilada e esterilizar o meio por autoclavagem durante 20 minutos a 110 °C. Para meio sólido, acrescentar ágar a 1,6% (p/v) antes da autoclavagem.

O MgSO₄ pode ser substituído por 500 mg/L de MgCl₂.

Tabela 5. Meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Triptona	20 g	2%
Extrato de levedura	5 g	0,5%
NaCl	580 mg	10 mM
KCl 250 mM	10 mL	2,5 mM
MgCl ₂ 2 M	5 mL	10 mM
MgSO ₄ 2 M	5 mL	10 mM
Glicose 1 M	20 mL	20 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Hanahan (1983).

Dissolver, primeiramente, a triptona, o extrato de levedura e o NaCl em 950 mL de água destilada. Adicionar a solução de KCl 250 mM e ajustar o pH do meio para 7,0, com NaOH 1 N (aproximadamente 1 mL). Completar o volume para 1 L com água destilada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C. Quando o meio estiver morno (abaixo de 60 °C), adicionar as soluções de MgCl₂ 2 M, de MgSO₄ 2M e de glicose 1 M estéreis. Ajustar o volume para 1 L com água destilada estéril.

Para meio sólido, acrescentar ágar a 1,6% (p/v) antes da autoclavagem.

O meio SOB (*Super Optimal Broth*) (HANAHAN, 1983) é idêntico ao meio SOC, exceto pela ausência da glicose a 250 mM.

KCl 250 mM: pesar 1,86 g de KCl e dissolver em 100 mL de água deionizada.

MgCl₂ 2 M: pesar 19,04 g de MgCl₂ e dissolver em 90 mL de água deionizada. Ajustar o volume da solução para 100 mL com água deionizada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C.

MgSO₄ 2 M: pesar 24,07 g de MgSO₄ e dissolver em 90 mL de água deionizada. Ajustar o volume da solução para 100 mL com água deionizada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C.

Glicose 1 M: pesar 18,016 g de glicose e dissolver em 90 mL de água deionizada. Ajustar o volume da solução para 100 mL com água deionizada e esterilizar por filtração (0,22 µm).

Tabela 6. Meio AB (*Agrobacterium induction*).

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
Glicose	5 g	0,5%
Difco-ágar	15 g	1,5%
Tampão AB 20X	50 mL	1X
Sais AB 20X	50 mL	1X
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Fonte: Chilton et al. (1974).

Dissolver, primeiramente, a glicose e o ágar em 900 mL de água destilada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos a 110 °C. Após autoclavagem, adicionar o Tampão AB 20X e os Sais AB 20X estéreis. Adicionar os antibióticos apropriados antes de distribuir o meio nas placas.

Tampão AB 20X: pesar 60 g de K_2HPO_4 e 20 g de NaH_2PO_4 e dissolver em 900 mL de água destilada (pH 7,2). Ajustar o volume da solução para 1 L com água destilada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C.

Sais AB 20X:

Componente	Quantidade para 1 L	Concentração final
NH_4Cl	20 g	374 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6 g	24,3 mM
KCl	3 g	40 mM
$CaCl_2$	200 mg	1,8 mM
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg	180 μ M
H_2O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o volume da solução para 1 L com água destilada e esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos, a 110 °C.

Referências

CHILTON, M.-D.; CURRIER, T. C.; FARRAND, S. K.; BENDICH, A. J.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 71, n. 9, p. 3672-3676, 1974.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HOOPYKAAS, P. J. J.; KLAPWIJK, P. M.; NUTI, M. P.; SCHILPEROORT, R. A.; RÖRSCH, A. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium "ex planta"*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 98, n. 2, p. 477-484, 1977.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Sciences**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 24-28, 1987.

VERVLIET, G.; HOLSTERS, M.; TEUCHY, H.; MONTAGU, M. van; SCHELL, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. **Journal of General Virology**, London, v. 26, n. 1, p. 33-48, 1975.

Apêndice 2

Meios de cultura de plantas e reguladores de crescimento

Tabela 1. Composição dos diferentes meios de cultura de plantas citados neste Manual.

Composição	Constituinte (mg/L)	Meio MS ⁽¹⁾	Meio T0 ⁽²⁾	Meio CHM ⁽³⁾	Meio R4 ⁽⁴⁾	Meio NB ⁽⁵⁾	Meio R2 ⁽⁶⁾
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1.650,00	825,00	400,00	1.650,00	-	-
	KNO ₃	1.900,00	950,00	1.516,00	1.900,00	2.830,00	4.050,00
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440,00	220,00	440,00	440,00	165,00	146,00
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,00	185,00	740,00	370,00	185,00	246,00
	KH ₂ PO ₄	170,00	85,00	68,00	170,00	400,00	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	463,00	330,00
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	-	312,00
Micronutrientes	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	1,00	1,00	1,00	2,00	2,20
	H ₃ BO ₃	6,20	1,00	1,00	1,00	3,00	2,83
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	0,10	0,10	0,10	10,00	1,60
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,03	0,03	0,03	0,025	0,20
	AlCl ₃	-	0,03	0,03	0,03	-	-
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,03	0,03	0,03	-	-
	KI	0,83	0,01	0,01	0,01	0,75	-
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	-	-	-	0,25	0,125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-	-	-	0,025	-	
FeEDTA	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	27,80	27,80	27,80	27,80	12,50
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,26	37,26	37,26	37,26	37,26	1,80
Vitaminas	Pantotenato de Ca	-	1,00	1,00	1,00	-	-
	Ácido nicotínico	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	-
	Piridoxina-HCl	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	-
	Tiamina-HCl	0,10	1,00	1,00	1,00	10,00	1,00
Outros suplementos orgânicos	Mio-Inositol	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	-
	Biotina	-	0,01	0,01	0,01	-	-
	Glicina	2,00	-	-	-	-	-
	Prolina	-	-	-	-	500,00	-
	Glutamina	-	-	-	-	500,00	-
	Caseína	-	-	-	-	300,00	-
	Sacarose	30.000,00	20.000,00	20.000,00	20.000,00	30.000,00	-
	Manitol	-	80.000,00	60.000,00	60.000,00	-	-
Glicose	-	-	-	-	-	10.000,00	

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Composição	Constituinte (mg/L)	Meio MS ⁽¹⁾	Meio T0 ⁽²⁾	Meio CHM ⁽³⁾	Meio R4 ⁽⁴⁾	Meio NB ⁽⁵⁾	Meio R2 ⁽⁶⁾
Agente gelificante	Ágar	6.000,00	-	-	6.000,00	-	-
	Agarose tipo I	-	-	6.000,00	-	-	7.000,00
	Fitigel	-	-	-	-	3.000,00	-
Tampão	MES	-	71,08	71,08	71,08	-	-
pH		5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1

⁽¹⁾ Murashige e Skoog (1962).

⁽²⁾ Bourgin et al. (1979); macronutrientes do meio MS diluído duas vezes, FeEDTA do meio MS, micronutrientes de Heller (1953); e vitaminas de Morel e Wetmore (1951).

⁽³⁾ Macronutrientes do meio C (MULLER et al., 1983), micronutrientes de Heller (1953) e vitaminas de Morel e Wetmore (1951).

⁽⁴⁾ Bourgin et al. (1979); macronutrientes e FeEDTA do meio MS, micronutrientes de Heller (HELLER, 1953); e vitaminas de Morel e Wetmore (1951).

⁽⁵⁾ Macronutrientes N6 (CHU, 1978) e micronutrientes e vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968).

⁽⁶⁾ Ohira et al. (1973).

- Os macro e micronutrientes, FeEDTA e vitaminas podem ser preparados em soluções-estoque de 10 a 1.000 vezes concentradas, em relação às suas concentrações finais no meio. Os estoques podem ser mantidos a 4 °C por alguns meses.
- Soluções-estoque de macronutrientes concentradas acima de 10 vezes não poderão conter cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), pois este precipita na solução. Nesse caso, deverão ser preparadas duas soluções: uma contendo apenas o CaCl₂.2H₂O, e outra contendo os outros macronutrientes, ambas concentradas 50 vezes.
- Para os micronutrientes, é recomendado preparar uma solução-estoque 100 vezes concentrada.
- O quelato FeEDTA pode ser preparado em uma solução-estoque 50 vezes concentrada: adicionar o Na₂EDTA em um pequeno volume de água e aquecer para dissolver. Acrescentar o FeSO₄.7H₂O já dissolvido em água e, após misturados, completar o volume com água (CALDAS et al., 1990).
- As vitaminas podem ser preparadas em uma solução-estoque 500 vezes concentrada que deve ser separada em alíquotas (CALDAS et al., 1990). Manter as alíquotas em estoque a -20 °C e

Tabela 2. Reguladores de crescimento utilizados nos diferentes meios de cultura descritos neste Manual.

