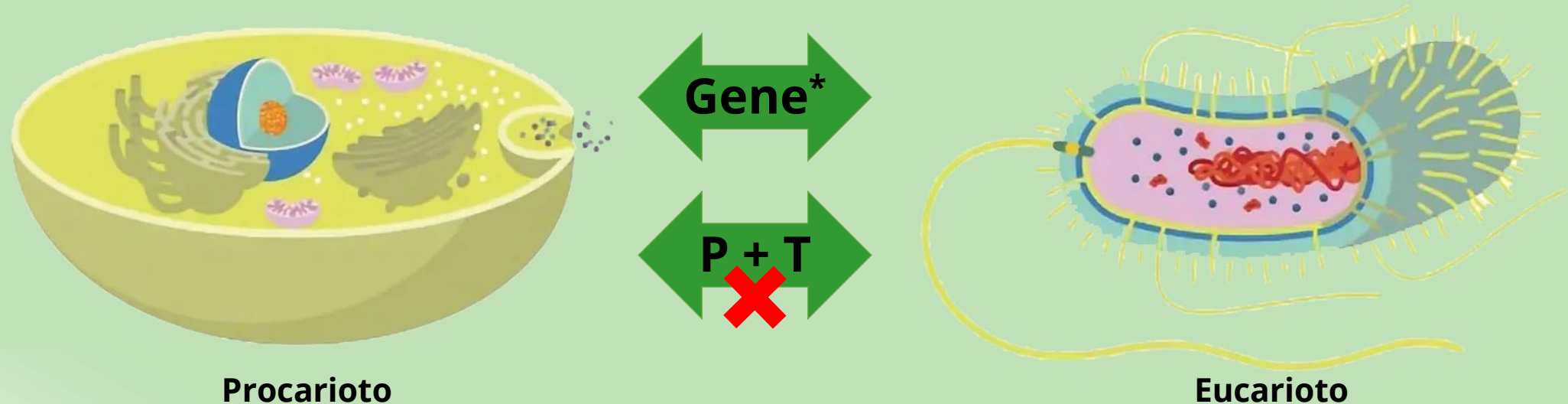


Transformação Genética em Fungos

Alan Silva

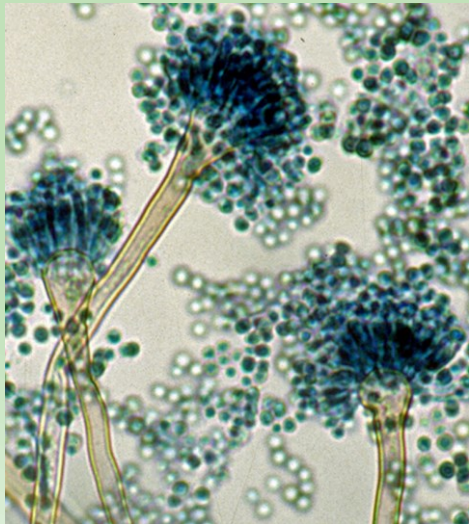
Princípio básico da transformação genética

- Gene funcional
 - Todo gene precisa de promotor e terminador
 - Genes (CDS): facilmente transferíveis
 - Promotores e terminadores: compatíveis com a espécie



Princípio básico da transformação genética

- Compatibilidade Eucariótica
 - Genes podem expressar mas não ter função
 - Promotores e terminadores de espécies próximas ou conservados



