**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR PARA TRANSFORMAR
LEVEDURA ATRAVÉS DA DISRUPÇÃO DO GENE *CAN1***

Maria Evangelina de Camargo

*Dissertação apresentada ao Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Microbiologia.*

Orientadora: Elisabete José Vicente

**São Paulo
1994**

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Camargo, Maria Evangelina de.
Construção de um vetor para transformar levedura através da
disrupção do gene *CAN1* / Maria Evangelina de Camargo. -- São
Paulo, 1994.

Dissertação (mestrado)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universi-
dade de São Paulo. Departamento de Microbiologia.
Área de concentração: Microbiologia.
Orientador: Vicente, Elisabete José.

Descritores: 1.*Saccharomyces cerevisiae* 2.Disrupção gênica
3.Gene *CAN1* 4.Transformação de levedura industrial 5.Construção
de vetores bifuncionais 6.Fragmento de DNA

ICB/SBIB.072/94

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 21 / 12 /19 94 , considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

1º) Examinador: Gervílio Belucé

2º) Examinador: Paulo Medeiros

3º) Examinador: Elisabete Joia J. J.

Ao meu pai,
que me deixou muitos
ensinamentos sobre a vida.

Ao Adilson,
marido que tanto amo.

À minha mãe e meus irmãos,
que mesmo sem compreender meu trabalho,
sempre me deram forças para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

- À Bete, que sempre me orientou com muito carinho, criatividade e inteligência durante esses anos.
- Aos docentes do laboratório de Genética: Juju, Gab's, Sally, Bidi, SOP, Ana Clara, que sempre discutiram e colaboraram com o andamento das pesquisas aqui desenvolvidas, além da grande amizade e carinho dedicados. À Bidi, também pelas colaborações em momentos decisivos.
- À equipe técnica: Kazui, Leninha e Norma, pelo apoio fundamental dado ao desenvolvimento dos experimentos, e pela amizade.
- Aos meus grandes amigos, que não me deixaram sozinha num dos momentos mais difíceis da minha vida, e que sempre estiveram presentes nos momentos bons.
- Aos amigos de bancada, de cerveja, de algumas mágoas e muitas alegrias. Agradeço ao apoio profissional e às lembranças que irão comigo.
- A todos os colegas que trabalham ou trabalharam no laboratório de Genética de Microrganismos do ICB, que trocaram muitas experiências interessantes.
- Aos funcionários da Biblioteca do ICB, que sempre estiveram prontos para ajudar.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	01
SUMMARY	02
ABREVIATURAS	03
INTRODUÇÃO	04
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1. Linhagens e plasmídios.....	23
2. Cultivo de bactérias	24
3. Cultivo de leveduras	25
4. Soluções utilizadas.....	26
5. Extração de plasmídios	31
6. Purificação de plasmídios	33
7. Tratamento com enzimas modificadoras de DNA	35
8. Gel de agarose	37
9. Transformação genética de bactérias.....	39
10. Transformação genética de leveduras	41
11. Teste de estabilidade da informação clonada	42
12. Análise da atividade amilolítica das células de <i>S. cerevisiae</i> transformantes	43
13. Curva de crescimento das cepas FTPT e FTPT/CGC----	45
14. Teste de ploidia das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	46
15. Eletroforese em campo pulsante (CHEF)	47
16. Transferência de DNA do gel de agarose para membrana de nylon	49
17. "Southern blot"	50

RESULTADOS	52
1. Construção do vetor bifuncional YlpC	52
2. Construção do vetor bifuncional YlpCGC.....	54
3. Obtenção do fragmento CGC	55
4. Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	56
5. Estabilidade da informação clonada	59
6. Dosagem da atividade da glicoamilase.....	60
7. Curva de crescimento da cepa FTPT e FTPT/CGC	61
8. Análise da ploidia das cepas	61
9. Localização da informação clonada no cromossomo	62
DISCUSSÃO.....	64
FIGURAS	68
Figura 2 - Plasmídio integrativo Ylp5	68
Figura 3 - Plasmídio episssomal YEpG2	69
Figura 5 - Plasmídio TLC-1	70
Figura 6 - Plasmídio integrativo Ylp5-H	71
Figura 7 - Plasmídio integrativo YlpC	72
Figura 8 - Plasmídio integrativo YlpCGC	73
Figura 9 - Esquema da construção do plasmídio integrativo YlpC.....	74
Figura 10 - Esquema da construção do plasmídio integrativo YlpCGC e obtenção do fragmento CGC	75
Figura 11 - Padrão de restrição dos plasmídios YlpC e YlpCGC	76
Figura 12 - Atividade amilolítica dos transformantes YPH252.....	77
Figura 13 - Curva de crescimento de FTPT e FTPT/CGC	78
Figura 14 - Foto de DNA cromossomal de <i>S. cerevisiae</i> ----	79
Figura 15 - Membrana de nylon - "Southern blot"	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

RESUMO

Para a transformação tradicional da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são empregadas cepas hospedeiras que devem necessariamente conter um marcador de auxotrofia, de forma que as células transformadas possam ser selecionadas posteriormente por complementação gênica. Em nosso trabalho construímos um vetor, que dispensa a necessidade destas marcas de auxotrofia, permitindo transformar cepas de leveduras selvagens e, portanto, até mesmo algumas cepas de interesse industrial.

Este vetor é composto por um cassete de expressão de interesse (promotor, gene estrutural e terminador) ladeado por dois fragmentos do gene *CAN1* de *S. cerevisiae*. Uma vez que as extremidades deste fragmento, são homólogas às sequências do gene *CAN1* da levedura a ser transformada, este irá causar a disrupção genética na região homóloga. Por sua vez, o gene *CAN1*, quando funcional, é responsável pela permease do aminoácido arginina. Este aminoácido é análogo à canavanina, que entra na célula pelo mesmo mecanismo da arginina, e é uma droga com efeito letal à *S. cerevisiae*.

Após a introdução deste novo vetor, a célula torna-se resistente à canavanina, por impedir a entrada de arginina e, conseqüentemente de canavanina na célula, permitindo a seleção dos transformantes e mantendo a informação genética adicional clonada 100% estável.

Em nosso trabalho, para analisar esta proposta, empregamos o cassete de expressão em que a sequência sinal e estrutural da glicoamilase encontram-se clonadas sob a regulação das sequências promotoras e terminadoras da PGK de *S. cerevisiae*.

Obtivemos sucesso na transformação, tanto de uma cepa de laboratório com marcas auxotróficas, como de células de cepas selvagens, sem nenhuma marca de auxotrofia, utilizadas em processos industriais, FTPT e HTYM-81 que originalmente são sensíveis à canavanina.

SUMMARY

Traditionally auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* are used as host cells for transformation since the selection of transformants is based on genetic complementation by a marker gene carried on the vector. In this work a vector was constructed which overcomes the need for auxotrophic mutants allowing selection of transformed wild-type strains, including some strains of industrial interest.

The vector contains an expression cassette (promoter, structural gene and terminator) which is flanked by two fragments of the *CAN 1* gene of *S. cerevisiae*. Since the ends of this fragment are homologous to the host *CAN 1* gene, it disrupts that gene upon transformation. The *CAN 1* gene codes for the permease of the amino acid arginine which is analogous to canavanine and enters the cell by the same mechanism. Canavanine, however, is a lethal drug for *S. cerevisiae*.