Classe	Abreviatura (nome comum)	Nome	Massa molecular (g/mol)	Solvente ^(1,2)	Concentração da solução-estoque (mg/mL)	Modo de esterilização ⁽³⁾	Condições de estocagem (solução)
Ácido abscísico	ABA	Ácido abscísico	264,32	KOH 1 N	0,1 a 10	Filtração	< 0 °C
Auxina	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	221,04	KOH 1 N	0,01 a 6	Autoclavagem	0 a 5 °C
	ANA	Ácido naftalenoacético	186,21	KOH 1 N	0,01 a 10	Autoclavagem	0 a 5 °C
	AIA	Ácido 3-indolilacético	175,18	KOH 1 N	0,01 a 3	Filtração	< 0 °C
Citocinina	BAP ou BA	6-benzilaminopurina ou 6-benziladenina	225,25	HCl 1 N	0,01 a 5	Filtração	0 a 5 °C
	TDZ (Tidiazuron)	1-fenil-3-(1,2,3,4-tiadiazol-5-il)ureia	220,25	KOH 1N	0,001 a 0,05	Filtração	0 a 5 °C
	ZEA (Zeatina)	N ⁶ -(4-hidroxi-3-metilbut-2 enil) aminopurina	219,24	HCl 1 N	0,01 a 5	Filtração	< 0 °C
	CIN (Cinetina)	6-furfurilamino-purina	215,21	HCl 1 N	0,01 a 5	Filtração	< 0 °C
Giberelina	GA ₃ (Ácido giberélico)	2,4 a,7-trihidroxi-1-metil-8-metileno-gib-3-eno, 4a -lactona, 10-carboxílico	364,37	Etanol	0,01 a 5	Filtração	0 a 5 °C

⁽¹⁾ NaOH 1 N pode ser utilizado em substituição ao KOH 1 N na dissolução das auxinas (2,4-D; ANA; ABA; AIA); entretanto, sódio (micronutriente presente na maioria dos meios de cultura) em excesso pode prejudicar o desenvolvimento in vitro da planta ou explante. O excesso de potássio, por sua vez, é menos prejudicial por ser um macronutriente na maioria dos meios.

⁽²⁾ Utilizam-se 300 µL de base (KOH ou NaOH) ou de ácido (HCl) para dissolver 10 mg de auxina ou de citocinina, respectivamente. Depois de dissolvido, completar o volume final com água.

⁽³⁾ Esterilização por autoclavagem: durante 20 minutos, a 110 °C; esterilização por filtração: adicionar o regulador de crescimento, utilizando filtro de 0,22 µm, ao meio esterilizado.

conservar somente uma alíquota em uso a 4 °C. É importante observar que as soluções de vitaminas comercializadas possuem, de uma maneira geral, o mio-inositol em sua composição.

- As soluções-estoque de macro e micronutrientes e FeEDTA em uso devem ser armazenadas a 4 °C, e a solução-estoque FeEDTA deve ser mantida em frasco escuro, coberto com papel alumínio.
- O pH dos meios deve ser ajustado antes da esterilização, preferencialmente com KOH 1 N. NaOH 1 N pode ser utilizado em substituição ao KOH 1 N no ajuste do pH dos meios; entretanto, sódio (micronutriente presente na maioria dos meios de cultura) em excesso pode prejudicar o desenvolvimento in vitro da planta ou explante. O excesso de potássio, por sua vez, é menos prejudicial por ser um macronutriente na maioria dos meios.
- O ágar pode ser usado em uma faixa de concentração que varia de 0,5% a 0,7% e deve ser acrescentado nos meios semissólidos depois do ajuste do pH e antes da esterilização (CID; TEIXEIRA, 2010).
- Todos os meios devem ser esterilizados em autoclave, durante 20 minutos, a 110 °C.

Referências

- BOURGIN, J.-P.; CHUPEAU, Y.; MISSIONIER, C. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, n. 2, p. 288-292, 1979.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABTCP: EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.
- CHU, C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Beijing. **Proceedings...** Beijing: Science Press, 1978. p. 43-50.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 15-19.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- HELLER, R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie Vegetale**, Paris, v. 14, p. 1-223, 1953.
- MOREL, G.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 38, p. 141-143, 1951.
- MULLER, J. F.; MISSIONIER, C.; CABOCHE, M. Low density growth of cells derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts: influence of the source of protoplasts and comparison of the growth-promoting activity of various auxins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 57, n. 1, p. 35-41, 1983.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 14, n. 6, p. 1113-1121, 1973.

Apêndice 3

Antibióticos

Tabela 1. Antibióticos utilizados para seleção de linhagens de *Escherichia coli* e *Agrobacterium* spp.

Antibiótico	Abreviatura	Dose seletiva (mg/L)		Solução-estoque (mg/mL)	Solvente ⁽⁶⁾
		<i>E. coli</i>	<i>Agrobacterium</i>		
Ampicilina ⁽¹⁾	Ap	100	50	50	Água
Ácido nalidíxico	Nal	20	50	50	NaOH 0,1 N
Canamicina ⁽²⁾	Km	100	100	100	Água
Carbenicilina ⁽¹⁾	Cb	100	100	50	Água
Cefotaxima ⁽¹⁾	Cx	-	250	250	Água
Cloranfenicol ⁽¹⁾	Cm	25	50	25	Etanol 70% (v/v)
Espectinomicina ⁽³⁾	Sp	50	100	50	Água
Estreptomicina ⁽²⁾	Sm	12,5	300	300	Água
Gentamicina ⁽²⁾	Gt	5	50	50	Água
Neomicina ⁽²⁾	Nm	25	40	12,5	Água
Rifampicina ⁽⁴⁾	Rf	100	50	50	DMSO
Tetraciclina ⁽³⁾	Tc	15	2,5	5	Etanol
Timentina ⁽⁵⁾	Tm	-	50	50	Água

⁽¹⁾ Em forma de sal de sódio.

⁽²⁾ Em forma de sulfato.

⁽³⁾ Em forma de hidrocloreto.

⁽⁴⁾ Em forma cristalina.

⁽⁵⁾ A timentina consiste em uma combinação de ticarcilina dissódica e clavulanato de potássio e pode ser adquirida comercialmente.

⁽⁶⁾ Utilizar água bidestilada estéril.

Fonte: Armitage et al. (1988) e Sambrook e Russell (2001).

- As soluções-estoque de todos os antibióticos que são solúveis em água e em NaOH devem ser esterilizadas por filtração (0,22 μm) e depois conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os antibióticos devem ser dissolvidos em volume mínimo de solvente e levados a volume final com água deionizada. As soluções-estoque de rifampicina, tetraciclina e cloranfenicol devem ser dissolvidas nos respectivos solventes (DMSO e etanol), diretamente em um recipiente estéril, não necessitando de filtração posterior para esterilizar.
- Uma vez esterilizadas, as soluções-estoque devem ser separadas em alíquotas e conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Os antibióticos devem ser acrescentados diretamente ao meio de cultura líquido ou ao meio semissólido derretido e morno ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$). É importante lembrar que a maioria dos antibióticos pode ser facilmente degradada a altas temperaturas ou na presença de luz, tornando-se inativa.

Referências

ARMITAGE, P.; WALDEN, R.; DRAPER, J. Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. In: DRAPER, J.; SCOTT, R. (Ed.). **Plant genetic transformation and gene expression**: a laboratory manual. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. p. 1-67.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3, 2368 p.

Apêndice 4

Soluções e tampões

Este apêndice contém as soluções-estoque e os tampões que são utilizados em diferentes experimentos distribuídos nos vários capítulos. Eles são apresentados em sua forma mais concentrada, de modo a servir de base às diferentes diluições desejadas. É necessário alertar-se para os perigos no manuseio das substâncias; é recomendado vivamente que, antes de preparar qualquer solução, recolham-se informações no laboratório sobre as condições de descarte, armazenamento, etc.

As soluções específicas para o trabalho com RNA deverão ser submetidas a tratamento com dietilpircarbonato (DEPC), forte inibidor de RNAses. Esse tratamento envolve mistura da solução com DEPC a uma concentração final de 0,1% (v/v). Incubar a mistura por, ao menos, 12 horas, a 37 °C. Em seguida, a solução deverá ser esterilizada em autoclave a 110 °C por 20 minutos para inativação do DEPC. O Tris-HCl e SDS, não podendo ser tratados diretamente com DEPC, deverão ser preparados em água previamente tratada com DEPC 0,1% (ver a seguir). Para o trabalho com RNA, deve-se também tomar o cuidado de deixar toda a vidraria, ponteiras, tubos de microcentrífuga, etc. incubados em água DEPC 0,1%, antes de serem levados à autoclave.

A esterilização das soluções e tampões a seguir descritos pode ser realizada por autoclavagem, durante 20 minutos, a 110 °C, ou por filtração, utilizando filtro de 0,22 µm.

Soluções

Acetato de amônio (CH₃COONH₄) 10 M – AcNH₄ 10 M

Dissolver 77,08 g de acetato de amônio em 80 mL de água destilada à temperatura ambiente. Ajustar o volume para 100 mL. Esterilizar por filtração (0,22 µm) e conservar à temperatura ambiente.

Para solução de acetato de amônio 0,1 M em metanol: dissolver 3,85 g de acetato de amônio em 500 mL de metanol. Misturar bem e conservar a -20 °C.