Aspergillus nidulans

Gene



P + T



Penicillium digitatum

Gene



P + T

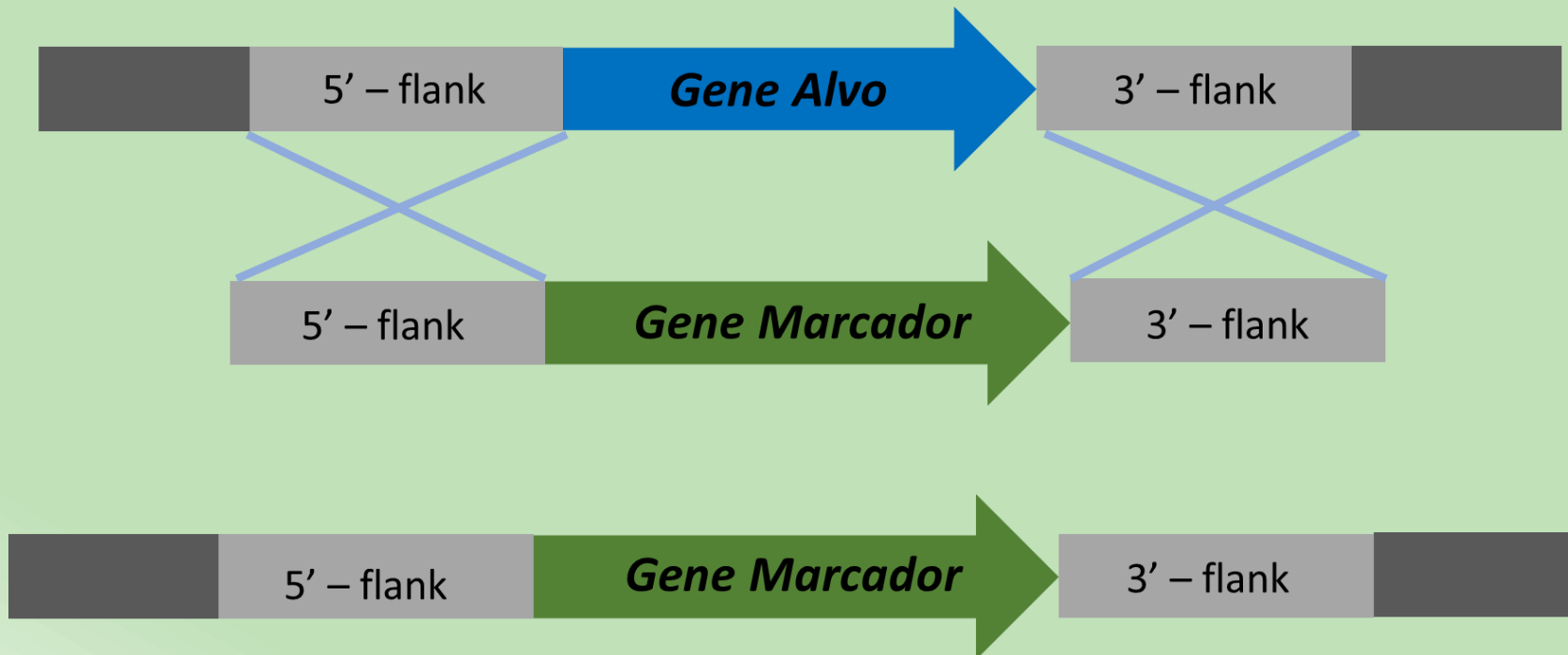


Drosophila melanogaster

Tipos mais comuns de transformação

- Deleção

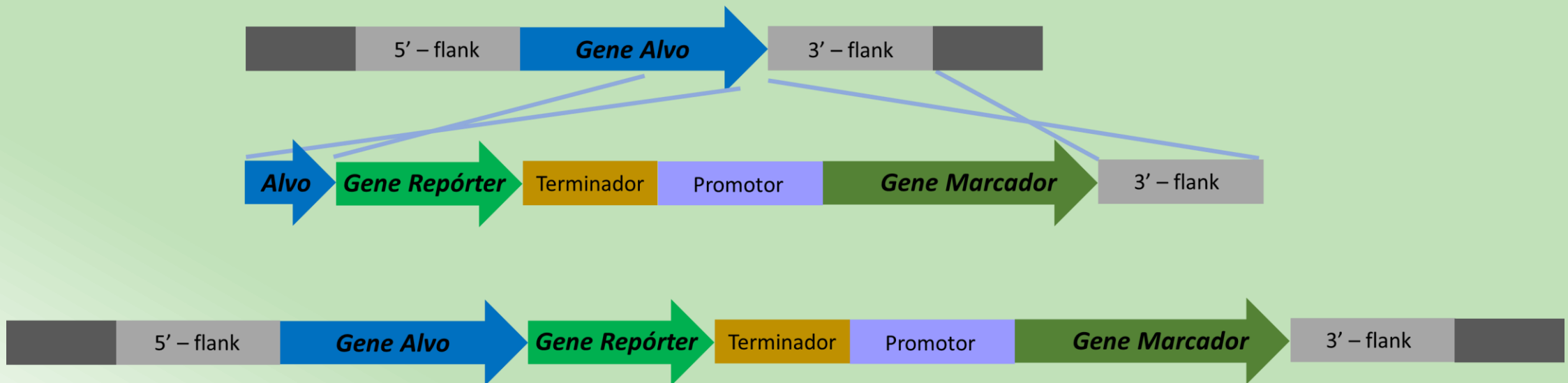
- Eliminar gene alvo, substituindo por gene marcador seletivo
- O fenótipo mutante pode indicar a função do gene



Tipos mais comuns de transformação

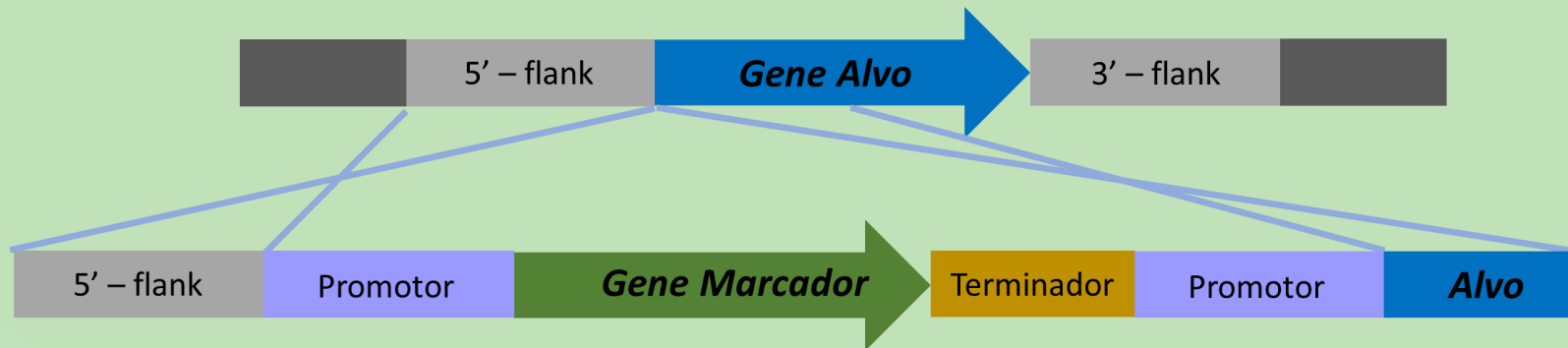
- Fusão

- Incluir uma proteína repórter ou epítopo de anticorpo à sequência codificante de um gene
- Observar o momento da expressão, colocalização subcelular, identificar interações via anticorpo.



Tipos mais comuns de transformação

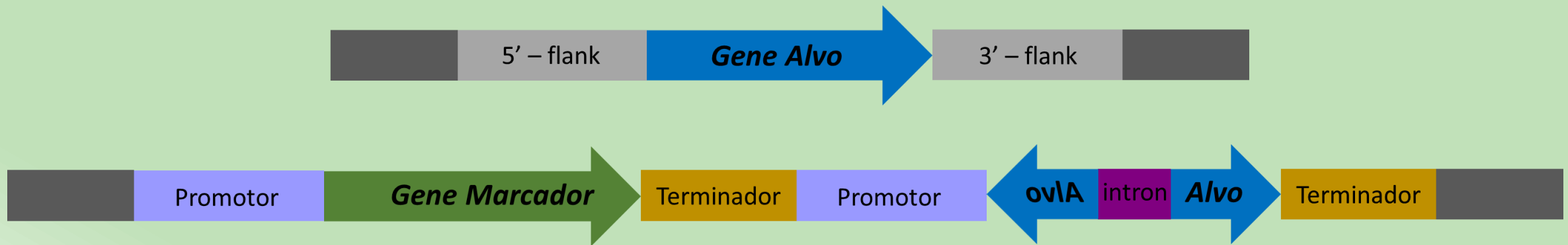
- Substituição de Promotor
 - Trocar o promotor original do gene por um constitutivo e/ou de expressão forte
 - Observar o efeito da expressão constitutiva do gene



