

Roteiro de Estudo Prático

1- Análise de Tétrades de Esporos

Saccharomyces cerevisiae possui um ciclo de vida bem definido com a fase haplóide e diplóide estáveis. Na fase haplóide existem dois tipos sexuais: tipo “a” e tipo “ α ”. O diplóide pode sofrer meiose em condições de estresse nutricional, como meio pobre em fonte de nitrogênio.

Para pensar:

Como se apresenta um diplóide de *S. cerevisiae* após sofrer mitose?

Como se apresenta um diplóide de *S. cerevisiae* após sofrer meiose?

Do produto de meiose qual a porcentagem de células com tipo sexual “a” e “ α ”

2- Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* com DNA exógeno.

Eucariotos, particularmente algas e fungos, também possuem plasmídeos na natureza. Os fungos filamentosos apresentam uma grande diversidade de plasmídeos lineares e circulares que habitam principalmente suas mitocôndrias. Já *Saccharomyces cerevisiae* apresentam o chamado plasmídeo 2μ , que existe na natureza como um círculo de 6300 pares de base, presente com cerca de 50 cópias no núcleo da célula; sua replicação se dá na forma de círculo rolante, permitindo a produção de várias cópias do plasmídeo por ciclo celular.

Os plasmídeos próprios para uso em *S. cerevisiae* são construídos de maneira a permitir também etapas de clonagem e amplificação em *Escherichia coli*, sendo assim chamados de vetores-ponte. A passagem do vetor-ponte por *E. coli* é obrigatória principalmente para obtenção de clones contendo os plasmídeos recombinantes, o que permite seu isolamento em quantidade suficiente para a transformação de *S. cerevisiae*. transformantes para cada um dos organismos.

Os chamados vetores multi-cópias, ou epissomais, de levedura (YE_p) possuem como origem de replicação as repetições de 600 pares de bases do plasmídeo 2 μ . Alternativamente, o plasmídeo pode conter uma origem de replicação idêntica à de um cromossomo (sequência ARS) e também uma região centromérica (YC_p), o que torna o plasmídeo YC_p menos frequente no interior do núcleo, mas com estabilidade maior que os plasmídeos YE_p. Há também os vetores ditos integrativos (YI_p) que não possuem uma origem de replicação própria de levedura, e como o próprio nome prediz eles devem integrar-se em um dos cromossomos da célula. O processo de integração se baseia na alta capacidade de *S. cerevisiae* realizar recombinação homóloga entre segmentos de DNA cujas extremidades contêm sequências idênticas a um dado locus cromossômico. Assim, o plasmídeo integrativo é linearizado por digestão com enzima de restrição com sítio em um segmento de DNA que deve ter correspondência de sequência de bases a algum locus cromossômico, e é exatamente nesse locus que ele deve se integrar. Resumindo, temos que: YC_p são autônomos, contêm uma região centromérica, conferindo estabilidade mitótica de 90% mantendo 1 a 4 cópias por núcleo. YE_p são autônomos, menos estáveis que os centroméricos, contêm as origens de replicação do plasmídeo 2 μ , levando a um alto número de cópias por célula. YI_p não são autônomos, precisam ser integrados no genoma nuclear para se propagarem, o que também garante estabilidade mitótica próxima de 100%, e são integrados em uma única cópia por célula.

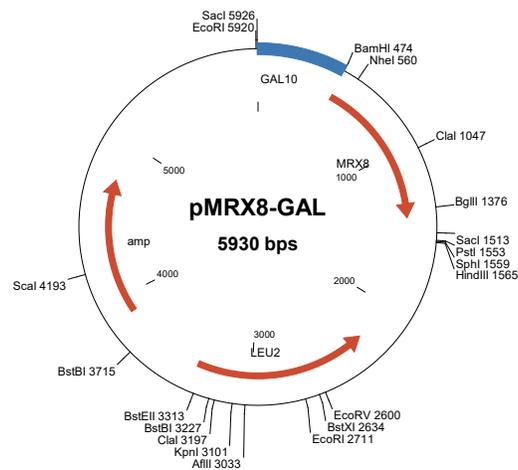
A seleção em *S. cerevisiae* baseia-se principalmente na complementação de uma incapacidade nutricional (auxotrofia) da linhagem hospedeira. Assim, linhagens com deficiência para síntese de uracila ou leucina por terem alelos *ura3* e *leu2* inoperantes são complementadas por plasmídeos contendo os alelos ditos selvagens *URA3* e *LEU2*. O processo de seleção dos transformantes é, dessa forma, realizado em meio mínimo de cultura não suplementado com os respectivos nutrientes.

Embora similar ao procedimento bacteriano, a transformação de leveduras requer tratamentos adicionais com sais de lítio e polietileno glicol. Tais diferenças são decorrentes da presença da parede celular de quitina e β -glucanos típica dos fungos, que forma uma barreira para a entrada de DNA exógeno.

A seleção das células transformadas pode ser feita pelo simples critério de crescimento e formação de colônia em meio mínimo seletivo, pois somente as transformadas terão adquiridos alguma capacidade nutricional nova .

Exercício prático:

A linhagem W303-1B possui o seguinte genótipo: *MAT α ade2-1 trp1-1 his3-115 leu2-3,112 ura3-1* que acarreta em auxotrofas para adenina, triptofano, histidina, leucina e uracila. Deseja-se transformar essa linhagem com o plasmídeo pMRX8-GAL esquematizado abaixo



Esse plasmídeo é um vetor contém origem de replicação para *E. coli*, o gene *amp* que confere resistência a ampicilina, o gene *MRX8* de *S. cerevisiae* sob controle do promotor *GAL10* (esse sistema de expressão permite que o gene *MRX8* seja muito expresso na presença de galactose mas muito pouco expresso na presença de glicose). E finalmente contém a marca de seleção *LEU2* , que é próprio para transformar linhagens *leu2* . Para realizar a transformação esse plasmídeo foi digerido e linearizado através do uso da enzima BstEII.

A transformação deve prosseguir da seguinte forma: Células da linhagem de *S. cerevisiae* estando suspensas em 100 μ l de 100mM acetato de lítio, 10mM Tris-Cl pH 7.5 e 0.1mM EDTA. A essa suspensão é adicionado o DNA exógeno a ser incorporado pelas células (no caso o plasmídeo recombinante (pMRX8-GAL) e DNA carrier simples-fita obtido de

salmão (O DNA carrier aumenta a eficiência de incorporação do DNA transformante de interesse) .

- 1 -Adicionar 10µl da mistura de DNA às células.
- 2-Adicionar 0,7ml de polietileno glicol a 40% (PEG-40%) em 100mM Acetato de Lítio (misturar por inversão, duas vezes)
- 3- Deixar na bancada sem mexer por 20min.
- 4-Transferir os tubos para 42°C por 10min.
- 5-Adicionar 0,5ml de H₂O em cada tubo;
- 6- Centrifugar a 13500rpm por 30 segundos.
- 7- Descartar o sobrenadante;
- 8- Adicionar 1ml de H₂O, fechar, inverter, descartar o TE e ressuspender com o que sobrar
- 9- Semear em meio mínimo seletivo apropriado.

Para entender o experimento:

- 1) Quais as auxotrofias da linhagem utilizada no experimento de transformação? Qual a marca de seleção do plasmídio transformante?
- 2) Como o meio mínimo deve ser suplementado a fim de garantir o crescimento somente das células que receberam o plasmídio transformante?.
- 3) Por que o plasmídeo foi digerido e linearizado antes de sua utilização na transformação?
- 4) Como deve ser a estabilidade do plasmídeo nas células transformadas?