Acetato de potássio (CH₃COOK) 5 M – AcK 5 M

Dissolver 490,75 g de acetato de potássio em 900 mL de água destilada. Completar o volume para 1 L com água destilada. Esterilizar por autoclavagem.

Para solução de acetato de potássio 3 M, pH 5,2: dissolver 11,78 g de acetato de potássio em 20 mL de água destilada. Ajustar o pH para 5,2 com ácido acético glacial. Completar o volume com água destilada para 40 mL e esterilizar por autoclavagem.

Acetosiringona 100 mM – AS 100 mM

Dissolver 196,2 mg de acetosiringona em 10 mL de DMSO ou metanol. Conservar em frasco escuro a 4 °C. A solução cristaliza em baixa temperatura, voltando ao estado líquido à temperatura ambiente.

Acetato de sódio 5M (CH₃COONa.3H₂O) 5 M – AcNa5 M

Dissolver 68,04 g de acetato de sódio tri-hidratado em 80 mL de água destilada. Ajustar o pH para 5,2 com ácido acético glacial ou para pH 7,0 com ácido acético

diluído. Completar o volume para 100 mL com água destilada. Esterilizar por autoclavagem.

Para acetato de sódio 3 M, dissolver 40,83 g de acetato de sódio tri-hidratado em 80 mL de água destilada e proceder como descrito acima.

Acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM

Misturar 50 mL de acetonitrila com 50 mL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM.



Acetonitrila é facilmente inflamável, irritante aos olhos, pele, e sistema respiratório. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

Ácido clorídrico (HCl) 2,5 N – HCl 2,5 N

Em um béquer contendo 300 mL de água destilada, adicionar lentamente 104,2 mL de HCl concentrado [37% (p/p) = 11,6 N]. Completar o volume com água destilada para 500 mL em proveta.



Ácido clorídrico é um ácido forte, altamente tóxico e corrosivo. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

Acrilamida: bisacrilamida 49:1, solução 50%

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Acrilamida (sequencing grade)	49 g	49%
Bisacrilamida	1 g	1%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

A solubilização da acrilamida é lenta, portanto, a preparação da solução deve ser realizada sob agitação por algumas horas. Recomenda-se colocar pouco volume inicial de água, aproximadamente 30 mL, adicionando-se o restante da água aos poucos, para não ultrapassar o volume final.



Acrilamida e bisacrilamida são tóxicos e potentes neurotóxicos de efeito cumulativo e podem ser absorvidos pela pele e são. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão. O material polimerizado não possui efeito tóxico, no entanto, o uso de luvas não deve ser dispensado, pois existem resíduos de acrilamida não polimerizada nesse material. Recomenda-se também não submeter soluções de acrilamida/bisacrilamida a forte agitação para evitar efeito aerossol e respingos.

Água DEPC 0,1%

Adicionar DEPC (pirocarbonato de dietila) à água destilada, na concentração final de 0,1% (v/v), agitar vigorosamente a solução e incubar a 37 °C, por, no mínimo, 12 horas. Esterilizar a solução por autoclavagem.



DEPC é considerado provável agente mutagênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas de borracha, óculos e máscara em capela de exaustão.

Bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM

Dissolver 395 mg de bicarbonato de amônio em 100 mL de água bidestilada e conservar à temperatura ambiente.

Brometo de etídio 1% – BrEt 1%

Adicionar 1 g de brometo de etídio a 100 mL de água destilada. Dissolver, com todo cuidado, para evitar respingos, sob agitação, por pelo menos 1 hora. Guardar

em frasco coberto com papel-alumínio ou em vidro opaco, e conservar à temperatura ambiente.



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

Cloreto de cálcio 2,5 M – CaCl₂ 2,5 M

Dissolver 18,37 g de cloreto de cálcio bi-hidratado (CaCl₂·2H₂O) ou 27,38 g de cloreto de cálcio hexa-hidratado (CaCl₂·6H₂O) em 40 mL de água destilada. Completar o volume para 50 mL. Esterilizar por filtração e distribuir alíquotas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Conservar a -20 °C e evitar utilizar frascos abertos.

Cloreto de lítio 4 M – LiCl 4 M

Dissolver 16,95 g de cloreto de lítio em 90 mL de água destilada. Completar o volume para 100 mL com água destilada. Esterilizar por autoclavagem e conservar a 4 °C.

Cloreto de magnésio 1 M – MgCl₂ 1 M

Dissolver 20,33 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂·6H₂O) em 80 mL de água destilada. Ajustar o volume para 100 mL com água destilada. Distribuir em alíquotas de 5 mL e esterilizar por autoclavagem.

MgCl₂ é extremamente higroscópico. Comprar frascos com pequenas quantidades e não conservar frascos abertos por muito tempo.

Cloreto de sódio 5 M – NaCl 5 M

Dissolver 292,2 g de NaCl em 800 mL de água destilada. Completar o volume para 1 L com água destilada. Distribuir em alíquotas de 50 mL e esterilizar por autoclavagem. Conservar à temperatura ambiente.

Clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (v/v)

Misturar 480 mL de clorofórmio e 20 mL de álcool isoamílico.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

DNA de esperma de salmão 10 mg/mL

Dissolver 100 mg de DNA de esperma de salmão em 10 mL de água destilada. Para facilitar a solubilização, dissolver sob agitação com aquecimento. Quebrar o DNA com ultrassom (três vezes, 20 segundos cada vez). Ferver a solução por 10 minutos e estocar a -20 °C em pequenas alíquotas. Antes de usar, ferver a solução por 5 minutos e imediatamente colocar no gelo.

DL-Ditiotreitol 1 M – DTT 1 M

Dissolver 3,09 g de DTT em 20 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 5,2. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 1 mL em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e conservar a -20 °C.



DTT é considerado irritante para vias respiratórias, pele e olhos. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscaras.

EDTA (ácido etileno diamono tetracético)

500 mM, pH 8,0 – EDTA 500 mM

Adicionar 186,1 g de EDTA (sal bi-hidratado dissódico; $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 800 mL de água destilada e homogeneizar vigorosamente sob agitação. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH em pastilhas). O EDTA não irá se solubilizar totalmente até que a solução atinja o pH 8,0. Completar o volume para 1 L e esterilizar por autoclavagem.

Fenol saturado

Aquecer o fenol a 68 °C, em banho-maria, até estar completamente dissolvido. Adicionar 0,1% (p/v) de hidroxiquinoleína. Equilibrar o pH, por meio da adição de 1 volume de Tris-HCl 1 M pH 8,0. Deixar sob agitação e trocar a fase aquosa por Tris-HCl 1 M pH 8,0, até que a fase fenólica apresente o pH entre 7,8 e 8,2. Após equilibrar, guardar sob uma camada de aproximadamente 200 mL de Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, em frasco escuro, a 4 °C, por no máximo 1 mês. Alíquotas conservadas a -20 °C poderão ser estocadas por maior período.



Fenol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimaduras e apresenta risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)

Misturar 480 mL de clorofórmio, 20 mL de álcool isoamílico e 500 mL de fenol equilibrado.



Clorofórmio é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

Gel de agarose 1% com brometo de etídio

Adicionar 2,0 g de agarose em 200 mL de TAE ou TBE 1X e fundir em micro-ondas. Deixar esfriar até aproximadamente 70 °C. Adicionar 1 µL de brometo de etídio 1% (p/v) e misturar suavemente até a completa dissolução do brometo de etídio. Verter ainda morno em uma fôrma de gel com o pente posicionado. Deixar solidificar por aproximadamente meia hora, à temperatura ambiente.



Brometo de etídio é considerado um agente mutagênico, tóxico, possivelmente carcinogênico e teratogênico. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

Hidróxido de sódio 10 N – NaOH 10 N

Adicionar, aos poucos e cuidadosamente, 400 g de pastilhas de NaOH em 800 mL de água destilada, sob agitação suave. Quando as pastilhas estiverem completamente dissolvidas, completar o volume para 1 L com água destilada. Conservar à temperatura ambiente, em recipiente de plástico. Não é necessário esterilizar.

A preparação da solução de NaOH 10 N envolve uma reação altamente exotérmica, que pode acarretar na quebra de frascos de vidro. Dessa maneira, essa solução deve ser preparada, com extremo cuida-

do, em béquer de plástico de alta qualidade e resistente a substâncias corrosivas.



O **hidróxido de sódio** é uma base forte, altamente tóxica e corrosiva. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara.

Mistura (*mix*) equimolar de dNTPs a 10 mM – dNTP mix 10 mM

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
dTTP 100 mM	100 µL	10 mM
dGTP 100 mM	100 µL	10 mM
dCTP 100 mM	100 µL	10 mM
dATP 100 mM	100 µL	10 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 mL	

Completar o volume com água deionizada (ultrapura) e realizar toda a preparação da solução-estoque em fluxo laminar e utilizando luvas. Distribuir em alíquotas de 100 µL em tubos de microcentrífuga de 200 µL, previamente esterilizados em autoclave, e conservar a -20 °C.

Cada dNTP (dTTP; dGTP; dCTP; e dATP) é, em geral, comercializado individualmente a uma concentração de 100 mM.