Tipos mais comuns de transformação

- RNAi

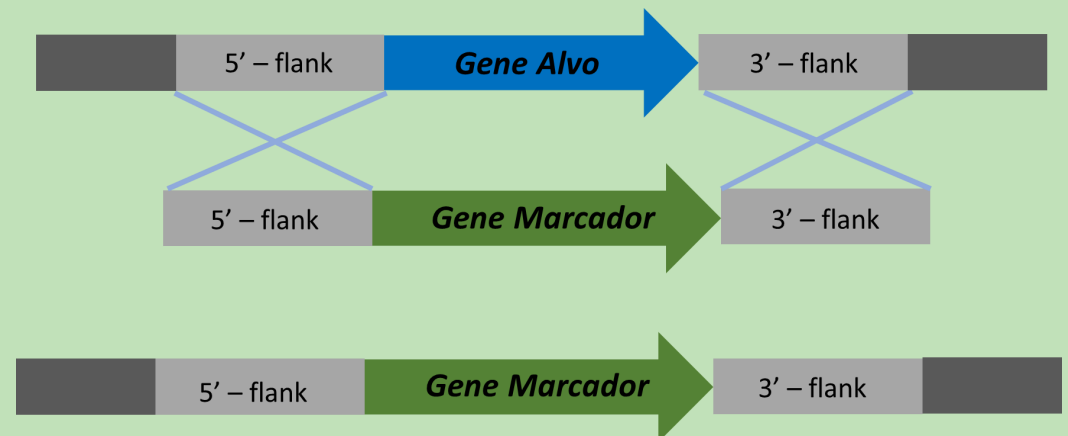
- Utilizar 400-500 pb senso e antisenso do CDS de um gene para produção de RNAs de interferência
- Observar o efeito da redução na expressão do gene



Estudo de Caso: Deleção do gene *SNF1*

- Background

- Gene homólogo de *S. cerevisiae* encontrado no genoma de *C. graminicola*
- Escolha por deleção
 - Eliminar o gene é a forma mais eficiente de entender sua função
 - Gene não é essencial em outras espécies
- Metodologia
 - Montagem de cassetes: PCR Double-joint
 - Transformação via protoplastos

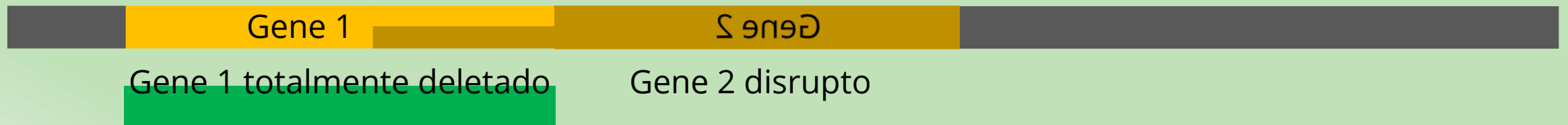


Observações Importantes

- Deleção vs Disrupção

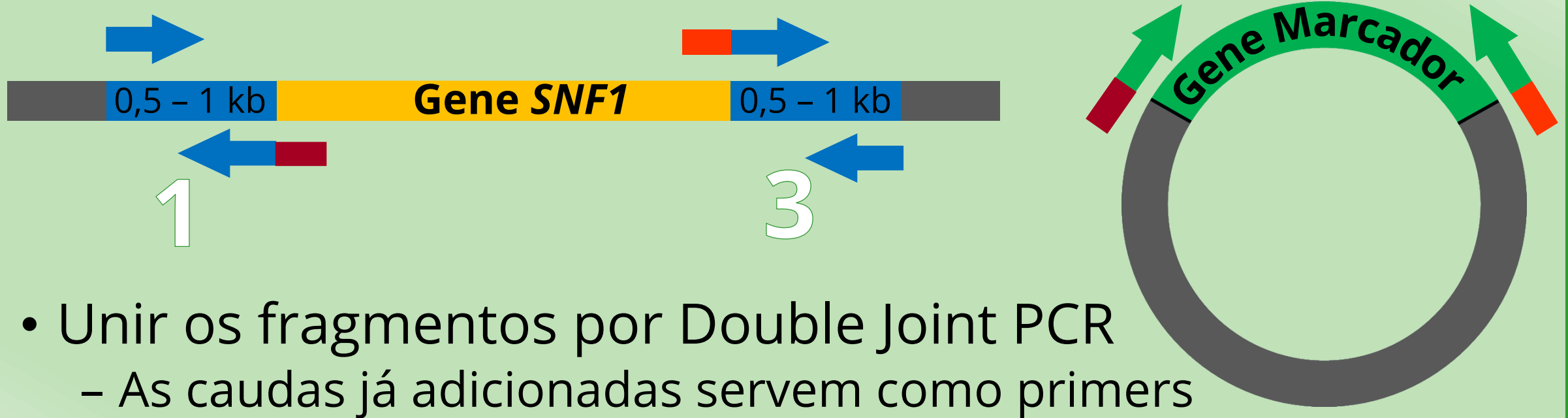


- Disrupção de gene antisenso



Estudo de Caso: Deleção do gene *SNF1*

- Desenhar primers para montagem do cassete



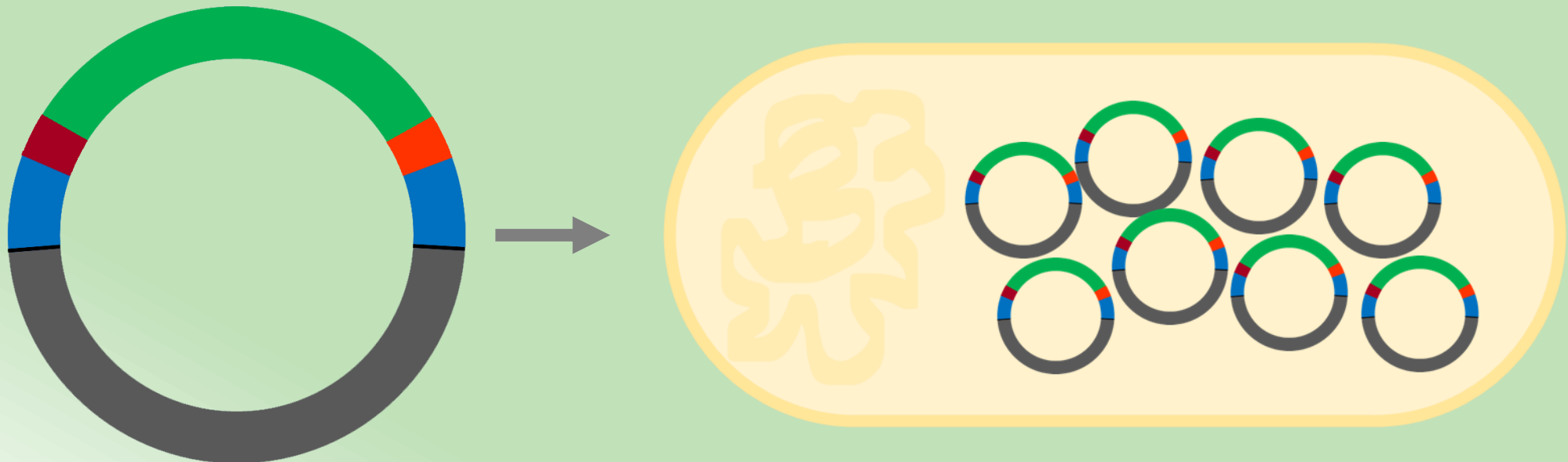
0,5 – 1 kb 5' Gene Marcador 0,5 – 1 kb 3'