Since transformants become resistant to canavanine, because no permease is synthesized, and thus canavanine cannot enter the cell, transformants are easily selected and the additional cloned genetic information is 100% stable.

In this work, we employed the expression cassette containing the signal and the coding sequences of glucoamylase of *Aspergillus awamori* under the control of the promoter and the terminator of phosphoglycerate kinase (*PGK*) of *S. cerevisiae*.

We successfully transformed a laboratory yeast strain carrying auxotrophic markers, as well as two wild-type strains, employed in industrial processes, which originally were sensitive to canavanine.

ABREVIATURAS

ade - adenina

Ap - ampicilina

ARS - "autonomously replicating sequence" - sequência de replicação autônoma

cDNA - DNA complementar

DNA - ácido desoxirribonucleico

ENO1 - enolase

his - histidina

Kb - 1000 pares de bases

leu - leucina

lys - lisina

M - molar

mA - 10^{-3} Ampère

μ g - 10^{-6} grama

ml - 10^{-3} litro

μ l - 10^{-6} litro

mM - 10^{-3} molar

ng- 10^{-9} grama

pb - pares de bases

PGK - fosfoglicerato quinase

r.p.m. - rotação por minuto

Tc - tetraciclina

trp - triptofano

UAS - "upstream activator sequence" - sequência ativadora a montante

ura - uracil

UV - radiação ultravioleta

INTRODUÇÃO

A levedura vem sendo utilizada pelo homem há mais de 8.000 anos em processos de fermentação alcoólica, mas, só em meados de 1850, este processo começou a ser compreendido, tendo sido a levedura identificada como o agente fermentador. Nos dias de hoje é considerada como um organismo ideal para vários processos biotecnológicos (revisão em Schenberg *et al.*, 1993).

Por volta de 1930, iniciaram-se as pesquisas genéticas com levedura, um microrganismo, que é de fácil manuseio, por ter muitas características semelhantes às das bactérias, como fácil cultivo e manutenção, reprodução rápida em meios de cultura simples, capacidade de formar colônias isoladas em meios sólidos, entre outras. A levedura passou então a ser objetivo de experimentos de Genética de eucariotos, permitindo rápidos avanços nesta área. A utilização de leveduras para tais finalidades traz vantagens sobre as bactérias, por se tratar de um organismo eucarionte, com organização celular mais complexa, apresentando maior semelhança aos mamíferos.

A espécie de levedura mais estudada e mais bem conhecida é *Saccharomyces cerevisiae*. O tempo de geração varia de acordo com a linhagem, sendo em geral por volta de 90 minutos em meio completo a 28°C. Esta espécie pode apresentar-se como organismo unicelular na forma haplóide ou diplóide, sendo que o núcleo de uma célula haplóide contém aproximadamente 14.000Kb de DNA, distribuídos em 16 cromossomos lineares com tamanho entre 250 e

2.000Kb (Philippsen *et al.*, 1991; Mortimer *et al.*, 1991). A levedura pode alternar seu ciclo de vida, com uma fase sexuada e uma fase assexuada ou vegetativa (Fig. 1 - a seguir). Na fase vegetativa, as células se reproduzem apenas por divisões mitóticas e, tanto células diplóides quanto haplóides, podem ser mantidas em condições de laboratório. As células no estado haplóide (n) apresentam dois tipos de acasalamento ($MATa$ ou $MAT\alpha$), sendo que o cruzamento entre células com tipo de acasalamento oposto leva ao surgimento de células diplóides ($2n$) (revisão em Castilho-Valavicius *et al.*, 1992). As células diplóides podem continuar em divisão mitótica até que se apresentem condições desfavoráveis, que induzem o processo da esporulação e ocorram divisões meióticas, acarretando a formação de 4 ascósporos haplóides esféricos (2 $MATa$ e 2 $MAT\alpha$) contidos num envoltório de parede espessa, chamado de asco (Fig.1). Quando as condições favoráveis para o crescimento se apresentam novamente, os esporos aumentam de tamanho e podem formar novas colônias de células. Os esporos haplóides germinados de ambos os tipos de acasalamento, após cruzamento levam à formação de zigotos diplóides. Em laboratório, os ascos podem ser dissecados com ajuda do microscópio óptico, permitindo a análise genética das tétrades de esporos. Estas vantagens oferecidas pela levedura permitem a obtenção e a análise de mutantes com considerável facilidade na célula haplóide e o estudo do seu caráter dominante ou recessivo na célula diplóide. Permite também a análise de mutantes de genes essenciais, que só podem existir em heterozigotos.

Fig.1 - Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. Os dois tipos de acasalamento *a* e *α*. Em meio nutricional rico, células haplóides e diplóides se reproduzem por mitose; em meio pobre, células diplóides *a/α* sofrem meiose. Fonte: Watson *et al.* (1987)

Em 1978, dois grupos independentes de pesquisa (Hinnen *et al.*, 1978 e Beggs, 1978) demonstraram pela primeira vez ser possível a introdução e manutenção de DNA exógeno em *S. cerevisiae*. O avanço do desenvolvimento das técnicas de manipulação genética de *S. cerevisiae* tornou esta levedura adequada para os trabalhos de Biologia Molecular. Além de ser possível utilizar *S. cerevisiae* como hospedeira de transformação, o

fato da levedura ser um eucarionte, com a vantagem das condições extremamente mais simples de cultivo em relação às células de eucariontes superiores, torna este sistema ideal para a expressão de genes de eucariontes superiores, inclusive humanos. Por ser um eucarionte, a levedura é capaz de introduzir uma série de modificações pós-traducionais em proteínas heterólogas, como, por exemplo, a glicosilação de algumas proteínas, que, só após esta modificação, passam a ter a atividade biológica desejada (Romanos *et al.*, 1992).

Como componentes da célula bacteriana constituem substâncias alérgicas e pirogênicas, existe sempre a preocupação do produto biotecnológico produzido por bactéria estar contaminado por componentes bacterianos (Romanos *et al.*, 1992). *S. cerevisiae* traz também a vantagem de ser um organismo não patogênico, não produzindo toxinas nocivas ao homem e mamíferos em geral, fazendo com que produtos biotecnológicos produzidos por *S. cerevisiae*, como insulina humana, vacinas e outros, tenham melhor aceitação no mercado do que aqueles produzidos por bactérias.

A princípio, a transformação genética de levedura foi obtida pela técnica de transformação de esferoplastos seguida de sua regeneração. Esta técnica consiste no tratamento das células com enzimas que causam a hidrólise parcial da parede celular. Após a entrada do DNA exógeno, a parede da célula tem que ser regenerada, o que se obtém mantendo os esferoplastos num meio contendo um estabilizador osmótico (sorbitol) e alta concentração de ágar, que funciona como estabilizador mecânico. Esta técnica de transformação é relativamente eficiente ($\sim 1-5 \times 10^4$ transformantes/ μg

DNA) (Botstein e Davis, 1982), mas é bastante trabalhosa. Em 1983, foi descrito um novo método de transformação de células intactas, que emprega cátions metálicos monovalentes, como, por exemplo, acetato de lítio (Ito *et al.*, 1983). Este método é relativamente rápido e simples, mas resulta em menor eficiência de transformação ($\sim 10^3$ transformantes/ μg de plasmídio epissomal) (Botstein e Davis, 1982). Atualmente, pode-se usar o método da eletroporação, muito mais rápido e extremamente simples, para a transformação genética de levedura. Este método consiste em abrir poros na célula através da ação de corrente elétrica, possibilitando assim a entrada do DNA exógeno com mais eficiência e a recuperação dos transformantes no meio seletivo com maior facilidade em relação aos demais métodos (Meilhoc *et al.*, 1990).