A partir de 100 µL da solução-estoque, preparar 1 mL de dNTP mix a 1 mM, fazendo uma diluição de 10X, isto é, 100 µL de dNTP mix a 10 mM diluído em 900 µL de água deionizada (ultrapura). Proceder à preparação nas mesmas condições da solução-estoque. Essa solução a 1 mM será a solução de trabalho.

RNase A 10 mg/mL

Dissolver 100 mg de RNase pancreática (RNase A) em 10 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 5,2. Ferver durante 15 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente, sob agitação. Ajustar o pH, adicionando 0,1 volume de Tris-HCl 1M, pH 7,4. Distribuir em alíquotas de 1 mL e conservar a -20 °C.

SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% – SDS 20%

Dissolver 200 g de SDS em um volume de 900 mL de água destilada. Aquecer a solução a 68 °C e homogeneizar, sob agitação, para ajudar a dissolução. Completar o volume para 1 L com água destilada e conservar à temperatura ambiente. Não é necessário esterilizar, e a solução não deve ser autoclavada.



O pó do **SDS** é irritante. Sua manipulação deve ser feita com máscara.

Solução de Denhardt 50X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Albumina de soro bovino (BSA)	1 g	1%
Ficoll tipo 400	1 g	1%
PVP (polivinilpirrolidona)	1 g	1%
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Dissolver os três componentes lentamente, em 50 mL de água destilada. Completar o volume para 100 mL com água destilada e esterilizar por filtração (0,22 µm). Distribuir em alíquotas e conservar a -20 °C.

Tripsina

Dissolver uma alíquota de 20 µg de Tripsina (*sequencing grade*) em 20 µL de tampão de tripsina (ácido acético a 50 mM) e 180 µL de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) a 50 mM. Utilizar imediatamente ou distribuir em alíquotas e conservar a -80 °C. A solução armazenada só poderá ser descongelada uma única vez.

Tampões

HEPES 1 M

Dissolver 26,0 g de HEPES em 80 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,0 com KOH. Completar o volume para 100 mL e esterilizar por filtração.

SSC 20 X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
NaCl	175,3 g	3 M
Citrato de sódio bi-hidratado (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	88,2 g	300 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 7,0 com algumas gotas de HCl 2,5 N e completar o volume para 1 L com água destilada. Esterilizar por autoclavagem e conservar à temperatura ambiente.

SSPE 20 X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
NaCl	175,3 g	3 M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	27,6 g	200 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7,4 g	20 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 7,4 (aproximadamente 6,5 mL de NaOH 10 N) e completar o volume para 1 L com água destilada. Esterilizar por autoclavagem e conservar à temperatura ambiente.

STE

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
NaCl 5M	2 mL	100 mM
Tris HCl 1M, pH 8,0	1 mL	10 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	200 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

Esterilizar por autoclavagem e conservar a 4 °C.

TAE 50X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Tris base	242 g	2 M
Ácido acético glacial	57,1 mL	1 M
EDTA 500 mM, pH 8,0	100 mL	50 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Dissolver primeiramente 242 g de Tris base em 500 mL de água destilada e, em seguida, adicionar o ácido acético glacial e o EDTA. Completar o volume para 1 L com água destilada. O pH do tampão TAE 1X (solução de trabalho) deverá estar em torno de 8,1. Conservar à temperatura ambiente.



Ácido acético é inflamável, corrosivo, irritante para as vias respiratórias e causa queimaduras na pele. Sua manipulação deve ser feita com luvas, óculos e máscara em capela de exaustão.

Tampão de amostra para eletroforese 10X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Ficoll tipo 400	3 g	30%
EDTA 500 mM, pH 8,0	20 µL	1 mM
Azul de bromofenol	25 mg	0,25%
Xilenecianol FF	25 mg	0,25%
H ₂ O	q.s.p. 10 mL	

Ficoll pode ser substituído por glicerol. Usar água DEPC 0,1% (v/v) para géis de RNA. Distribuir em alíquotas e conservar o estoque a -20 °C.

O tampão de amostra 10X deve ser adicionado à amostra imediatamente antes de depositá-la no gel. O azul de bromofenol migra em gel de agarose 2,2 vezes mais rápido do que o xilenecianol, independentemente da concentração da agarose.

Tampão fosfato salina – PBS 10X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Na ₂ HPO ₄	11,4 g	80 mM
KH ₂ PO ₄	2 g	15 mM
NaCl	80 g	1,37 M
KCl	2 g	27 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

Ajustar o pH para 7,4 com HCl e completar o volume para 1 L com água destilada. Esterilizar por autoclavagem e conservar à temperatura ambiente.

Tampão fosfato de sódio 1 M

NaH₂PO₄ 1 M: pesar 138 g de NaH₂PO₄.H₂O e completar o volume para 1 L com água destilada.

Na₂HPO₄ 1 M : pesar 142 g e completar o volume para 1 L com água destilada.

Misturar as duas soluções nas seguintes proporções, em função do pH desejado, para obter 1 L de tampão fosfato de sódio 1 M:

pH	NaH ₂ PO ₄ 1 M (mL)	Na ₂ HPO ₄ 1 M (mL)
6,0	877	123
6,1	850	150
6,2	815	185
6,3	775	225
6,4	735	265
6,5	685	315
6,6	625	375
6,7	565	435
6,8	510	490
6,9	450	550
7,0	390	610
7,1	330	670
7,2	280	720

TBE 5X

Componente	Quantidade	Concentração final (solução-estoque)
Tris base	54 g	445 mM
Ácido bórico	27,5 g	445 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	20 mL	10 mM
H ₂ O	q.s.p. 1 L	

A solução-estoque do tampão TBE pode ser preparada a 5X ou 10X, entretanto, os solutos da solução a 10X precipitam à temperatura ambiente. Completar o volume para 1 L com água destilada. O pH do tampão TBE 1X (solução de trabalho) deverá estar em torno de 8,3. Conservar à temperatura ambiente.

TE (Tris-EDTA), pH 8,0

Componente	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 1M, pH 8,0	1 mL	10 mM
EDTA 500 mM, pH 8,0	200 µL	1 mM
H ₂ O	q.s.p. 100 mL	

O tampão TE também pode ser preparado com pH 7,4 ou 7,6; para tanto, utilizar no preparo do tampão a solução-estoque de Tris-HCl 1 M com pH 7,4 ou 7,6, respectivamente.

Esterilizar por autoclavagem e conservar a 4 °C.

Tris-HCl 1 M

Dissolver 121,1g de Tris base em 800 mL de água destilada. Adicionar o volume apropriado de HCl concentrado [37% (p/p) = 11,6 N] para se obter o pH indicado (a 25 °C):

pH (25 °C)	HCl concentrado (mL)
7,2	76,0
7,4	71,3
7,6	66,0
7,8	56,0
8,0	46,0
8,2	38,0
8,4	28,5
8,6	21,0
8,8	14,0
9,0	8,6

Esperar a solução chegar à temperatura ambiente antes de realizar os ajustes finais do pH. Completar o volume para 1 L com água destilada. Esterilizar por autoclavagem e conservar à temperatura ambiente.

Alguns eletrodos de pH não podem medir com acurácia o pH de soluções contendo Tris. Checar essa informação no manual do eletrodo utilizado.

Apêndice 5

Informações técnicas gerais

O código genético

Os códonos do RNA (trincas de bases nitrogenadas) são lidos na direção 5' → 3'. Desses códonos, 61 codificam os 20 tipos diferentes de aminoácidos existentes. Os três

códonos de terminação (*Stop*) não codificam nenhum aminoácido e estão destacados em itálico e azul. O códon de iniciação (AUG) está destacado em itálico e vermelho (*Met*).

		2ª posição					
		U	C	A	G		
1ª posição	U	UUU	UCU } UCC } UCA } UCG }	UAU	UGU } UGC }	U	
		UUC		UAC		C	
		UUA	Leu	Tyr	UGA } UGG }	A	
		UUG				UAA } UAG }	G
	C	CUU	CCU } CCC }	CAU	CGU } CGC }	U	
		CUC		CAC		C	
		CUA	Leu	Pro	CGA } CGG }	A	
		CUG				CAA } CAG }	G
	A	AUU	ACU } ACC }	AAU	AGU } AGC }	U	
		AUC		AAC		C	
		AUA	Ile	Thr	AGA } AGG }	A	
		<i>AUG</i>				AAA } AAG }	G
	G	GUU	GCU } GCC }	GAU	GGU } GGC }	U	
		GUC		GAC		C	
		GUA	Val	Ala	GGA } GGG }	A	
		GUG				GAA } GAG }	G

Abreviação dos aminoácidos e massa molecular

Aminoácido	Abreviatura de 3 letras	Símbolo de 1 letra	Massa molecular (Da)
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutâmico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptofano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117

Código de ambiguidade de nucleotídeos da IUPAC

Base	Significado	Código IUPAC
Deoxiadenina	<i>Adenine</i>	A
Deoxi-citosina	<i>Cytosine</i>	C
Deoxi-guanidina	<i>Guanine</i>	G
Deoxi-timidina	<i>Thymine</i>	T
Deoxiuracil	<i>Uracil</i>	U
Deoxiinosina	<i>Inosine</i>	I
A ou C ou G ou T	<i>aNy</i>	N
A ou C ou G	não T/U	V
A ou T/U ou G	não C	D
T/U ou C ou G	não A	B
A ou T/U ou C	não G	H
A ou T/U	<i>Weak interaction</i>	W
C ou G	<i>Strong interaction</i>	S
T/U ou G	<i>Ketogroup</i>	K
A ou C	<i>aMinogroup</i>	M
C ou T/U	<i>pYrimidine</i>	Y
A ou G	<i>puRine</i>	R
“.” ou “-”	<i>gap</i>	

O código da União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*) é uma nomenclatura para ácidos nucleicos ambíguos.