Estudo de Caso: Deleção do gene *SNF1*

- Amplificar o cassete usando primers Nested



- Clonar o cassete em *E. coli*
 - Multiplicação e congelamento



Estudo de Caso: Deleção do gene *SNF1*

- Passo a passo

1. Baixar a sequência do gene alvo incluindo uma longa região flaqueadora (≥ 5000 pb 5' e 3')

- Ter essa região já disponível facilita definir sítios de restrição para realizar o Southern blot posteriormente

2. Desenhar primers amplificando 500-1000 pb UTR 5' e 3'

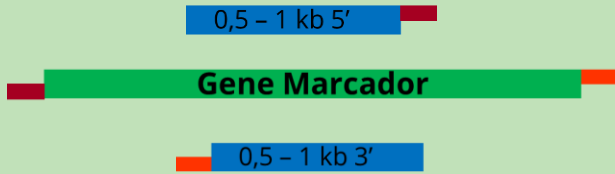
- Fragmentos maiores tornam a hibridização mais específica
- Desenhar primers o mais próximos do início e final do gene
- Incluir caudas nos primers internos (5'-R e 3'-F)

3. Amplificar um gene marcador seletivo de alguma fonte

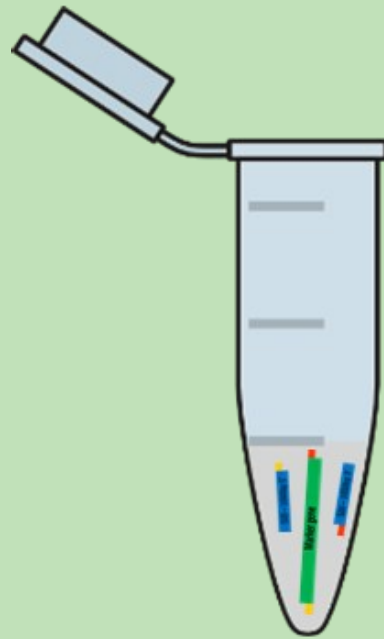
- O gene deve conter um promotor forte
- Facilita se tiver um vetor contendo o gene
- Adicionar caudas

4. Purificar independentemente as 3 reações
 - Kit de purificação de produtos de PCR garante menos resíduos
5. Calcular proporção molar de 1:3:1 entre os fragmentos
 - Multiplique a proporção de tamanho pela proporção 1:3:1
 - Ex. 700:1400:700 pb = 1:2:1 x 1:3:1 = 1:6:1
 - Use no máximo 1000 ng total na ligação. Ex: 100:600:100 ng
6. Misturar os 3 produtos no mix de PCR e realizar o ciclo
 - Usar enzima de alta eficiência e fidelidade (Phusion)
 - Maior tempo de anelamento pelos “primers longos” (2 min)
7. Correr um gel com produto da DJ-PCR
8. Realizar PCR Nested para multiplicar o cassette
9. Clonar em *E. coli* para multiplicar e guardar
10. Extrair o plasmídeo e amplificar 1-5 µg do cassette
11. Transformar protoplastos com esse fragmento linear

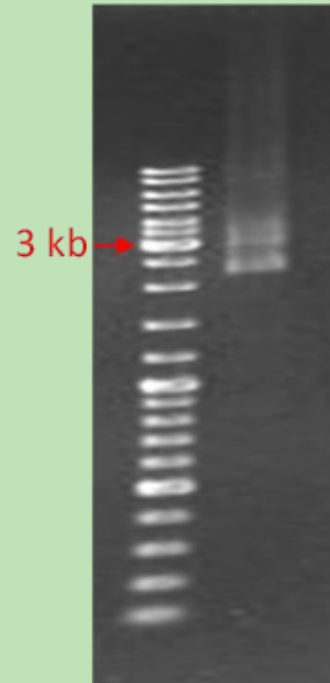
Estudo de Caso: Deleção do gene *SNF1*



Double-Joint PCR (tails used as primers)

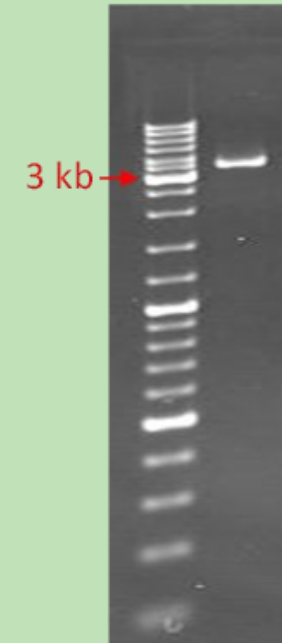


1:3:1
Molar Ratio

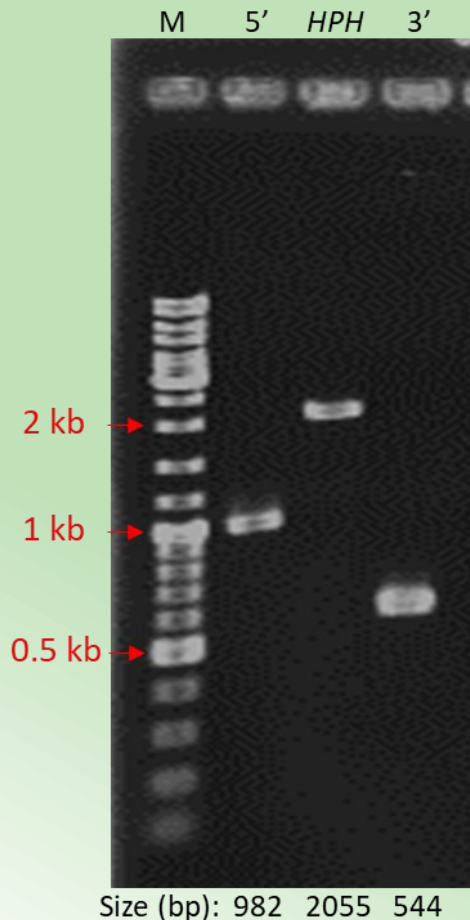


Fragment expected:
3621 bp

Nested PCR (internal primers)



