
ANDREA BALAN FERNANDES

**SISTEMA SUICIDA
PARA LEVEDURAS BASEADO
NA DEGRADAÇÃO
DO MATERIAL GENÉTICO
VISANDO
BIOSSEGURANÇA**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Ana Clara G. Schenberg

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas, para
Obtenção do título de
Doutor em Microbiologia

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
1998**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Fernandes, Andrea Balan.

Sistema suicida para leveduras baseado na degradação do material genético visando biossegurança / Andrea Balan Fernandes. -- São Paulo, 1999.

Tese(doutorado)—Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia .

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Biologia molecular de leveduras.

Orientador: Schenberg, Ana Clara Guerrini.

Versão do título para o inglês: Suicide system for yeast based on the DNA degradation for biosecurity.

Descritores: 1. Nuclease 2. Leveduras, Sistema suicida 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. DNA, Degradação 5. Biossegurança 6. Microorganismos geneticamente modificados

ICB/SBIB/128/98

Candidato(a): ANDREA BALAN FERNANDES .

Título da Tese: SISTEMA SUICIDA PARA LEVEDURAS BASEADO NA DEGRADAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VISANDO BIOSSEGURANÇA.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 09/04/1999, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) Amara

2) Examinador(a) Hand

3) Examinador(a) Rau

4) Examinador(a) Paulo

5) Presidente Elisalt José J.F.

***À Paola,
Minha maior e melhor
descoberta,***

Ao Marlon, meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

Em especial, gostaria de agradecer à minha querida orientadora, Ana Clara, por sua ousadia na criação deste projeto, pela oportunidade que me deu para trabalhar ao seu lado, e pelo exemplo extremamente proveitoso durante todos estes anos.

Aos professores do laboratório Sérgio Olavo Pinto da Costa, Beatriz Fernandes, Gabriel Padilla e Crodowaldo Pavan pela agradável amizade e valiosas sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao professor Juarez Braz de Faria por sua imensa companhia, discussões e principalmente colaboração.

Às docentes que participaram do exame de qualificação Vivian Pellizari, Tânia Zucchi e Elisabete José Vicente, pelas sugestões e correções. Em especial às profas. Tânia Zucchi, pela enorme disposição em me ajudar com o ensaio Cometa e a Elisabete, por sua incansável vontade de ajudar.

À professora Luiza Lina Villa, pela produção dos oligonucleotídeos em seu laboratório.

Ao João Renato, pela doação dos plasmídeos e ajuda na elaboração dos oligonucleotídeos .

Ao professor Dr. Michael Benedik, por ceder os plasmídeos com o gene *nuc* e o anticorpo para nuclease, sem os quais este trabalho não seria realizável.

Aos amigos do laboratório Solange, Elza, Heleninha, pela agradável convivência e participação durante todos estes anos, e Denise, por contribuir com a realização d tese.

Aos amigos Léa, Ileana, Maria, Renata L., Bete Sbrogio, Gisele, Seu Antônio, Beatriz, Rita, Luis Carlos, Tatiana, Fátima, Cleofe, Inês, Renata M., Miriam, Nádía, Alexandre, Seu Hisao, Leandro, Marcelo, Quitéria, André, Márcia, Andreinha, Jefferson, Sílvia, Gabriela, Gabi, Salete, Sucu, Vanda, Pimenta, Célia, Valéria e muitos outros que passaram pelo laboratório durante estes anos, principalmente pela amizade, e por tornarem o dia-a-dia bem mais divertido e agradável.

Ao pessoal do laboratório da profa. Tânia Zucchi, Nanci e Karen

À Kazui e a Norma pela contínua boa vontade e bom humor.

Aos meus amigos no geral.

À minha mãe, por me ensinar a alegria, pela força que me deu para "experimentar", e ao meu irmão, por seu amor.

E, finalmente,
Ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1.INTRODUÇÃO	1
BRASIL – PANORAMA ATUAL DE BIOSSEGURANÇA.....	2
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. OS OGMs E OS SISTEMAS DE CONTENÇÃO DESTES MICRORGANISMOS.....	5
2.1.1. Os Genes Assassinos em Bactérias.....	9
2.1.2. O DNA como Alvo de Destruição Celular – Nucleases.....	12
2.1.3. O Controle da Expressão Gênica.....	14
2.1.4. Principais Problemas Relacionados aos Sistemas Suicidas.....	15
2.2. SISTEMAS SUICIDAS EM LEVEDURAS.....	17
2.3. A NUCLEASE DE <i>Serratia marcescens</i>	21
2.3.1. Atividade da Enzima e Mecanismo de Ação.....	24
2.3.2. Mecanismos de Secreção.....	29
2.3.3. Regulação da Nuclease em <i>Serratia marcescens</i>	32
2.4. A LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i> COMO ORGANISMO HOSPEDEIRO DE GENES HETERÓLOGOS.....	35
2.5. VETORES DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>S. cerevisiae</i>	37
2.6. PROMOTORES UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO EM <i>S.cerevisiae</i>	39
2.7. EXPRESSÃO BASEADA NO PROMOTOR DO GENE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE II (<i>ADH2</i>).....	42
2.7.1. Regulação da expressão do gene <i>ADH2</i>	42