Prefixos do Sistema Internacional de Unidades (SI) ou prefixos métricos

Fator	Prefixo	Símbolo	Escala curta	Equivalente decimal
10^{24}	iota	Y	Septilhão	1 000 000 000 000 000 000 000 000
10^{21}	zeta	Z	Sextilhão	1 000 000 000 000 000 000 000
10^{18}	exa	E	Quintilhão	1 000 000 000 000 000 000
10^{15}	peta	P	Quadrilhão	1 000 000 000 000 000
10^{12}	tera	T	Trilhão	1 000 000 000 000
10^9	giga	G	Bilhão	1 000 000 000
10^6	mega	M	Milhão	1 000 000
10^3	quilo	k	Milhar	1 000
10^2	hecto	h	Centena	100
10^1	deca	da	Dezena	10
10^0	nenhum	nenhum	Unidade	1
10^{-1}	deci	d	Décimo	0,1
10^{-2}	centi	c	Centésimo	0,01
10^{-3}	mili	m	Milésimo	0,001
10^{-6}	micro	μ	Milionésimo	0,000 001
10^{-9}	nano	n	Bilionésimo	0,000 000 001
10^{-12}	pico	p	Trilionésimo	0,000 000 000 001
10^{-15}	fento	f	Quadrilionésimo	0,000 000 000 000 001
10^{-18}	ato	a	Quintilionésimo	0,000 000 000 000 000 001
10^{-21}	zepto	z	Sextilionésimo	0,000 000 000 000 000 000 001
10^{-24}	iocto	y	Septilionésimo	0,000 000 000 000 000 000 000 001

Cálculo da quantidade de oligonucleotídeo (*primer*):

- Conversão para quantidade absoluta (em pmol):

$$\text{oligonucleotídeo em pmol} = \frac{\text{massa em } \mu\text{g} \times 1.000.000}{\text{tamanho (oligomer)} \times 327}$$

Por exemplo: 0,1 μg de um oligonucleotídeo 20-oligomer:

$$\frac{0,1 \times 1.000.000}{20 \times 327} = 15,3 \text{ pmol de oligonucleotídeo}$$

- Conversão para massa (em μg):

$$\text{massa em } \mu\text{g} = \frac{\text{pmol} \times \text{tamanho (oligomer)} \times 327}{1.000.000}$$

Por exemplo: 10 pmol de um oligonucleotídeo 25-oligomer:

$$\frac{10 \times 25 \times 327}{1.000.000} = 0,081 \mu\text{g de oligonucleotídeo}$$

Concentração de oligonucleotídeo (*primer*) em micromolar (μM) ou pmol/ μL :

10 μM de oligonucleotídeo = 10 pmol/ μL

Por exemplo: 20 pmoles de um oligonucleotídeo em 100 μL = a uma concentração de 0,20 μM

Conversão da concentração de uma solução em molaridade para porcentagem:

$$\% = g \times M \times 0,1$$

em que:

M = concentração da solução em molar (M).

g = massa ou peso molecular (PM) do soluto expressa em gramas (g).

Por exemplo: expressar a solução de NaCl 2,5 M (PM = 58,44) em porcentagem:

$58,44 \times 2,5 \times 0,1 = 14,6\%$ é a concentração de NaCl em uma solução 2,5 M.

Apêndice 6

Abreviaturas

A_{260} = absorvância a 260 nm

Ac = Acetato

Acetosiringona = 4'-hidroxi-3', 5'-dimetoxiacetofenona

Álcool isoamílico = 3-metil-1-butano

ATP = adenosina trifosfato

Azul de bromofenol = 3', 3'', 5', 5'' - tetrabromofenol-
-sulfonaftaleína

BAP = 6-benzilaminopurina

Bisacrilamida = N,N'-metileno-bis-acrilamida

BrEt = brometo de etídio

BSA = albumina de soro bovino

c.v. = cultivar

CaMV = vírus do mosaico do couve-flor

cDNA = DNA complementar

cpm = contagem por minuto

CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio

DAPI = dihidroclorato de 4,6-diamidino-2-fenilindol

dATP = desoxiadenosina trifosfato

Da = Daltons

dCTP = desoxicitosina trifosfato

DEPC = pirocarbonato de dietila

dGTP = desoxiguanosina trifosfato

DMSO = dimetil sulfóxido

2-DE = eletroforese bidimensional em gel

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNase = desoxirribonuclease

dNTP = desoxinucleotídeo trifosfato

DTT = DL-ditiotreitol

dTTP= desoxitimidina trifosfato

EC = código da enzima (*enzyme code*)

EDTA = ácido etileno diamono tetracético

ELISA = imunoenensaio enzimático de fase sólida (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

FDA = diacetato de fluoresceína

FISH = hibridização in situ por fluorescência

HEPES = ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano-
sulfônico

HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho

IgG = imunoglobulina G

Inositol = ciclo-hexano-1,2,3,4,5,6-hexol

kb = quilo pares de base

KVh = quilovolt hora

MES = ácido 2 (N-morfolino) etanosulfônico

MOPS = ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico

MS = espectrometria de massa

mRNA = RNA mensageiro

MU = 4-metilumbeliferona

MUG = 4-metilumbeliferil β -D-glucuronídeo

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

pb = pares de base

PCR = reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PEG = polietilenoglicol

PMSF = fenilmetil sulfonil fluorídio

pNPP = p-Nitrofenil fosfato

ppm = partes por milhão (1 mg/L ou 1 μ L/L)

psi = libras por polegada quadrada

p/v = peso por volume

PVC = cloreto de polivinil

PVP = polivinilpirrolidona

q.s.p. = quantidade suficiente para

RNA = ácido ribonucleico

RNAse = ribonuclease

rpm = rotação por minuto

RT = transcrição reversa

S = Svedberg

Sarcosil = N-lauroilsarcosina

SDS = dodecil sulfato de sódio

siRNA = pequenos fragmentos de RNA interferentes

Taq = *Thermus aquaticus*

TE = Tris-EDTA

TEMED = N', N', N', N', tetrametil-etileno diamina

Tm = temperatura de desnaturação

Tris = tris-(hidroximetil)-aminometano

U = unidade

UFC = unidades formadoras de colônias

UV = radiação ultravioleta

Vermelho-Ponceau S = ácido 3-hidroxi-4-(2-sulfo-4-[4-sulfo-fenilazo]fenilazo)-2,7-naftaleno dissulfônico, sal de sódio

v/v = volume por volume

X-Gluc = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo

Índice

A

Acetato

Amônio 167, 168, 379, 380, 422

Polivinila 351,

Potássio 67, 68, 168, 175, 422

Sódio 44, 49, 50, 77, 167, 168, 169, 172, 174, 175, 219, 266, 267, 268, 271, 313, 314, 317, 320, 422, 423, 424, 426

Uranila 352, 353, 354, 356

Acetohidroxiacido sintase (AHAS) 103

Acetosiringona 116, 118, 125, 140, 141, 144, 422, 438

Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 395, 396, 397, 401, 402

Ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona (MU) 153, 154, 155, 156, 157, 439

Acrilamida 273, 274, 366, 367, 368, 386, 387, 388, 423

Aduetos 398, 399

[$\alpha^{32}\text{P}$] 200, 203, 204, 205, 206,

[$\alpha^{33}\text{P}$] 200, 203, 206

Agente desnaturante 263

Agente

Quelante 166, 205,

Seletivo 58, 83, 84, 85, 103, 110, 111, 114, 118, 120, 122, 129

Agrobacterium

radiobacter 27, 38

rhizogenes 27, 28, 29, 38, 56, 58, 63, 71, 342, 408, 410

rubi 27, 38

sp. 56, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 69, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 115, 117, 121, 124, 125, 127, 128,

138, 140, 141, 142, 143, 144, 160

spp. 21, 22, 24, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 67, 68, 69, 91, 105, 106, 108, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 124, 125, 128, 129, 130, 135, 136, 137, 138, 141, 145, 153, 227, 418

tumefaciens 17, 23, 27, 28, 29, 37, 38, 56, 58, 63, 70, 71, 74, 104, 131, 132, 133, 146, 149, 159, 196, 410

vitis 27

Agroinfiltração 117, 137, 140, 143

Agroinoculação 117, 138, 140, 143, 144

AHAS *ver* Acetohidroxiacido sintase

Albumina de soro bovino 166, 167, 192, 205, 251, 252, 264, 276, 318, 336, 339, 355, 356, 357, 363, 365, 373, 426, 438