Hoje em dia, a metodologia para a clonagem de genes exógenos em levedura está bem desenvolvida. A informação exógena é introduzida nas células através de vetores, que são plasmídios construídos utilizando-se sequências de *E. coli* e sequências de *S. cerevisiae*, podendo assim, o mesmo vetor ser usado para transformar *E. coli* e *S. cerevisiae*. Essas moléculas são conhecidas como vetores-pontes ou vetores bifuncionais. Um vetor bifuncional deve, portanto, conter marcadores genéticos, que permitam a seleção de transformantes de *E. coli* e de *S. cerevisiae*. É necessário que contenha ao menos um marcador de seleção para bactérias, como genes que conferem resistência a antibióticos, tornando as células bacterianas transformadas resistentes ao antibiótico, como a ampicilina ou a tetraciclina, por exemplo; e é necessário que contenha ao menos um marcador de seleção para

levedura. No caso da levedura, por se tratar de um organismo eucariótico, não é possível usar antibióticos convencionais para a seleção dos clones transformantes, uma vez que estas substâncias só têm ação sobre procariotos. São usados rotineiramente marcadores de auxotrofia que consistem de mutações no *locus* responsável pela síntese de um determinado aminoácido ou base nitrogenada. É importante que a marca seja causada por mutação irreversível, sendo comumente usadas as marcas *leu2*, *his3*, *ura3*, *trp1*, entre outras. O plasmídio bifuncional, por sua vez, deve conter a sequência do alelo selvagem *LEU2*, *HIS3*, *URA3* ou *TRP1*. Células transformantes são selecionadas em meio mínimo por complementação gênica.

O vetor bifuncional, além de conter genes que constituam marcadores de seleção em bactéria e em levedura, precisa conter sequências de DNA responsáveis pela sua replicação na bactéria. Isto porque *E. coli* é utilizada como hospedeira dos plasmídios em todas as fases da construção molecular *in vitro* dos plasmídios recombinantes. É em *E. coli* que se amplifica e é isolado o DNA plasmidial em quantidades necessárias para ser utilizado nas várias etapas da pesquisa, como, por exemplo, para a transformação de levedura, que necessita de 1 a 10µg de DNA, dependendo do tipo de vetor e método utilizado. O vetor bifuncional pode ou não conter a sequência de origem de replicação em levedura, como veremos adiante. Caso *S. cerevisiae* seja transformada com um vetor que contenha tal sequência, este passará a se replicar de forma autônoma. Mas, se o vetor não carregar essa sequência, só será selecionada a célula transformante que tiver a molécula de DNA

exógeno integrada em algum dos seus cromossomos. Esta integração deve ocorrer nas sequências de DNA homólogas àquela contida no vetor, ou seja, por recombinação do alelo selvagem no plasmídeo com o alelo mutado do cromossomo da célula.

Na utilização biotecnológica da *S. cerevisiae*, busca-se condições ideais, em que o gene de interesse seja expresso, e/ou a proteína desejada é secretada em grandes quantidades em fermentadores industriais. Em um vetor bifuncional de interesse biotecnológico, é indispensável que este contenha um cassete de expressão, formado por uma sequência promotora, o gene estrutural e a sequência terminadora de transcrição, de forma que possa ocorrer perfeitamente a transcrição e a tradução do gene de interesse, resultando na produção da proteína desejada. Já estão disponíveis vários promotores de levedura bem conhecidos, que foram sequenciados e clonados em diversos plasmídios, facilitando a construção de novos vetores de expressão. Os promotores de levedura são em geral altamente complexos, contendo múltiplas sequências de ativação a montante (UASs), sítios de regulação negativa e múltiplos elementos TATA associados a diferentes sítios iniciadores. Muitos promotores são regulados, mas os promotores mais fortes, os de genes de enzimas da via glicolítica, são pobremente regulados, o que os torna impróprios para alguns usos em culturas de larga escala quando é de interesse deixar a cultura atingir altos níveis de densidade celular antes de que ela comece a expressar a proteína heteróloga. Promotores como o do gene da álcool desidrogenase I (ADH1), da fosfoglicerato quinase (PGK) e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAP) são comumente

utilizados, no laboratório, tendo sido, em alguns casos, empregados em processos industriais. A partir do promotor *PGK*, por exemplo, a expressão de α -interferon humano foi induzida de 20 a 30 vezes por adição de glicose à cultura como fonte de carbono (Tuite *et al.*, 1982). Atualmente, existe uma grande variedade de promotores originais e artificiais, com diferentes intensidades de força e com capacidade de indução ou repressão reguladas por diversos fatores (Romanos *et al.*, 1992).

O avanço nesta área levou ao desenvolvimento de vetores para transformação genética de *S. cerevisiae* com características variadas, possibilitando uma escolha do vetor de acordo com a finalidade específica da clonagem adotada. Tais vetores podem ser classificados da seguinte forma:

(I) **Plasmídios integrativos ("Yeast Integrative plasmids" - YIp)**, que não sofrem replicação autônoma por carecerem de uma origem de replicação de levedura, mantendo-se com uma cópia por célula na descendência da levedura originalmente transformada, quando integrado no cromossomo; conseqüentemente a frequência de transformação destes plasmídios é muito baixa, da ordem de 1 a 10 transformantes/ μ g de plasmídio. A frequência de perda deste plasmídio pela célula é da ordem de 0,1% por geração, sendo considerado o tipo de plasmídio mais estável (Botstein e Davis, 1982) (Fig. 2).

(II) **Plasmídios epissômicos ("Yeast Epissomal plasmids" - YEpl)** contêm a origem de replicação do plasmídio 2μ natural da levedura. Transformam levedura com alta eficiência (10^3 a 10^4 transformantes/ μ g de plasmídio) e mantêm-se em aproximadamente

30 cópias por célula, porém são menos estáveis que o plasmídio integrativo; a perda mitótica destes plasmídios é da ordem de 1% por geração, em meio não seletivo (Botstein e Davis, 1982) (Fig. 3).

(III) **Plasmídios replicativos ("Yeast Replicative plasmids" - YRp)**, replicam-se uma vez em cada ciclo celular. Sua duplicação na célula ocorre devido à presença de fragmentos responsáveis pela replicação do DNA cromossômico, os fragmentos ARS. Os plasmídios replicativos estão presentes de 3 a 30 cópias por célula. São extremamente instáveis ao longo das divisões mitóticas e meióticas, apresentando perda de plasmídio em mais de 1% por geração (Botstein e David, 1982).

(IV) **Plasmídios centroméricos ("Yeast Centromeric plasmids" - YCp)** além da origem de replicação, contêm sequências de DNA, que correspondem a regiões centroméricas dos cromossomos, que garantem os movimentos ordenados dos cromossomos durante a divisão celular. Estes plasmídios são muito estáveis e transformam levedura com alta eficiência, sendo que a perda mitótica é menor que 1% por geração em meio não seletivo (Botstein e Davis, 1982). Estão presentes em 1-2 cópias por célula.