Fragment expected:
3456 bp



Estudo de Caso: Fusão de um *tag* ao gene alvo

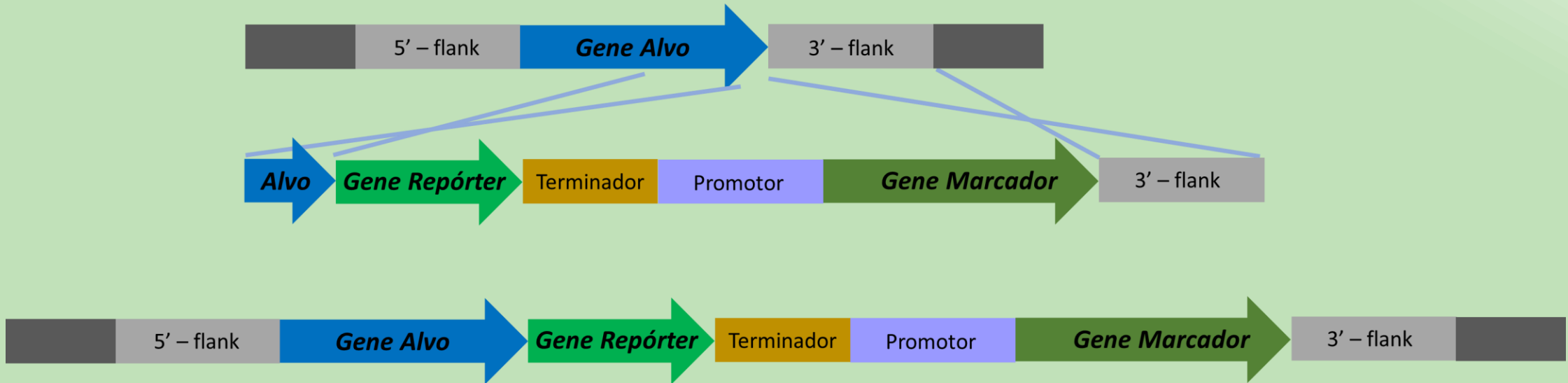
- Background

- Isolamento e detecção de proteínas:
 - por peso molecular ou precipitação com anticorpo
 - Necessita um anticorpo específico para a proteína
- *Tags* de Epítopo
 - Pequenos peptídeos adicionados a uma proteína de interesse
 - Usados para marcar proteínas que não possuem anticorpo disponível
 - Por serem pequenos, não afetam a função da proteína principal
 - Altamente reconhecidos por anticorpos

Principais Tags				
FLAG	HA	Myc	Poli His	V5
DYKDDDDK	YPYDVPDYA	EQKLISEED	HHHHHH	GKPIPNPLLGLDST

Fusão da proteína Histona 3 com *tag*HA

- Estratégia



- Encontrar fonte dos genes/fragmentos acima
 - Genoma do organismo: fonte para o gene alvo
 - Plasmídeos: fonte para o repórter/epítipo, promotor, terminador e gene marcador seletivo
- Buscar fontes que envolvam o mínimo de etapas

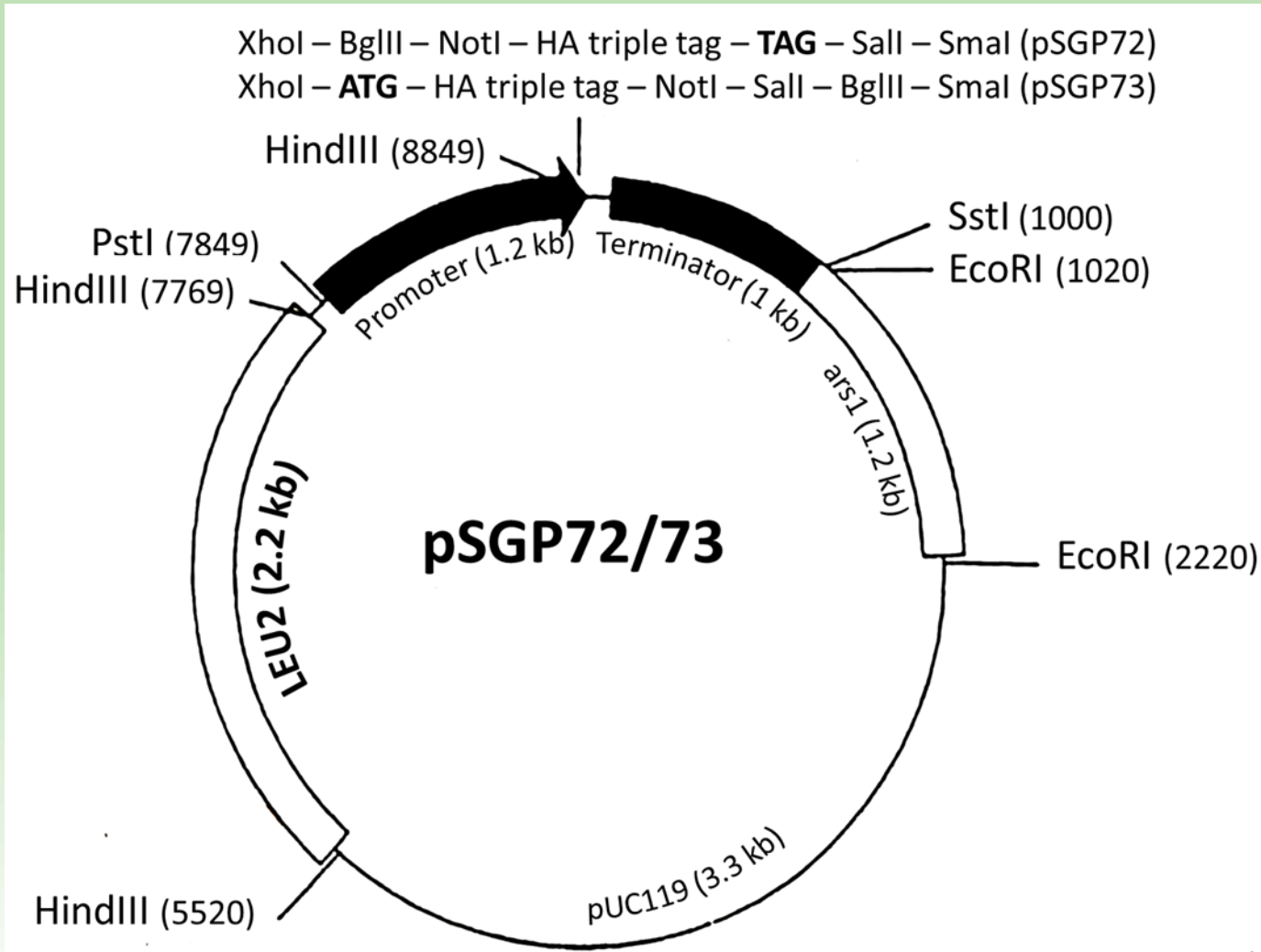
Origem dos fragmentos

- Genoma do *Colletotrichum graminicola*
 - 500 a 1000 pb do final do gene sem stop códon com sítios de restrição
 - 500 a 1000 pb da região 3'-UTR com cauda no primer F
- Plasmídeo pSGP72
 - 3 cópias do tag HA com stop códon no final
 - Flanqueado por sítios de restrição *in frame* com o gene
- Plasmídeo pSRE47
 - TtrpC + PoliC + *NAT1*