Aldose 125

Algodão *ver Gossypium hirsutum*

Amostra calibradora 290, 296, 297

Amplicon 284, 286, 289, 294, 298, 299, 300, 302

Análise de íons por tempo de voo (TOF) 394

Antibiótico

Controle de eficiência 46, 84

Descontaminante 106, 109

Resistência 32, 41, 56, 57, 59

Soluções-estoque 31, 62, 64, 66, 126

Tolerância 41

Anticorpo

Antibiotina 201

Antidigoxigenina 201, 211, 212, 213, 251, 252, 253, 307

Antígeno

Complexo 345, 357, 362, 363

Detecção 344, 345, 357

Ligação 336

Purificados 340

Semipurificados 340

Solúvel 330

Arabidopsis thaliana 16, 37, 42, 85, 91, 104, 110, 125, 126, 127, 130, 131, 132, 197, 217, 327, 338, 360

Arroz *ver Oryza sativa*

Autorradiografia 216, 220, 226, 363

Autorradiograma 265

Avidina 201, 213, 234, 252, 253

Azul de coomassie (CBB) 365, 366, 368, 371, 379, 388

Azul de toluidina 346, 352, 354

Azul nitro de tetrazólio (NBT) 201, 211, 212, 307, 317, 318, 319, 323, 324, 327, 374, 375

B

Bactéria

Cultura 32, 64, 66, 67, 68, 121

Suspensão 31, 34, 45, 46, 47, 49, 112, 113, 121, 128, 141

b-D-galactosidase 25

b-galactosidase 149, 330, 331

β -glucuronidase (GUS) 82, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 162, 163, 164, 192, 227

b-mercaptoetanol 157, 167, 168, 170, 172, 173, 174, 208, 335, 364, 367

BCIP *ver* fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil

Biobalística

Equipamento 101

Biotina-estreptoavidina 265

Biovar 27, 28, 32, 33

Bisacrilamida 273, 366, 367, 368, 386, 423, 438

BMM *ver* butil metil metacrilato

Bombardeamento 17, 90, 95, 97, 98, 101, 102, 103, 187

Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173

Brometo de etídio 51, 52, 168, 178, 184, 187, 190, 191, 219, 221, 271, 272, 273, 292, 423, 424, 425, 438

Brotações-escape 84

BSA *ver* albumina de soro bovino

Butil metil metacrilato (BMM) 305, 311, 312

C

Cacodilato de sódio 347, 348

Câmara de alta pressão 99, 100

Canamicina 25, 41, 58, 62, 83, 84, 103, 109, 114, 129, 144, 418

CBB *ver* azul de coomassie

cDNA 140, 235, 262, 263, 284, 289, 291, 292, 293, 294, 298, 300, 306, 315, 326, 438

Cefotaxima 109, 111, 113, 114, 115, 118, 122, 123, 418

Células competentes 24, 45, 46, 47, 48, 60, 62, 64, 65, 66, 106

Celulase 78, 237, 242

CHCA *ver* ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

Choque térmico (*freeze-thaw*) 45, 46, 60, 61, 62, 66

Cianocinamatos 395

- Cinética de reassociação 265
- Citogenética 234, 258
- Citohelicase (*Helix pomatica*) 242
- Citólise 74
- Cloranfenicol 50, 149, 418, 419
- Cloreto de lítio (LiCl) 263, 266, 267, 268, 424
- Cocultura
 - Líquida 122
 - Sólida 122, 124,
- Coeficiente
 - Correlação (R2) 288, 289
 - Determinação (R2) 156
 - Variação (R2) 296, 340
- Conjugação
 - Triparental 60, 61, 62, 63
- Conservação de culturas
 - Longo prazo 34
 - Médio prazo (método *stab*) 33
- Coomassie brilliant blue* ver azul de coomasie
- Cromossomos
 - Artificiais 176
 - Desnaturação 250
 - Endógeno 234
 - Exógeno 234
 - Fixação 245
 - Isolamento 242
 - Meiótico 235, 258
 - Metafásico 235, 254, 258
 - Mitótico 237
 - Paquitênico 242, 243, 244, 245, 254
 - Pareado 245
 - Pré-metafásico 240
 - Preparação 237, 241
 - Preservação 246
- Crown gall* ver galha-da-coroa
- CTAB ver brometo de cetiltrimetilamônio
- Curva-padrão
 - Estabelecimento 293
 - Seriada 296
- Cycle threshold* (Ct) 286, 287
- D**
- DAN ver diaminonaftaleno
- DAPI ver diidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindole
- Denhardt, Solução de 218, 224, 264, 276, 322, 426
- Deoxyribonuclease ver DNase
- DEPC ver dietil pirocarbonato
- Depurinação 222
- Descontaminação 106, 117, 122
- Deslocamento do corte (*nick translation*) 201, 202, 203, 209, 211
- Desnaturação 182, 183, 185, 186, 191, 196, 205, 206, 221, 222, 225, 250, 262, 264, 292, 299, 300, 306, 439
- Diaminonaftaleno (DAN) 399, 401
- Dietil pirocarbonato (DEPC) 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 276, 279, 280, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 316, 317, 319, 320, 321, 322, 324, 422, 423, 428, 438

DIG-anti-DIG *ver* digoxigenina-antidigoxigenina

Digoxigenina 200, 201, 203, 204, 208, 209, 210, 211, 212, 218, 234, 252, 253, 265, 304, 306, 307, 313, 314, 315, 318, 322, 323, 324

Digoxigenina-antidigoxigenina (DIG-antiDIG) 265

Dihidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindol 237

Dimetilformamida 151, 317, 374

Disco foliar 106, 111, 154

DNA

Carreador 75, 76, 77, 80, 82

Cromossomal 44, 50

Esperma de salmão 75, 218, 224, 264, 276, 277, 280, 424

Degradação 166, 178

Desnaturação 182, 183, 185, 250

Exógeno 17, 24, 26, 91, 136, 166, 216, 218, 227

Extração 60, 65, 67, 68, 166, 167, 168, 169, 171, 176, 177, 188, 217

Genômico 42, 178, 180, 184, 187, 188, 189, 190, 193, 194, 195, 203, 209, 235, 289, 293, 294

Isolamento 35, 44, 166

Linear *ver* DNA cromossomal

Quantificação 178, 179, 188

Ressuspensão 172, 174, 176

DNA plasmidial

Isolamento 35, 44, 166

Miniextração 67

Perfil de restrição 51

DNA-molde 201, 203, 205, 208, 209, 210, 211

DNAse

Livre de RNAse 291, 313, 316

Tratamento 291

dNTPs 69, 184, 187, 190, 191, 193, 195, 201, 203, 204, 205, 206, 208, 209, 210, 291, 294, 295, 426

2-DE *ver* eletroforese bidimensional de proteínas

Dot blot 204, 211, 212, 213, 317, 318

Dowex XG-8 271

Duplamente carregados 398, 399

E

Eficiência de transformação 18, 31, 44, 61, 65, 66, 75, 76, 81, 97, 106, 113, 114, 116, 121, 124, 125, 129

Eixo embrionário 92, 103

Eletroforese

Bidimensional 378, 382, 395, 397, 400, 438

Bidimensional de proteínas (2-DE) 378, 400

Gel de agarose 70, 77, 178, 184, 187, 188, 194, 196, 216, 219, 220, 263, 292, 316, 361

Gel desnaturante 265, 270

Unidimensional 395

Eletrotransferência

Molhada 370

Semiseca 223, 369

Eletroporação 17, 41, 44, 45, 47, 48, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 85

Eletroporador 47, 61, 63, 64, 75, 80, 81

ELISA

Direta 330, 332, 333, 338

Indireta 330, 331, 332, 333, 335, 339
Sanduíche 330, 332, 333, 334, 339

Embriogênico
Calo 103, 106, 119, 120, 124
Célula 124
Tecido 122
Unidade 110, 117, 119, 120, 121, 123, 124
Unidade globular 120, 122, 123

Ensaio
Espectrofotométrico 148, 158
Fluorimétrico 148, 149, 153, 158, 331
Histoquímico 148, 149, 151, 152, 153

Enzima
Pectocelulolítica 74, 82
Restrição 26, 40, 42, 44, 97, 167, 168, 180, 189, 216, 217, 220, 227, 314, 315

Epiderme abaxial 79

Epifluorescência 201, 234, 235, 237, 240, 243, 244, 245, 254, 257, 258, 345

Escherichia
coli 22, 23, 25, 30, 45, 47, 59, 145, 148, 149, 182, 418
Mobilização (*mob*) 59
Transferência (*tra*) 59

Espectrofotômetro 33, 45, 46, 47, 49, 68, 111, 113, 117, 125, 128, 140, 141, 144, 178, 179, 180, 336

Espectrometria de massa (MS) 378, 379, 382, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 398, 399, 400, 401, 402, 404