(V) **Cromossomos artificiais ("Yeast Artificial-Chromosome" - YAC)** vêm sendo usados como vetores para clonagem de fragmentos de DNA exógeno de até 400Kb e, portanto, muito maiores do que é possível clonar nos vetores acima descritos. São moléculas de DNA com vários kilobases, de forma linear, e podem permanecer como réplicas de DNA genômico na célula (Burke *et al.*, 1991) Os YACs transformam levedura com baixa eficiência, devido ao tamanho dessas moléculas, porém, por se tratarem de mini-

cromossomos resultam em transformantes relativamente estáveis.

A utilização de qualquer um dos plasmídios descritos, impõe todavia, que se empregue uma cepa hospedeira com marcador de auxotrofia adequado para que se possa selecionar os transformantes em meio mínimo por complementação gênica.

Entretanto, leveduras de interesse industrial, como cepas selecionadas para a produção de etanol, cepas produtoras de vinho, cerveja e ainda cepas empregadas na panificação, são cepas selvagens, e portanto não têm qualquer marcador de auxotrofia. Em outras palavras, estas cepas foram, ao longo de milênios, selecionadas para os processos em que são empregadas, sendo os melhores microrganismos disponíveis para cada processo específico. Estas cepas poderiam ainda ser melhoradas para os processos em que já vêm sendo empregadas e/ou aproveitando sua capacidade de crescimento mais vigoroso do que as cepas de laboratório, para a produção de proteínas de interesse biotecnológico. Todavia, estas cepas não são adequadas para receberem informações genéticas adicionais pela técnica de clonagem molecular, uma vez que, sendo selvagens, não podem ser empregadas como hospedeiras de transformação dos plasmídios convencionais já mencionados.

Para contornar este problema, já foram identificados alguns produtos gênicos que permitem a seleção positiva de transformantes. É o caso das resistências ao cobre (CUP), SMR1, G418, metotrexato, cloranfenicol, higromicinaB, cicloheximida, metilglicoglioxal (Kitamoto *et al.*, 1990) e formaldeído (Wehner *et al.*,

1993). Os genes que codificam tais resistências, quando presentes em plasmídios, possibilitam a seleção de clones transformantes em meio contendo a droga, de maneira semelhante à seleção de bactérias transformantes em meio com antibióticos. Porém, o emprego deste tipo de seleção como prática usual para trabalhos de clonagem molecular não é sempre adequado. Por exemplo, a resistência ao cobre só se manifesta quando o gene de resistência está presente em múltiplas cópias e, ainda, as diferentes cepas não apresentam um único nível basal de sensibilidade. Antibióticos como higromicina e geneticina são extremamente caros e quimicamente lábeis; outras drogas não são consideradas adequadas para seleção de cepas envolvidas com produção de alimentos, por serem tóxicas, ou causarem algum prejuízo ao usuário a que for destinado o produto final.

Recentemente foi demonstrada a possibilidade de provocar interrupção de um gene através da recombinação entre as sequências homólogas de DNA do genoma e as presentes em fragmento de DNA linear (Rothstein, 1983). A técnica da interrupção gênica vem sendo muito usada para se construir mutantes contendo deleções em genes de auxotrofia, e também de mutantes defectivos na biossíntese de diversas proteínas cujo papel na célula se deseja estudar. Para causar mutação através deste processo, deve-se empregar na transformação de levedura um fragmento de DNA que contenha o gene de seleção, ladeado por sequências do gene de interesse. Uma vez que na levedura ocorre preferencialmente recombinação homóloga, este fragmento deve conter, de cada lado, ao menos 250 pares de bases do gene alvo para que a

recombinação seja eficiente (Ausubel et al., 1989). Terminações de DNA livre são altamente recombinogênicas, promovendo recombinação com as sequências homólogas no genoma da levedura, resultando em troca do gene selvagem pela cópia contendo a disrupção gênica (Rothstein, 1983) (veja esquema.abaixo).

Recentemente Kitamoto *et al.* (1990) propuseram um método para a obtenção de cepas de levedura de sakê de interesse industrial através da técnica de disrupção gênica. Uma vez que as cepas industriais são poliplóides, estes autores mostraram que, após a indução da disrupção ("gene replacement") do gene *URA3* de um dos cromossomos, a levedura é crescida em meio completo para que ocorra conversão gênica. Em seguida, é feita a seleção final da cepa

ura3/ura3 pronta para receber os plasmídios convencionais disponíveis para transformação genética de leveduras. Este tipo de estratégia leva à seleção de clones *ura3* contendo deleções, sendo portanto a mutação irreversível e perfeitamente estável.

Com base no exposto acima e, dando sequência aos trabalhos do nosso laboratório, que já vem há muitos anos se dedicando a expressar e/ou expressar e secretar proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* (Schenberg *et al.*, 1993), propusemo-nos a construir um novo tipo de vetor, que fosse capaz de promover a transformação genética de *S. cerevisiae* sem conter sequências de DNA bacteriano, apresentando alta estabilidade mitótica e que pudesse ser empregado como vetor de transformação de leveduras de laboratório sem qualquer marcador de auxotrofia. Isto constituiria um primeiro passo para obtermos um vetor para a transformação estável de cepas de levedura de interesse industrial, num processo semelhante ao conseguido por Kitamoto *et al.* (1990).

Este novo vetor não deveria inserir sequência de resistência no genoma da levedura deveria, permitir que cepas selvagens, sem qualquer marcador genético, como as cepas industriais, fossem empregadas como hospedeiras, resultando em transformantes altamente estáveis que pudessem crescer em meio mínimo ou completo, sem adição de substâncias para a seleção das células transformantes desejadas. Um vetor deste tipo apresentaria várias vantagens, entre elas a de ordem econômica, por dispensar qualquer substância adicional para a constante seleção das células transformadas, além de não comprometer o meio de cultura com substâncias nocivas ao homem, quando sintetiza produto alimentar

ou clínico.

Idealizamos para tanto, construir um vetor de transformação que introduzisse a informação desejada na célula de levedura por disrupção gênica. Em contraste com a integração de um plasmídio inteiro, a integração de um fragmento não gera uma duplicação gênica, que é fonte de instabilidade, já que pode ocorrer o processo inverso em que o plasmídio é excisado através de "crossing-over" na duplicação. O método de disrupção gênica pode ser aplicado tanto em linhagens de levedura haplóides como diplóides ou poliplóides, resultando numa mutação estável, não reversível, como descrito por Kitamoto et al. (1990). Este fato permite a transformação genética de cepas selvagens, sem marcas auxotróficas, como cepas utilizadas em processos industriais, trazendo a vantagem de introduzir apenas o DNA exógeno de interesse, sem adicionar sequências desnecessárias à expressão da proteína desejada.

Para a construção desse novo vetor, consideramos o gene *CAN1*, presente no braço esquerdo do cromossomo V de *S. cerevisiae*, que codifica a permease responsável pela entrada do aminoácido arginina na célula durante crescimento em meio mínimo (Whelan *et al.*, 1979). Este é o único sistema de transporte da arginina do meio de cultura para o interior da célula (Broach *et al.*, 1979), embora sirva também para transportar, com menor afinidade, aminoácidos básicos para a célula como, lisina, histidina e ornitina (Cooper, 1982).

A arginina tem estrutura molecular muito semelhante à da canavanina (veja Fig.4 a seguir), que é um aminoácido básico isolado de algumas leguminosas (The Merck Index, 1976).