Plasmídeo pSGP72

- Vetor Binário: bactéria e levedura



Putative polylinker sequence of pSGP72

> pSGP72

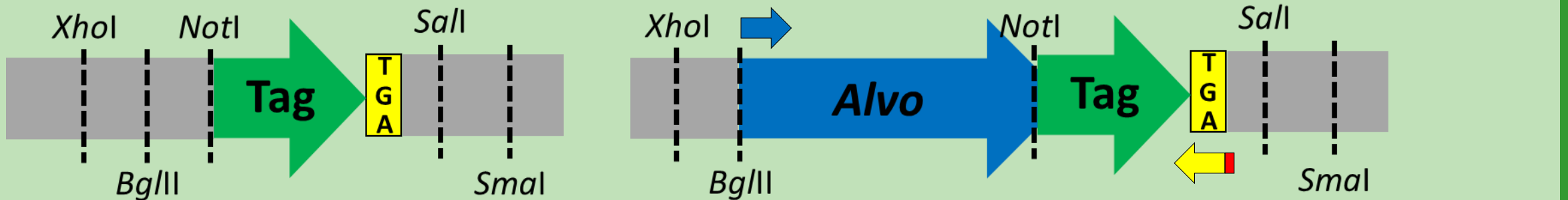
```
CTCGAGAGATCTCCACCGCGGTGGCGGCCGC
ATCTTTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCG
GGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGG
ATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGC
TTAGTCGACCCGGG
```

HA tags NotI BglII NotI Stop SalI SmaI

Fragmento 1: Gene com Tag

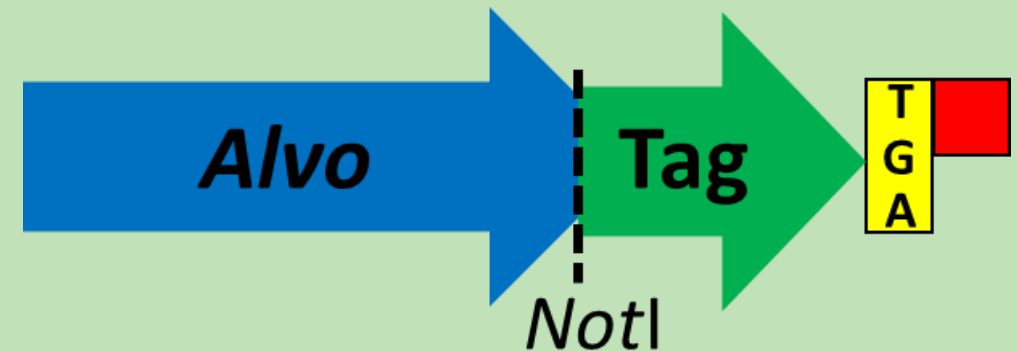
- Plasmídeo pSGP72

- Possui 3HA + Stop com sítios
- Amplificar 500-1000 pb do final do gene com *Bgl*II e *Not*I
- Digerir ambos e clonar no plasmídeo



- Amplificar fragmento completo

- Gene (sem stop) + 3HA + stop
- Adicionar cauda no primer R



Fragmento 1: Gene com Tag

H3 sem stop + sítios

Digestão e clonagem

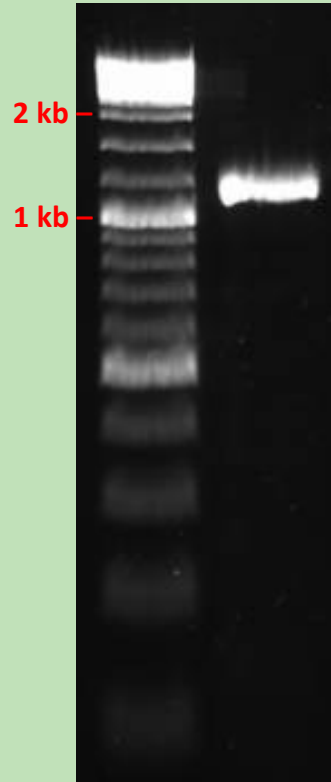
PCR Gene com Tag

Mix

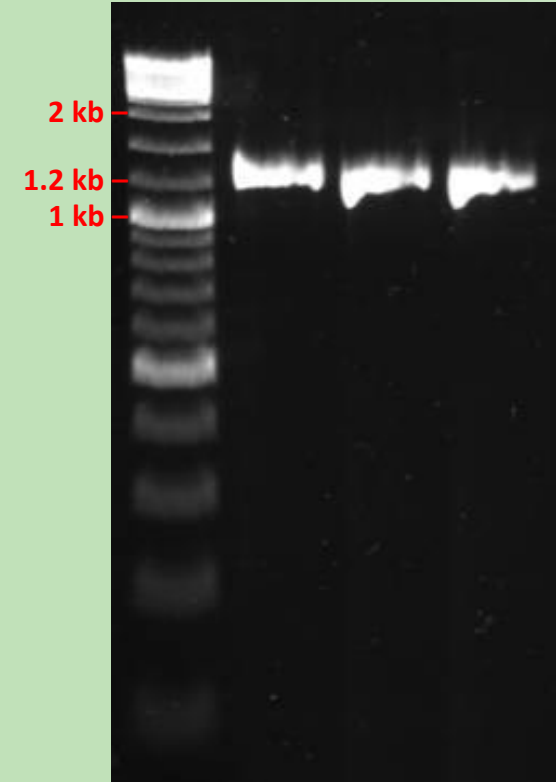
8.8 água
4 µL Buffer HF (5X)
2 µL dNTPs (10 mM)
2 µL primer F (10 µM)
2 µL primer R (10 µM)
1 µL gDNA (50 ng/µL)
0,2 µL Phusion (2U/µL)