Espermidina 95, 96, 97

Estreptavidina 211, 212, 213, 253

Estringência 25, 188, 218, 225, 251, 264, 265, 278, 306, 324

Ettan ipgphor 3 383, 385

Explante 74, 102, 106, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 124, 125, 153, 414, 415

Expressão transiente 75, 76, 81, 82, 117, 136, 137, 138, 140, 143, 152, 160, 331, 360

F

FAA *ver* formalina:ácido acético glacial:álcool etílico

Fase exponencial 23, 31, 33, 34, 49, 68, 112, 113, 128, 284, 286, 287

FAT *ver* transformação, Frequência absoluta

Feijão *ver Phaseolus vulgaris*

FDA *ver* fluoresceína

Fenol 67, 68, 167, 179, 185, 195, 242, 263, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 313, 314, 379, 380, 425

Filme de raios X 224, 226, 278

FISH *ver* hibridização in situ por fluorescência

Fita-molde (*template*) 182, 284, 286, 289, 292, 294, 295, 296, 297, 298

FITC *ver* fluoresceína

Fitoeno desaturase (*pds*) 140, 143, 144

Fluoresceína 218, 304, 307
Diacetato de (FDA) 74, 81, 438
Isotiocianato de (FITC) 200, 253

Fluorescência
Basal 286
Detecção 286
GFP 140, 142, 143, 150, 158, 159, 160, 161, 162
Intensidade 150, 159, 286

Fluoreto de polivinilideno (PVDF) 372
Fluorímetro
 Calibração 155, 156, 157
 Leitura 156
 Modelo 155, 157
Fluorocromos 218, 253, 257, 307
Fluoróforo 159, 200, 201, 234, 235, 252, 253, 256, 257, 284,
285, 286, 294, 295, 298, 299, 300, 304, 307, 344
Focalização isoeletrica 381, 383, 384, 385
Formaldeído 246, 247, 248, 263, 271, 272, 309, 311, 312,
319, 321, 347, 351
Formalina:ácido acético glacial:álcool etílico 305, 309
Formamida 185, 218, 248, 250, 251, 264, 271, 272, 276, 277,
279, 280, 306, 313, 317, 322
Fosfatase alcalina 200, 201, 202, 204, 211, 212, 213, 304,
307, 330, 331, 335, 338, 339, 340, 341, 363, 373, 374, 375
Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) 201, 211, 212,
307, 317, 318, 319, 323, 324, 374, 375
Fragmentação de peptídeos 394, 395, 404
Fragmento foliar 106, 107, 109, 112, 113, 114, 115
Freeze-thaw ver choque térmico
FRT ver transformação, Frequência
Fumo ver *Nicotiana tabacum*

G

Galha-da-coroa 27, 28, 29, 56
 $\gamma^{32}\text{P}$ 149, 200, 204, 20
Gás hélio 98, 99, 100, 101
Geiger

Contador 204, 207, 224, 225, 226, 277, 278, 352

Gel

Agarose 51, 68, 69, 70, 77, 178, 184, 187, 188, 189,
190, 191, 194, 195, 196, 208, 209, 216, 217, 219, 220,
221, 263, 272, 279, 292, 313, 316, 317, 361, 425, 428
Poliacrilamida 360, 361, 362, 363, 365, 366, 371, 439

Gel de proteínas

Digestão 389

Gene

Interesse (GI) 16, 17, 18, 22, 40, 41, 43, 56, 59, 60, 75,
97, 103, 125, 137, 139, 142, 143, 289, 290, 291, 294,
295, 296, 297, 298
Referência (GR) 290, 291, 293, 294, 295, 296, 297, 298,
299
Repórter 22, 75, 82, 83, 109, 115, 122, 145, 148, 149,
150, 159, 305

GFP ver proteína verde fluorescente

Glicerol 34, 47, 48, 63, 64, 66, 95, 96, 118, 121, 217, 273, 325,
367, 387, 428

Glucoamilase 330

Glutaraldeído 305, 309, 312, 322, 340, 341, 347, 371

Glycine max (soja) 16, 19, 42, 91, 92, 93, 97, 98, 101, 102, 103,
187, 192, 344, 350, 360, 401

Gossypium hirsutum (algodão) 16, 91, 94, 95, 97, 98, 101,
102, 103

GUS ver β -glucuronidase

H

Hapteno 200, 201, 203, 304

Helix pomatica ver citohelicase

Hemacitômetro 80

Hibridização

Cinética 218

in situ (ISH) 200, 234, 236, 241, 245, 250, 257, 304, 305, 307, 323

in situ por fluorescência (FISH) 200, 203, 204, 208, 209, 210, 211, 213, 234, 235, 236, 237, 241, 248, 249, 253, 255, 258, 304, 438

Membranas 204, 207, 277

Hidrólise da sonda 316

Higromicina 41, 103, 109, 114, 124, 129

Hipoclorito de sódio 77, 78, 79, 84, 92, 94, 111, 113, 118, 119

Hot start 185, 294, 295

I

Imazapyr 91, 101, 102, 103

Imersão dos botões florais 125, 128, 130

Imidazolinona 41, 91

Immunoblot 360

Imônios 402, 404

Imunocitoquímica 305, 307, 344, 345, 346, 347, 349, 350, 354, 355, 357

Imunodeteção 344, 345, 363

Imunoensaios 330, 340, 378

Imuno-histoquímica 344

Imunolocalização 305

Infiltração 117, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 305, 306, 311, 349

Iniciador (*primer*)

Anelamento 182, 183, 185

Composição de GC 185, 264

Degenerado 193, 194, 195

Desenho 185, 297

Eficiência de amplificação 296

Formação de dímeros 185, 298

Randômico 188, 201, 202, 208, 210

Tamanho 185, 298

Ionização 379, 392, 394, 395, 396, 397, 401, 402

Íons da série *b* 405

Íons da série *y* 401, 404, 405

iPCR *ver* reação da polimerase em cadeia inversa

ISH *ver* hibridização in situ

Isotiocianato de guanidina 263, 265, 268, 269, 270, 272

L

Laranja de acridina 306, 307, 320, 321, 322

LiCl *ver* cloreto de lítio

LIFT™ 399, 400, 402, 404

Limite de resolução 345

Linha de base 286, 287

Linhagem

Desarmada 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 67, 106, 107, 108, 111, 112, 117, 121, 125

Doadora 60, 61, 62

Helper 60, 61, 62

Receptora 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67

Recombinante 57, 59, 60

Lise alcalina 44

Lisozima 25, 49, 50, 67, 68

M

MALDI 390, 394, 395, 396, 397, 399

MALDI-TOF 395, 396, 399, 400, 401, 402

Massa média 393, 402

Massa monoisotópica 393, 402, 404

Matriz 177, 305, 361, 362, 389, 390, 394, 396, 397, 399, 401, 402

Meio LB 32, 45, 46, 47, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 112, 113, 121, 125, 128, 141, 408

Melting temperature ver Temperatura de desnaturação (T_m)

Membrana

Carreadora 95, 98, 99, 100, 101

Nitrocelulose 216, 224, 360, 361, 369, 371, 372

Ruptura 98

Transportadora 96

MET ver microscopia eletrônica de transmissão

Metáfase 238, 240, 241

Método

Bradford 335, 363, 364, 365, 381

CTAB 168, 169, 171

$\Delta\Delta Cq$ 296, 297

Dellaporta 166, 168, 174

PMF 393, 404

stab ver Conservação de culturas a médio prazo

MEV ver microscopia eletrônica de varredura

Micropartícula

Acelerador 98, 99

MicroRNA 18, 43

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 345, 346, 350, 351, 353, 354, 355, 356

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 345

Microscópio confocal de fluorescência 159, 160

Microsporócitos 241, 243, 244

Molecular beacon 286

Molécula-sinal 29, 106, 109, 116

Monocarregado 398

MOPS 78, 153, 271, 272, 438

mRNA ver RNA mensageiro

MU ver ácido glucurônico e 4-metilumbeliferona

MUG ver 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo

Multiphor II 381, 382, 383, 384

N

NBT ver azul nitro de tetrazólio

Neomicina fosfotransferase II (NPTII) 149, 227

Nick translation ver deslocamento do corte

Nicotiana

benthamiana 137, 139, 140, 142, 143, 144, 159, 360

tabacum 16, 77, 78, 79, 85, 106, 111, 115, 220, 370

Nitrato de prata 378

Northern blot 200, 204, 262, 274, 276, 277, 279, 280, 281, 360

Northern reverso 262

NPTII ver neomicina fosfotransferase II

Nucleotídeos biotinilados 234

O

8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 238

Oligonucleotídeo 69, 74, 77, 179, 182, 183, 188, 204, 205, 207, 209, 210, 235, 262, 264, 277, 285, 286, 289, 291, 293, 298, 436

Oncogenes 28, 29, 56, 57, 106

Organosilano 305, 308

Oryza sativa 16, 43, 110, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 125, 360, 400