Consequentemente, o produto gênico de *CAN1*, a arginina permease, também permite a entrada de canavanina na célula, sendo que esta substância é tóxica, exercendo efeito letal para levedura.

<p>Arginina: $C_6H_{14}N_4O_2$</p> <p>$H_2NC(NH)NHCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$</p>	<p>Canavanina: $C_5H_{12}N_4O_3$</p> <p>$H_2NC(NH)NHOCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$</p>
--	--

Fig.4- Fórmula molecular dos aminoácidos arginina e canavanina.

Fonte: The Merck Index, 1976.

Sabe-se que quando o gene *CAN1* sofre alguma mutação, a permease da arginina torna-se não-funcional, incapacitando a levedura de incorporar arginina e, consequentemente, canavanina do meio, tornando-a portanto resistente à droga. Esta situação torna possível e relativamente fácil selecionar as células portadoras de mutações no gene *CAN1* (Broach *et al.*, 1979), que serão as únicas capazes de crescer em meio contendo canavanina. Como a levedura selvagem é capaz de sintetizar arginina, as células com mutação em *CAN1* são perfeitamente viáveis.

Numa cepa diplóide, é suficiente que um dos cromossomos contenha o gene *CAN1* para que esta cepa seja sensível à canavanina, já que uma cópia codifica para uma permease funcional.

Em 1979, Broach *et al.* clonaram o gene *CAN1* de levedura no plasmídio YEp13, construindo o plasmídio TLC-1 (Fig.5). *CAN1* foi um dos primeiros genes isolados de levedura por complementação gênica, e em 1985, Hoffmann publicou a sequência completa desse gene, com 2063 pares de base.

Para obter um vetor de clonagem nas condições que desejávamos neste trabalho, era importante utilizar um gene reporter que permitisse confirmar o sucesso da transformação, comprovando ter ocorrido a disrupção gênica. Escolhemos o cDNA da glicoamilase de *A. awamori* pelas seguintes razões: 1) já estar disponível no laboratório; 2) por ser de grande valor para pesquisas biotecnológicas; 3) por ser um marcador direto de seleção, para *S. cerevisiae*, que não produz normalmente amilases.

A glicoamilase (a 1,4-D-glucan-glucohidrolase E.C. 3.2.1.3.) de *A. awamori* é uma exohidrolase, que catalisa a liberação de resíduos de glicose a partir de extremidades não redutoras de amido e outros polímeros relacionados (Yamasaki *et al.*, 1977).

Innis *et al.* (1985) observaram que o gene da glicoamilase pode se expressar em *S. cerevisiae* quando 4 introns existentes no gene natural são deletados, uma vez que a levedura não é capaz de reconhecer e processar os introns do gene do fungo. Para a expressão da glicoamilase em levedura, este gene de *A. awamori*, que já havia sido sequenciado anteriormente (Nunberg *et al.*, 1984), foi clonado num vetor de expressão, sob controle do promotor e seguido do terminador da enolase (ENO1). A cepa transformada com esse vetor foi capaz de expressar, secretar e glicosilar adequadamente a glicoamilase (Innis *et al.*, 1985).

No nosso grupo de pesquisas, também foi obtida a expressão e secreção da glicoamilase de *A. awamori*, através de uma abordagem diferente.

Camargo (1992) construiu um vetor contendo um cassete de expressão/secreção formado pelo cDNA da glicoamilase de *A. awamori*. O cDNA utilizado continha a sequência codificadora do peptídio-sinal da proteína glicoamilase de *A. awamori* e não continha introns. O cassete de expressão/secreção é regulado pela ação do promotor da fosfoglicerato quinase (*PGK*) e do terminador *PGK* de levedura. O plasmídio YEpG2 permite a remoção do cassete de expressão, assim como, a remoção do gene estrutural utilizando-se enzimas de restrição (Fig.3). Isto facilitou a utilização do cassete de expressão na construção de um novo vetor como marcador de seleção, pois, ele possibilita observar halos ao redor das colônias de células transformadas, quando cultivadas em meios de cultura contendo amido e submetidas a vapor de iodo.

OBJETIVOS

- 1- Construir um vetor para transformação de *Saccharomyces cerevisiae* que se mantenha mendelianamente estável e, que possa ser empregado para transformar células de leveduras selvagens que não possuam qualquer marcador de auxotrofia.
- 2- Construir um vetor bifuncional, com sítio único de clonagem para um cassete de expressão de interesse no interior da sequência de DNA do gene *CAN1* que codifica a permease da arginina em *S. cerevisiae*. Este novo vetor, após digestão com enzima de restrição, permitirá a liberação de um fragmento de DNA dupla fita, contendo o cassete de expressão ladeado pelas sequências *CAN1*, capaz de transformar leveduras sensíveis à canavanina através de disrupção gênica, tornando-as resistentes, com 100% de estabilidade das informações clonadas.
- 3- Clonar o cassete de expressão/secreção da glicoamilase do fungo *Aspergillus awamori* neste vetor.
- 4- Realizar esta construção de forma a permitir a fácil remoção do fragmento de DNA de dupla fita que contenha o gene de interesse intercalado entre as sequências do gene *CAN1*.

- 5- Utilizar este fragmento para a transformação genética de leveduras sensíveis à canavanina. Selecionar os transformantes que crescerem em meio contendo canavanina: estes clones serão mutantes no *locus CAN1* do cromossomo V, como resultado da inserção do referido fragmento.
- 6- Analisar a estabilidade dos transformantes obtidos, que deverá ser próxima de 100%, já que o fragmento exógeno estará integrado a nível cromossômico, não duplicado, ao invés de estar situado num plasmídio.
- 7- Analisar o potencial deste vetor para a transformação de cepa de levedura industrial sem marcas de auxotrofia.

MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAGENS E PLASMÍDIOS

1.1.) Bactéria:

Escherichia coli

-JM101 - *Sup E thi Δ (lac⁻ pro AB) F' [tra D 36 pro AB⁺ lac I^q lac Z Δ M15]* (Sambrook *et al.*, 1989)

1.2.) Levedura:

Saccharomyces cerevisiae

-YPH252: *MAT_α, ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp1-Δ1, his3-Δ200, leu2-Δ1, CAN1* (Linhagem gentilmente cedida por R. S. Sikorski & P. Hieter, 1989).

-YPH274: *MAT_{a/α}, ura3-52/ura3-52, lys2-801^{amber}/lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}/ade2-101^{ochre}, trp1-Δ1/trp1-Δ1, his3-Δ200/his3-Δ200, leu2-Δ1/leu2-Δ1* (Sikorski & Hieter, 1989).

-FTPT: *CAN1*. (Cedida gentilmente pela Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello, Campinas-SP). (Kaji, 1989).

-HTYM-81: *CAN1* (Cedida gentilmente pela Profa. Dra. Cecília Lalice - UNESP-Araraquara). (Lalice *et al.*, 1993).