Reação

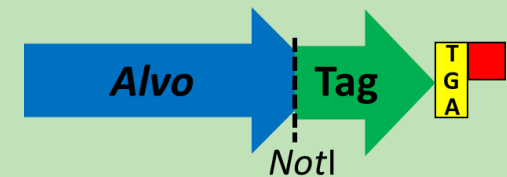
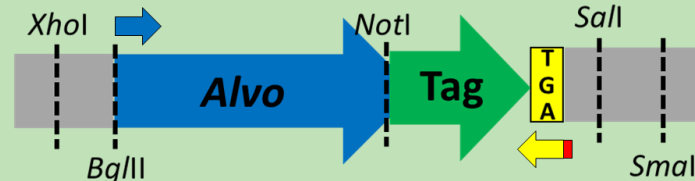
98 °C – 3 min
30x $\left\{ \begin{array}{l} 98\text{ °C} - 30\text{ s} \\ 66\text{ °C} - 30\text{ s} \\ 72\text{ °C} - 30\text{ s} \end{array} \right.$
72 °C – 5 min



1100 pb + tails

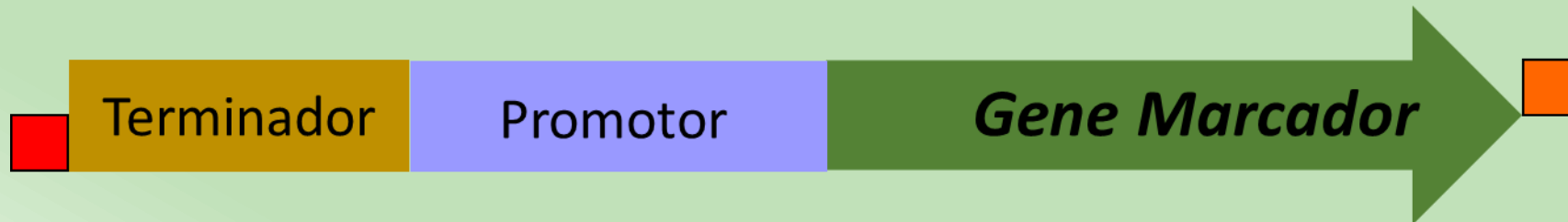


1210 pb + tail



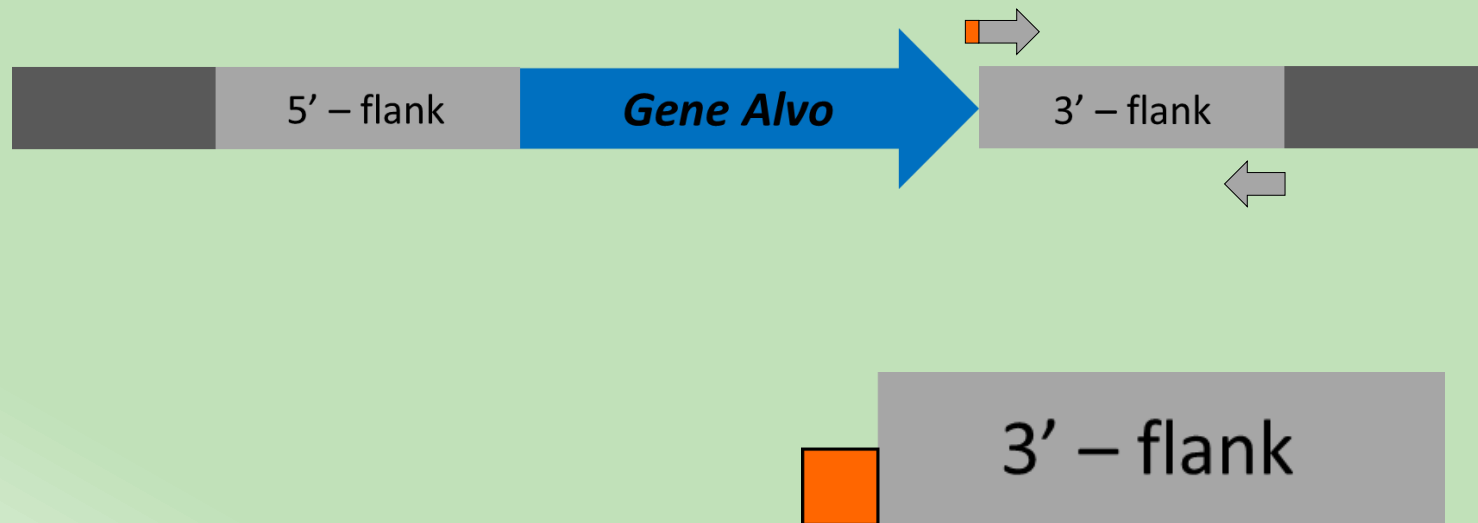
Fragmento 2: Terminador + Marcador Seletivo

- Plasmídeo pSRE47
 - Possui eGFP + TtrpC + PoliC + *NAT1*
 - Amplificar TtrpC + PoliC + *NAT1* com caudas



Fragmento 3: Região 3'-UTR do gene alvo

- Gene alvo
 - 500-1000 pb da região 3'-UTR do gene
 - Amplificar com cauda no primer F



Fragmentos 2 e 3

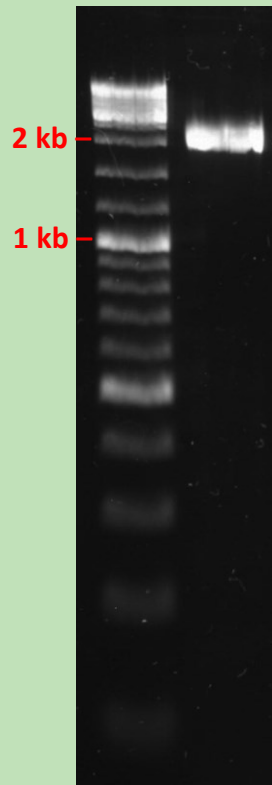
TtrpC + PoliC + *NAT1*

Mix

8.8 água
4 µL Buffer HF (5X)
2 µL dNTPs (10 mM)
2 µL primer F (10 µM)
2 µL primer R (10 µM)
1 µL plasmid (1 ng/µL)
0,2 µL Phusion (2U/µL)