Ouro coloidal 344, 346, 350, 355, 356

P

Paquíteno 241, 243, 244, 245, 258

Parafina 117, 119, 122, 126, 305, 308, 309, 310, 311, 325

Paraformaldeído 248, 305, 309, 347, 348

Paromomicina 83

Partículas eletrondensas 344

PCR *ver* reação da polimerase em cadeia

pds *ver* fitoeno desaturase

Pectoliase 242

PEG *ver* polietilenoglicol

Penicilinase 330

Peroxidase 167, 307, 330, 331, 340, 363, 373, 374, 375

Phaseolus vulgaris 19, 91, 92, 93, 97, 98, 101, 102, 103, 192, 243, 244, 245, 360, 361

Phospho imaging plate *ver* placa de armazenamento de fósforo

Placa de armazenamento de fósforo 226, 278

Planta quimérica 108

Planta-modelo 110, 111

p-nitrofenil- β -D-glucuronídeo 158

Plasmídeo

Amplificação 43

Bacteriano 22, 40, 41, 43, 149

Detecção 69

Helper 60, 61

Isolamento 43, 44, 45, 49

Linearização 314, 316, 317

Mobilização 60

Purificação 43, 50

Transferência 60

Tumor inducing (Ti) 28, 29, 33, 35, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 106, 108

Plasmólise 74, 122

PNPG *ver* p-nitrofenil- β -D-glucuronídeo

Poli(etilenoglicol) (PEG) 74, 76, 218, 357, 439

Poli-L-lisina 305, 307, 308, 309, 311

Polimerase

DNA 180, 182, 183, 184, 186, 201, 203, 204, 210, 216

RNA 25, 138, 306, 314, 315, 316

Taq 69, 187, 191, 285, 294

Taq DNA 69, 182, 183, 190, 193, 195, 286, 294, 295

Polivinilpirrolidona (PVP) 153, 166, 167, 264, 364, 426, 439

Potato virus X (PVX) 138, 140, 142, 143

Pré-hibridização 218, 224, 225, 247, 264, 276, 277, 278, 280, 281, 306, 319, 322

Pré-inóculo 64, 66, 128

Promotor 35ScaMV 42, 43, 138

Proofreading 183

Proteína

Heteróloga 136, 137, 138, 139, 140, 145

Verde fluorescente 142, 143, 150, 158, 159, 160, 161, 162

Proteinase K 306, 320, 322

Proteômica

Análise 378, 379, 382

Aplicações 392, 393

Próton

Mobilidade 395

Transferência 402

Protoplasto

Análise da expressão transiente em gente repórteres 74

Cultura 82, 83

Eficiência de transformação 75

Eletroporação 17, 41, 45, 75, 76, 77

Isolamento 77, 79

Obtenção 74

Purificação 79

Regeneração 83, 85

Transformação 75, 77, 136

PVDF *ver* fluoreto de polivinilideno

PVP *ver* polivinilpirrolidona

PVX *ver* potato virus

Q

qPCR *ver* reação da polimerase em cadeia quantitativa

Quantificação

Absoluta 288, 289, 290, 298

Relativa 290, 291, 293, 296

4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG) 153, 154, 158, 439

Quelante

EDTA 375

Fluoróforo 285, 286

R

Radioisótopo 200, 218, 234, 344, 363

Raízes-em-cabeleira (*hairy root*) 27, 56

Random primer *ver* iniciadores randômicos

Razão A_{260}/A_{280} 268

Reação colorimétrica 265, 304, 360

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Curva de amplificação 284, 286

Eficiência da reação 286

Inversa (iPCR) 184, 188, 189, 194, 195

Número de ciclos 284

Parâmetros 184

Quantitativa (qPCR) 144, 262, 284, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 295, 296, 297, 299, 300, 301

Thermal asymmetric interlaced (TAIL-PCR) 188, 189, 193

Transcrição reversa (RT-PCR) 184, 292, 293

Transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) 262, 290

Região

Meristemática 92, 93, 95, 98, 103, 239

Vir 29, 58, 110, 112, 120, 128

Rifampicina 58, 63, 144, 418, 419

RNA

Interferente (siRNA) 18, 43, 262, 266, 268, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 331, 439

Mensageiro (mRNA) 262, 274, 284, 293, 304, 307

RNAse

A 67, 167, 170, 172, 247, 306, 426

Contaminação 293

H 292

Inibidor 291, 292, 313

Rodamina 218, 253, 304, 307

ROX 295

RT-PCR *ver* reação da polimerase em cadeia com transcrição reversa

S

SDS-PAGE 386

Seleção

Agente 83, 107, 108, 109, 113, 114, 115, 122, 123, 129

Marcador 22, 32, 35, 75, 97, 103, 107, 108, 114

Meio 84, 85, 102, 122

Pressão 32, 108

Sephadex-G25 207, 208, 341

Silenciamento gênico

Induzido por vírus (VIGS) 18, 139, 140

Supressor 137, 138, 140, 141, 142, 143

Transcricional 18

Vetor 43, 44

siRNA *ver* RNA interferente

Sítios de restrição 217, 227

Soja *ver Glycine max*

Solução de bloqueio 355, 356, 371, 373, 374

Sonda

Fluorogênica 284, 286

Marcação de 200, 201, 202, 203, 207, 211

Não isotópica 262

Não radioativa 200, 201, 204, 218, 234, 265, 266, 275, 279, 304

Radioativa 262, 263, 265, 266, 274, 275, 276

Southern blot 103, 191, 200, 216, 218, 220, 222, 223, 227, 228, 229, 231, 262

Squash blot 169

Substrato cromogênico 265, 374, 375

Sulfato de dextrano 218, 322

T

TAIL-PCR *ver* reação da polimerase em cadeia *thermal asymmetric interlaced*

T4 polinucleotídeo quinase 201, 202, 203, 204, 207

T-DNA

Extremidades 56, 59, 138

Tela de retenção 98, 99, 100, 101

Temperatura

Alongamento 186

Anelamento 186, 187, 188, 191, 196, 302, 296
Desnaturação (Tm) 182, 185, 186, 191, 196, 250, 264,
299, 306

Template ver fita-molde

Termociclador 69, 70, 190, 191, 193, 194, 195, 196, 286, 294

Timentina 118, 122, 123, 418

Tobacco mosaic virus (TMV) 138

Tobacco rattle virus (TRV) 139, 140, 143, 144, 145,

TOF ver análise de íons por tempo de voo

Transcrição reversa 262, 284

Transcriptase reversa 184, 291, 292, 293

Transformação

Direta 17, 22, 35, 40, 44, 60

in planta 110, 111, 129

Eficiência 18, 31, 44, 61, 65, 66, 75, 76, 81, 97, 106,
113, 114, 116, 121, 124, 125, 129

Frequência absoluta (FAT) 75, 76

Frequência relativa de (FRT) 75

Protocolo 91, 120, 127, 273, 372

Trietanolamina 306

Tungstênio 90, 95, 344

U

Ultramicrotomia 351, 353, 354, 355

Urease 330

UV crosslinker 223, 319

V

Vermelho-Ponceau 369

Vetor

Binário 35, 56, 57, 59, 60, 61, 63, 67, 124, 125, 128,
138, 140, 141, 227

Cointegrado 56, 57, 58, 59, 60

Intermediário 35, 57, 59, 60, 61

Viral 137, 138, 139, 140, 142, 143

VIGS ver silenciamento gênico induzido por vírus

W

Western blot 103, 142, 360, 361, 362, 363, 368, 374

Wholemout 304, 305, 307

X

X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) 151,
153, 439

Z

Zeta-probe 369, 372



Na Livraria Embrapa, você encontra
livros e e-books sobre agricultura, pecuária,
negócio agrícola, etc.

Para fazer seu pedido, acesse:
www.embrapa.br/livraria

ou entre em contato conosco
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
livraria@embrapa.br

Você pode também nos encontrar nas redes sociais:

 facebook.com/livrariaembrapa

 twitter.com/livrariaembrapa

Impressão e acabamento
Embrapa Informação Tecnológica

O papel utilizado nesta publicação foi produzido conforme a certificação
do Bureau Veritas Quality International (BVQI) de Manejo Florestal.



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Diversas ferramentas biotecnológicas podem ser utilizadas no melhoramento genético de plantas. A transformação genética, por exemplo, evoluiu rapidamente nas últimas décadas e está presente, efetivamente, no cenário da produção agrícola de vários cultivos. Além disso, na pesquisa básica, vem contribuindo para uma melhor compreensão do papel de genes no sistema vegetal.

Para responder à demanda de profissionais e estudantes, oferecemos à comunidade técnico-científica a segunda edição do *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Nela, os protocolos apresentados na primeira edição foram revisados, e novas técnicas utilizadas na caracterização de plantas geneticamente modificadas foram incluídas.

O *Manual* descreve as principais etapas de clonagem e introdução de genes nas plantas, assim como a caracterização de sua introdução e integração no genoma vegetal, descrevendo os principais métodos adotados atualmente. São também apresentadas técnicas que permitem monitorar a transcrição dos genes introduzidos e caracterizar as proteínas codificadas.

Este *Manual*, de autoria dos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, destina-se a todos os interessados no fascinante mundo da biotecnologia de plantas e oferece à comunidade de língua portuguesa material didático de excelente qualidade na área.

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 10803