1.3.) Vetores de transformação de levedura:

- YEp24: 2 μ , *URA3*, Ap^R, Tc^R (Botstein *et al.*, 1979)
- YIp5: *URA3*, Ap^R, Tc^R (Fig.2) (Struhl *et al.*, 1979)
- TLC-1: 2 μ , *LEU2*, *CAN1*, Ap^R (Fig.5) (Broach *et al.*, 1979)
- YEpG2: 2 μ , *LEU2*, *PPGK*: glicoamilase, Ap^R (Fig.3) (Camargo, 1992).
- YIp5-H: *URA3*, Ap^R, Tc^R (Construído neste trabalho, ver figura 6).
- YIpC: *URA3*, Ap^R, *CAN1*. (Construído neste trabalho, ver figura 7).
- YIpCGC: *URA3*, Ap^R, *PPGK*: contendo o cassete de expressão/secreção da glicoamilase, ladeado por sequências de *CAN1*. (Construído neste trabalho, Fig. 8).
- CGC: fragmento *HindIII-HindIII* do plasmídio YIpCGC que contém o cassete de expressão *PPGK*: glicoamilase ladeado por sequências de *CAN1*. (Construído neste trabalho).

2. CULTIVO DAS BACTÉRIAS

Empregou-se meio completo para o cultivo das bactérias. Os meios sólidos eram idênticos aos meios líquidos, somente acrescidos de 2% de ágar-ágar Difco (Miller, 1972). Quando necessário, adicionou-se solução de ampicilina ou tetraciclina para seleção das bactérias resistentes a estes antibióticos. Usou-se uma concentração final de 50 μ g/ml e 25 μ g/ml, para a ampicilina e a tetraciclina, respectivamente.

As bactérias semeadas em meio sólido eram incubadas em

estufa a 37°C. O crescimento em meio líquido era feito em estufa a 37°C ou com aeração em "shaker", a 37°C.

2.1.) Meio Completo (YT):

0,8% Bacto triptona Difco,
0,5% cloreto de sódio,
0,5% Bacto extrato de levedura.

3. CULTIVO DAS LEVEDURAS

Empregou-se meio completo ou meio mínimo suplementado para o cultivo das cepas. Os meios sólidos eram idênticos aos meios líquidos, somente acrescidos de 2% de ágar-ágar Difco (Sherman *et al.*, 1979). Em alguns casos acrescentou-se amido 0,5% ao meio sólido.

As leveduras semeadas em meio sólido eram incubadas em estufa a 28°C. O crescimento em meio líquido era feito com aeração em "shaker", a 28°C.

3.1.) Meio Completo (YPD):

1% Bacto extrato de levedura Difco,
2% Bacto peptona Difco,
2% glicose.

3.2.) Meio Completo com Amido (YPDA):

ídem ao meio YPD, acrescido de 0,5% de amido

Difco.

3.3.) Meio Mínimo (SD):

0,67% Bacto extrato de levedura sem aminoácidos
("yeast nitrogen base without amino acids") Difco,
2% glicose.

3.4.) Meio Mínimo Suplementado:

Meio SD suplementado com aminoácidos ou bases nitrogenadas (concentração final 40µg/ml) necessários para suprir as deficiências de auxotrofia das linhagens em cultivo. Usou-se também sulfato de L-canavanina, a 60µg/ml na concentração final, para seleção dos transformantes canavanina-resistentes.

3.5.) Meio Mínimo com Amido (SDA)

Ídem ao meio SD, acrescido de 0,5% de amido.

4. SOLUÇÕES UTILIZADAS

Os reagentes utilizados para preparo das soluções e tampões foram todos de grau analítico. As soluções foram, em geral, autoclavadas a 120 atmosferas por 15 minutos.

4.1.) Solução I:

Tris HCl 25mM,
EDTA 10mM,

glicose 50mM, pH 8,0.

4.2.) Solução II:

NaOH 0,2N,
SDS 1%.

4.3.) Solução III:

acetato de sódio 3M,
ácido acético 2M, pH5,2

4.4.) Solução P1:

Tris HCl 50mM, pH8,0
EDTA 10mM
Rnase A 100µg/ml

4.5.) Solução P2:

ídem à solução II

4.6.) Solução P3:

acetato de potássio 2,55M, pH4,8 a 5,2

4.7.) TE:

Tris-HCl 25mM, pH 8,0
EDTA 10mM

4.8.) TBE 10X:

Trizma base 0,89M

ácido bórico 29mM pH 8,0
EDTA 8mM

4.9.) Tampão Acetato:

acetato de sódio 0,2M, pH 4,5

4.10.) LTE:

Acetato de Lítio 0,1M,
Tris HCl 0,01M,
EDTA 1mM.

Obs.: Esta solução era sempre esterilizada por filtração, com filtro tipo Millipore 0,45 μ m.

4.11.) PLTE:

PEG 4000 (polietilenoglicol) 40% (peso/volume)
em LTE.

4.12.) NET Baixo Sal:

NaCl 150mM,
EDTA 0,1mM, pH 8,0
Tris HCl 20mM

4.13.) NET Alto Sal:

NaCl 1,5M (em tampão TE)

4.14.) Solução Amido 1%:

solução de amido 1% em tampão acetato 0,16M.

4.15.) Stop Mix 10X:

azul bromofenol 0,5%

EDTA 100mM, pH8,0

glicerol 50%

4.16.) Solução Desnaturante:

NaCl 1,5M

NaOH 0,5M

4.17.) Solução de Hibridização

5X SSC

0,1% N-lauroilsarcosina, Na-salt (Sigma)

0,02% SDS

1% reagente bloqueador*

Obs.: Esta solução era sempre preparada com 1 hora de antecedência, e a solução dissolvida a 65°C.

4.18.) SSC 20X:

NaCl 3,0M

citrato trissódico 0,3M pH7,0

4.19.) Solução Neutralizante:

NaCl 1,5M

Tris-HCl 0,5M pH7,2

EDTA 1,0M pH8,0

4.20.) Solução de Lavagem 1:

2X SSC;
.0,1% SDS

4.21.) Solução de Lavagem 2:

0,1X SSC
0,1% SDS

4.22.) Tampão 1:

Tris-HCl 100mM
NaCl 150mM pH7,5

4.23.) Tampão 2:

0,5% reagente bloqueador*
dissolvido em tampão 1

Obs.: Esta solução era sempre preparada com 1 hora de antecedência, e a solução dissolvida a 65°C.

4.24.) Tampão 3:

Tris-HCl 100mM
.NaCl 100mM pH9,5
.MgCl₂ 50mM

4.25.) Tampão 4:

.Tris-HCl 10mM
EDTA 1mM pH8,0.

4.26.) Solução de Coloração

45µl solução NBT*

35µl solução X-fosfato*

10ml tampão 3.

Obs.: Esta solução sempre foi preparada no imediatamente antes do uso.

* soluções e reagentes do "kit" DIG de marcação e detecção de DNA não radioativo (DNA Labeling and Detection Nonradioactive - Boehringer Mannheim - Germany)

5. EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDIOS

A extração dos plasmídios hospedados em *E. coli* JM101 foi realizada a partir de 500ml de cultura ou de pequenos volumes ("mini-prep"), de acordo com a necessidade de maior ou menor quantidade de DNA exigida pelo trabalho.

5.1.) "Mini-prep"

Partiu-se de 3ml de cultura crescida a 37°C com agitação, durante uma noite.