2.7.2. Expressão de proteínas heterólogas UAS _{ADH2}	43
2.8. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A PARTIR DE FUSÃO GÊNICA.....	44
3. OBJETIVOS.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. LINHAGENS E PLASMÍDEOS.....	50
4.1.1. Linhagens de Bactérias.....	50
4.1.2. Linhagens de leveduras.....	50
4.1.3. Plasmídeos.....	50
4.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	53
4.2.1. Solução I.....	53
4.2.2. Solução II.....	53
4.2.3. Solução III.....	53
4.2.4. Solução RNAaseA.....	53
4.2.5. Solução LTE.....	53
4.2.6. Solução PLTE.....	53
4.2.7. Solução Salina.....	53
4.2.8. Solução BR.....	53
4.2.9. Solução corante para dosagem de proteínas.....	53
4.2.10. Solução A para SDS-PAGE.....	53
4.2.11. Solução B para SDS-PAGE.....	53
4.2.12. Solução C para SDS-PAGE.....	53
4.2.13. Solução de Persulfato de amônio (APS):.....	53
4.2.14. Solução corante para proteínas.....	54
4.2.15. Solução descorante forte para proteínas.....	54
4.2.16. Solução descorante média para proteínas.....	54
4.2.17. Solução descorante fraca para proteínas.....	54
4.2.18. Solução salina de fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.2.....	54
4.2.19. Solução bloqueadora.....	54
4.2.20. Solução de lavagem para Western Blot.....	54

4.2.21. Anticorpo anti-nuclease.....	54
4.2.22. Conjugado.....	54
4.2.23. Solução cromógena para Western Blot.....	54
4.2.24. Normal Melting Agar.....	54
4.2.25. Low Melting Agar.....	54
4.2.26. Solução de Lise para ensaio do Cometa.....	54
4.2.26.1. Solução Ativa.....	54
4.2.27. Solução neutralizante para ensaio do Cometa.....	55
4.2.28. Solução estoque de Brometo de etídio.....	55
4.2.29. Solução de X-GAL.....	55
4.2.30. Solução de IPTG.....	55
4.2.31. Solução de zimolase.....	55
4.3. TAMPÕES.....	55
4.3.1. TE.....	55
4.3.2. STET.....	55
4.3.3. TBE.(10X).....	55
4.3.4. Tampão de Amostra (10X).....	55
4.3.5. Tampão de corrida para SDS-PAGE (10X).....	55
4.3.6. Tampão de amostra.....	55
4.3.7. Tampão de transferência para Western blot.....	55
4.3.8. Tampão Frio para eletroforese – Ensaio Cometa.....	55
4.4. MEIOS DE CULTURA.....	56
4.4.1. Cultivo das Leveduras.....	56
4.4.1.1. Meio completo (YPD).....	56
4.4.1.2. Meio mínimo + glicose (SD).....	56
4.4.1.3. Meio mínimo Asp+Glu (SD1%aspglu) pH 6.0.....	56
4.4.1.4. Meio mínimo (SD1%) tamponado em pH 7.0.....	56
4.4.1.5. Meio mínimo + glicerol (SG).....	56
4.4.1.6. Meio mínimo + rafinose (SR).....	56
4.4.2. Cultivo de Bactérias.....	56
4.4.2.1. Meio Completo LB.....	56
4.4.2.2. Meio YT.....	56

4.4.2.3. Meio Suplementado com antibióticos.....	57
4.4.2.4. Meio SOC.....	57
4.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE BACTÉRIAS.....	57
4.5.1. Mini-preparação.....	57
4.5.2. Maxi-preparação.....	57
4.6. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE LEVEDURA.....	58
4.7. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO DNA EM GEL DE AGAROSE.....	59
4.8. QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	59
4.8.1. Determinação espectrofotométrica.....	59
4.8.2. Quantificação Fluorescente com Brometo de Etídio.....	59
4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – “POLIMERASE CHAIN REACTION”) PARA OBTENÇÃO DO FRAGMENTO <i>nuc</i>	60
4.9.1. Preparo da mistura de reação.....	61
4.10. CLIVAGEM DOS PLASMÍDIOS E FRAGMENTOS DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	61
4.11. SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>nuc</i> OBTIDO A PARTIR DE PCR.....	62
4.11.1. Clonagem dos fragmentos dos genes <i>nuc</i> no plasmídeo pUC18.....	62
4.11.2. Detecção dos clones portadores dos fragmentos do gene <i>nuc</i>	63
4.11.3. Reação de sequenciamento.....	63
4.12. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO FRAGMENTO <i>nuc</i> NO VETOR pBS24Ub.....	63
4.13. ELUIÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE.....	64
4.14. TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> POR ELETROPORAÇÃO (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA-USA).....	64
4.14.1. Preparação das células.....	64
4.14.2. Eletro-transformação.....	65

4.15. ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS TRANSFORMANTES DE BACTÉRIA.....	65
4.16. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURAS PELO MÉTODO DE ACETATO DE LÍTIO	66
4.17. PREPARAÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS DAS LINHAGENS DE <i>S. cerevisiae</i>	67
4.18. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE RÁPIDA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO LÍQUIDO.....	67
4.19. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO SÓLIDO (“DROP TEST”).....	68
4.20. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NOS MEIOS DE CULTIVO COMPLETO E MÍNIMO.....	68
4.21. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES DE <i>S. cerevisiae</i>	69
4.22. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	69
4.23. OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES DE <i>S. cerevisiae</i>	70
4.23.1. Para dosagem da concentração de proteínas.....	70
4.23.2. Para SDS-PAGE e Western Blot.....	70
4.23.3. Para análise da atividade da nuclease <i>in vitro</i>	71
4.24. PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE <i>S. marcescens</i>	71
4.25. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE.....	72
4.25.1. Preparo do gel de separação.....	72
4.25.2. Preparo do gel de empilhamento.....	72
4.25.3. Coloração para identificação de proteínas.....	73
4.25.4. Secagem:.....	73

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

