

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-

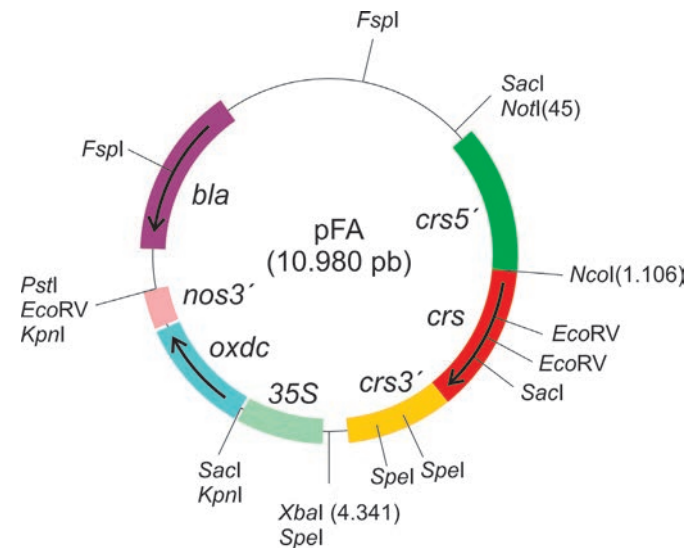


Figura 1. Mapa de restrição do plasmídeo pFA (10.980 pb), que contém os genes da proteína oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes* (*oxdc*) sob o controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (35S) e o gene *crs* que codifica a enzima acetolactase sintase (ALS) mutada e confere resistência 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

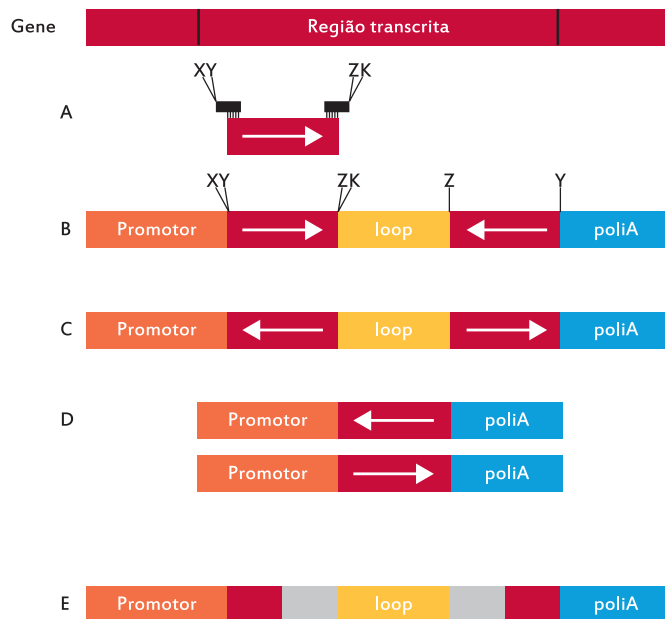


Figura 2. Vetores para silenciamento gênico são, em geral, construídos para que se forme uma estrutura de grampo (*loop*) após a transcrição (RNA de dupla fita ou dsRNA). Nesta figura, uma sequência da região transcrita de um gene é amplificada, por exemplo, com iniciadores (*primers*) com extensão contendo 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 *XbaI* e *NotI* 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.