Centrifugaram-se 1,5ml da cultura, em tubos do tipo "eppendorf", por 2 minutos em microcentrífuga. Repetiu-se a centrifugação com o volume restante no mesmo tubo. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 300µl de

solução P1. Adicionaram-se 300 μ l de solução P2, misturou-se delicadamente e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, acrescentaram-se 300 μ l de solução P3, misturando delicadamente e incubando por 60 minutos a 4°C. Centrifugou-se por 10 minutos a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,8 volume de isopropanol, misturou-se por inversão e incubou-se durante 30 minutos a 4°C. Centrifugou-se por 10 minutos, jogou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com etanol 70%. Finalmente secou-se o sedimento, que foi ressuspensionado em 50 μ l de água destilada (Sambrook *et al.*, 1989, modificado, Vol.1-pág.1.25).

5.2.) Preparação de DNA plasmidial em larga escala

Partiu-se de uma cultura de 500ml, incubada nas mesmas condições descritas acima, após 2h30' adicionou-se solução de cloranfenicol para atingir uma concentração final de 170 μ g/ml. Incubou-se a cultura por mais 16h a 37°C.

Centrifugou-se a cultura por 15 minutos a 4.000r.p.m. a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 9ml de solução I, adicionando 1ml de solução I contendo 10mg de lisozima. Acrescentaram-se 10ml de solução II, misturou-se delicadamente e adicionaram-se 10ml de solução III. Incubou-se no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a 4°C, por 5 minutos a 12.000 r.p.m.. Transferiu-se o sobrenadante para tubo "corex" e adicionaram-se 0,8 volume de isopropanol. Incubou-se 1 hora a -20°C. Centrifugou-se a 4°C por 5 minutos a 12.000 r.p.m..

Descartou-se o sobrenadante, secou-se o sedimento e ressuspendeu-se em 500µl de água destilada. Adicionaram-se 100µg/ml de RNaseA e incubou-se por 30 minutos a 37°C (Sambrook et al., 1989, modificado, Vol.1-pág. 1.33).

6. PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDIOS

A purificação dos plasmídios foi realizada utilizando-se a técnica de gradientes isopícnicos de densidade de cloreto de cézio em alguns casos ou extração com solventes orgânicos, dependendo do nível de pureza desejado.

6.1.) Em gradiente de cloreto de cézio

Para uma solução de plasmídios dissolvidos em 4ml de TE, acrescentaram-se 4g de cloreto de cézio e 400µl de brometo de etídio (concentrado a 10mg/ml). Homogenizou-se a solução antes de transferi-la para tubos de ultracentrífuga. Centrifugou-se a 60.000 r.p.m., durante 4 horas, a 10°C, em rotor de ângulo fixo tipo VTI 65, em ultracentrífuga Beckman modelo L8-70M.

Retirou-se do tubo do gradiente a banda referente ao plasmídio, com auxílio de seringa e agulha, transferindo-a para tubos corex. Adicionou-se 5 vezes esse volume de TE e o mesmo volume de n-butanol saturado com água. Centrifugou-se durante 5 minutos a 5.000 r.p.m., desprezando a fase superior. Repetiu-se a extração com n-butanol saturado com água até obter a fase inferior totalmente

clara. Para reduzir a concentração salina, adicionou-se 2 vezes o volume de TE. Foram adicionados então, 2 volumes de etanol gelado. Incubou-se por 30 minutos a -20°C . Centrifugou-se durante 15 minutos a 4°C e 8.000 r.p.m.. Ressuspendeu-se o sedimento em 200 μl de TE, transferindo-o para tubos "eppendorf" e adicionando acetato de sódio até atingir a concentração final de 300mM. Em seguida, adicionaram-se 2,5 volumes de etanol absoluto e incubou-se a -20°C durante 30 minutos. Centrifugou-se e desprezou-se o sobrenadante. Lavou-se o sedimento com etanol 70% gelado e secou-se a vácuo. Finalmente, ressuspendeu-se o sedimento em 200 μl de água destilada e quantificou-se o DNA utilizando espectrofotômetro, usando a relação 1 unidade $\text{Ab}_{260}=50\mu\text{g}$ DNA/ml (Sambrook et al., 1989, Vol.1-pág.1.42).

6.2.) Extração com solventes orgânicos

Este protocolo era seguido principalmente para a purificação de plasmídios isolados em pequena escala ("mini-prep").

Para a remoção das proteínas e consequente purificação dos plasmídios obtidos conforme item 5.1., foram feitas extrações com solventes orgânicos.

Neste caso, adicionou-se um volume de fenol tamponado na suspensão de DNA. Agitou-se em "vortex" e centrifugou-se por 2 minutos em microcentrífuga. Passou-se a fase superior para tubo limpo, desprezando a fase inferior. A operação foi repetida por 2 ou 3 vezes. Após as extrações com fenol era feita uma extração com uma mistura de 1:1 (v/v) de fenol tamponado e clorofórmio. Em seguida,

adicionou-se acetato de sódio à concentração final de 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto. Incubou-se a -20°C por 30 minutos e centrifugou-se por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, e o sedimento foi lavado com etanol 70% e secado a vácuo. Após a secagem, ressuspendeu-se o sedimento em água destilada num volume adequado para o trabalho.

7. TRATAMENTO COM ENZIMAS MODIFICADORAS DE DNA

As enzimas de restrição *Bam*HI, *Bst*EII, *Sal*I e *Hind*III utilizadas provieram dos laboratórios Bethesda Research Laboratories-USA (BRL) e New England Biolabs-USA; a fosfatase alcalina (CIP) e T4 ligase, também da New England Biolabs; a RNase A e lisozima, da Sigma Chemical Company-USA.

7.1.) Digestão de DNA com enzimas de restrição

Após extração e purificação do DNA, em alguns casos foi necessário digeri-lo com endonucleases. Para isso, montou-se um sistema contendo DNA plasmidial, enzima, tampão recomendado pelo fabricante e volume final ajustado com água bidestilada esterilizada. A temperatura de incubação variou de acordo com as recomendações do fabricante. O tempo de reação foi de 2 a 3 horas, e a quantidade de enzima utilizada foi de aproximadamente 10U por μg de DNA, nunca superando 1/10 do volume final da mistura de reação para digestão.

O tampão indicado para cada sistema de digestão era fornecido pelo fabricante juntamente com a enzima de restrição, sendo para *Bam*HI, React 3 ou NEBuffer *Bam*HI; para *Bst*EII, React 2 ou NEBuffer 3; para *Hind*III, React 2 ou NEBuffer 2; para *Sal*I, React 3 ou NEBuffer *Sal*I; para enzimas da BRL e Biolabs respectivamente.

7.2.) Tratamento com fosfatase alcalina de intestino de vitela ("Calf Intestinal Phosfastase" - CIP)

Usou-se CIP para desfosforilar as extremidades 5' do vetor, sempre que este tivesse ambas extremidades iguais, para impedir a religação da molécula. Este processo foi utilizado antes de submeter o vetor à ligação com o inserto. Para isso, preparou-se uma reação num volume total de 20 μ l, contendo 1/10 desse volume de tampão para CIP 10 vezes concentrado, 0,5 μ l de CIP, vetor numa concentração adequada para a posterior ligação com o inserto, e o volume completado com água esterilizada. Essa mistura de reação era incubada a 37°C durante 15 minutos. No caso de extremidades abruptas, adicionou-se mais 0,5 μ l de CIP e incubou-se por mais 45 minutos à 55°C. Para bloquear a reação, usou-se EDTA pH8,0 numa concentração final de 5mM, incubando durante 10 minutos a 75°C.