Reação

98 °C – 3 min
30x { 98 °C – 30 s
62 °C – 30 s
72 °C – 30 s
72 °C – 5 min



2070 pb + tails

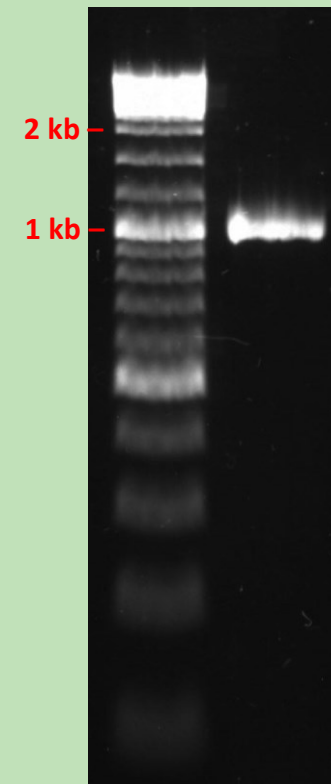
H3 – 3'-flank

Mix

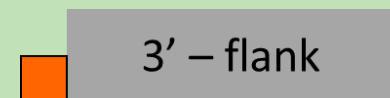
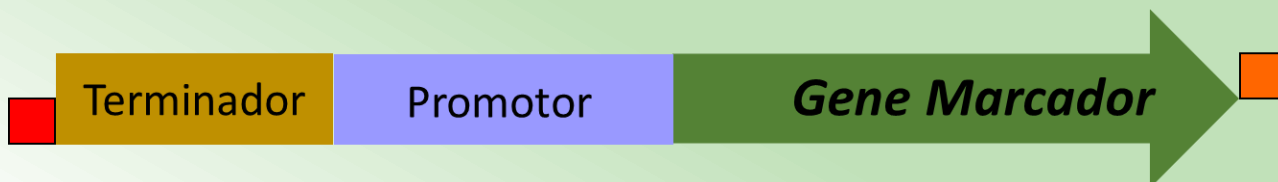
8.8 água
4 µL Buffer HF (5X)
2 µL dNTPs (10 mM)
2 µL primer F (10 µM)
2 µL primer R (10 µM)
1 µL gDNA (50 ng/µL)
0,2 µL Phusion (2U/µL)

Reação

98 °C – 3 min
30x { 98 °C – 30 s
62 °C – 30 s
72 °C – 30 s
72 °C – 5 min



964 pb + tail



Resumo

- Fragmento 1
 - ⌘ 1kb final do gene sem stop amplificado com sítios de restrição
 - ⌘ Ligado no plasmídeo pra acrescentar 3HA e stop
 - ⌘ Ligação final amplificada por PCR com cauda no primer R
- Fragmento 2
 - ⌘ T + P + Gene Marcador amplificados de vetor com caudas
- Fragmento 3
 - ⌘ 1kb UTR 3' do gene amplificado com cauda no primer 3F



Double-Joint PCR, Nested and Cloning in pJET1.2

	Tamanho	Proporção	DJ	Final	Máx. 1000 ng	Concentração	Volume
Fragmento 1	1230 pb	1,25	1	1,25	125 ng	74 ng/μL	1,7 μL
Fragmento 2	2100 pb	2,1	3	6,3	630 ng	81 ng/μL	7,8 μL
Fragmento 3	984 pb	1	1	1	100 ng	48 ng/μL	2,1 μL

Mix (50 μL)
23,9 água
10 μL Buffer HF (5X)
4 μL dNTPs (10 mM)
1,7 μL Frag. 1 (74 ng/μL)
7,8 μL Frag. 2 (81 ng/μL)
2,1 μL Frag. 3 (48 ng/μL)
0,5 μL Phusion (2U/μL)

Reação
98 °C – 5 min

30x { 98 °C – 30 s
60 °C – 2 min
72 °C – 2 min

72 °C – 10 min

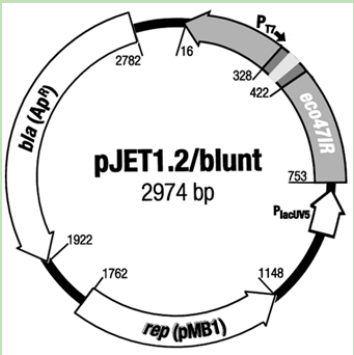
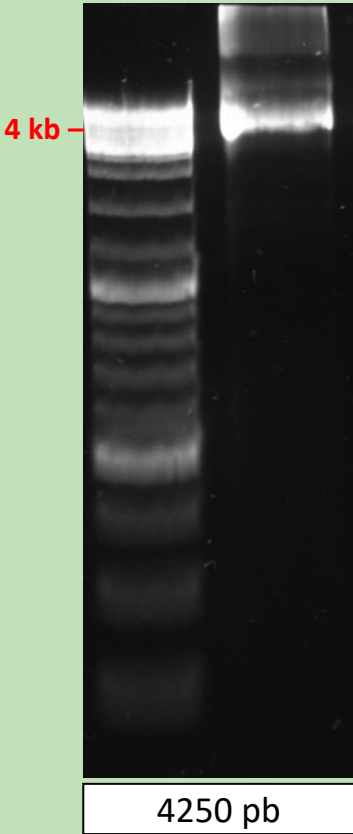
Purificado

Mix
8.8 água
4 μL Buffer HF (5X)
2 μL dNTPs (10 mM)
2 μL primer F (10 μM)
2 μL primer R (10 μM)
1 μL DJ (1 ng/μL)
0,2 μL Phusion (2U/μL)

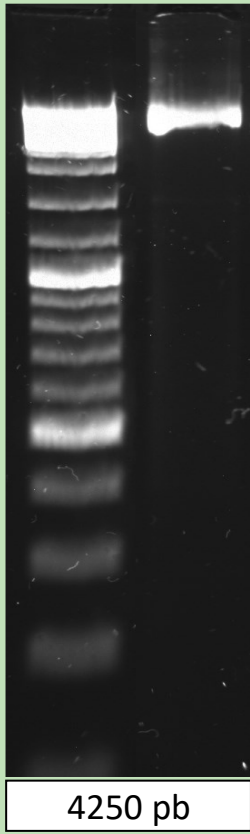
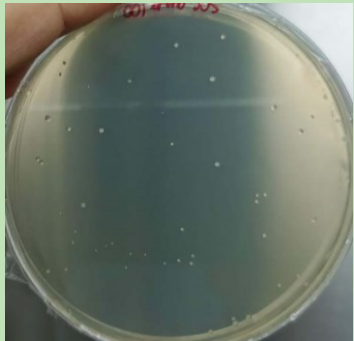
Reação
98 °C – 3 min

30x { 98 °C – 30 s
62 °C – 30 s
72 °C – 2 min

72 °C – 5 min



Clonado



Resultado

- Coloração nuclear por anticorpo
 - ⌘ Anticorpo primário Anti-HA, anticorpo secundário verde
 - ⌘ Microscopia de fluorescência
- Expectativa
 - ⌘ Azul: DAPI (núcleo)
 - ⌘ Verde: histona 3 + HA