7.3.) Ligação de DNAs com T4 DNA ligase

Sempre que necessário, procedeu-se à ligação entre as moléculas lineares, utilizando a enzima DNA ligase com seu respectivo tampão, seguindo as recomendações do fabricante. A

mistura foi incubada por uma noite a 16°C e utilizada diretamente para transformar *E. coli* JM101.

8. GEL DE AGAROSE

8.1.) Análise eletroforética do DNA em gel de agarose

Em várias etapas do trabalho, foi necessário analisar o DNA quanto a características físicas: integridade, pureza, conformação e peso molecular. Estes dados foram obtidos através de eletroforese em géis de agarose 0,7%, contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio, para a visualização do DNA sob luz UV.

As amostras de DNA sempre foram aplicadas nos géis de agarose com 1/10 do volume de "stop mix" 10X.

As corridas eletroforéticas foram feitas a 60mA aproximadamente, ou de acordo com a necessidade do experimento.

Após a corrida, o gel era iluminado com UV de 254nm para ser analisado.

8.2.) Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

Para eluição de fragmentos de até 5,5Kb de DNA de géis de agarose utilizou-se a técnica de membrana de DEAE; para eluição de fragmentos maiores, utilizou-se a técnica da membrana de diálise.

8.2.a) membrana de DEAE-celulose (fabricada por Schleicher & Schuell, Inc. Keene - USA)

Após a corrida eletroforética do DNA em gel de agarose, fez-se uma fenda no gel ligeiramente à frente da banda a ser recuperada, e colocou-se a membrana, previamente preparada, na fenda. Prosseguiu-se a eletroforese com o dobro da voltagem padrão até que se completasse a ligação do fragmento de DNA à membrana. Esta etapa foi monitorada com lâmpada ultravioleta. Removeu-se a membrana do gel e colocou-se num tubo "eppendorf" contendo NET baixo sal para lavá-la e liberá-la dos resíduos de agarose. Transferiu-se a membrana para outro tubo contendo 350µl de NET alto sal e incubou-se a 60°C durante 1 hora. Removeu-se a membrana e fez-se extração com 2 volumes de n-butanol saturado em água destilada. Repetiu-se essa operação por 3 vezes, ou até que não se observassem resíduos de brometo de etídio na solução. Precipitou-se o DNA com 2,5 volumes de etanol absoluto, incubando-se por 1 hora a -20°C. Centrifugou-se por 30 minutos em microcentrífuga refrigerada, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em água ou TE.

Obs.: antes do experimento preparou-se a membrana de DEAE-celulose, conforme as especificações do fabricante: incubação por 10 minutos com 10mM EDTA pH7,6, incubação por 5 minutos com 0,5M NaOH, repetidas lavagens com água destilada.

8.2.b) membrana de diálise

Após a corrida eletroforética, cortou-se e retirou-se o bloco de agarose contendo a banda de interesse. Num outro gel, abriu-se um espaço pouco maior que a parte retirada do gel anterior, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Cobriu-se esse espaço com membrana de diálise, sobre a qual encaixou-se o cubo de gel contendo a banda com o DNA, cobriu-se com tampão de corrida (TBE). Prosseguiu-se a corrida a 150 volts por mais 15 minutos. Em seguida, retirou-se o pedaço de agarose após confirmar que não restava DNA no gel, com auxílio de lâmpada UV manual. Inverteu-se a corrente por 1 minuto aproximadamente. Transferiu-se o tampão contendo o DNA eletroeluído para tubo "eppendorf", extraíu-se com 1 volume de n-butanol saturado em água destilada. Precipitou-se o DNA com 0,3M de NaCl e 2 volumes de etanol absoluto, incubou-se a -20°C por 20 minutos e centrifugou-se a 12.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspendido em água destilada num volume adequado.

9. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS

Para transformar bactérias, seguiu-se protocolo de Daggerty *et al.* (1979), com algumas modificações.

Partiu-se de um pré-inóculo de 5ml de meio YT inoculado com uma colônia de *E. coli* JM101, incubado com agitação em "shaker" a

37°C durante uma noite.

Na manhã seguinte, inoculou-se 0,5ml deste pré-inóculo em 50ml de meio YT. Foi feito o crescimento com agitação em "shaker", a 37°C, até que a cultura atingisse $D.O_{660}=0,2$; aproximadamente 2 horas. Logo após, a cultura foi centrifugada a 4°C, por 6 minutos, a 6.000 r.p.m.. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 2ml de solução de $CaCl_2$ 10mM.(esterilizada por filtração e mantida a 4°C). Em seguida, adicionaram-se mais 18ml da mesma solução. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 20ml de $CaCl_2$ 50mM. Incubou-se por 20 minutos a 4°C, centrifugou-se novamente, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1ml de $CaCl_2$ 50mM. Neste passo, obtiveram-se as células competentes.

Para a transformação destas células, foram colocados em tubos "eppendorf" estéreis incubados em gelo: 200µl de células competentes, 50ng de DNA ($\sim 0,5\mu l$), 99,5µl $CaCl_2$ 50mM. Sempre foi feito um tubo controle negativo, onde não era colocado DNA. E, em caso de mistura de ligação, usou-se um tubo controle positivo, com plasmídeo circular. Esses tubos foram incubados por 60 minutos a 4°C. Em seguida, aplicou-se um choque térmico por 1 minuto a 42°C. Adicionou-se 0,5ml de meio YT, incubou-se por 60 minutos a 37°C com agitação lenta e espalhou-se em placas contendo meio YT com o antibiótico adequado.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante uma noite, para o crescimento das colônias transformantes.

10. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LEVEDURAS

Para transformação de leveduras, seguiu-se o protocolo descrito por Gietz *et al.*, (1992). Foram empregados como vetores de transformação os plasmídios YEp24, YIp5, YEpG2, YIpCGC e o fragmento CGC de DNA purificado.

Para transformar a cepa YPH252, usaram-se os plasmídios YEpG2 (como controle positivo), YIp5, YIpCGC, fragmento CGC, além de um controle negativo (sem utilização de DNA). Para transformação com os plasmídios integrativos (YIpCGC e YIp5), assim como com o fragmento, usaram-se aproximadamente 4µg de DNA, enquanto foi usado de 1 a 2µg do vetor episomal (YEpG2) por sistema de transformação.

A cepa FTPT selvagem foi transformada com 3 a 4µg do fragmento CGC. As cepas FTPT *leu2* e FTPT *ura3* foram transformadas com os plasmídios YEpG2 (1 a 2µg) e YIpCGC (5µg), respectivamente. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por aproximadamente 5 dias. Nesta transformação foi utilizada como controle a cepa FTPT selvagem, tanto para verificar eficiência de transformação, quanto como controle negativo da formação de halo em placas com SDA coradas com vapor de iodo.

A cepa diplóide YPH274 e a cepa industrial HTYM-81 também foram transformadas com o fragmento CGC, usando-se de 3 a 4µg de DNA em cada sistema de transformação. Seguiu-se o mesmo protocolo das transformações anteriores.

11. TESTE DE ESTABILIDADE DA INFORMAÇÃO CLONADA

Para verificar a estabilidade de cada um dos plasmídios, partindo das colônias de células transformadas, realizou-se um teste de monitoramento do número de células que permaneciam amilolíticas após várias gerações de cultivo em meio não seletivo (YPD). Retirando poucas células de cada colônia, com auxílio de palito de madeira estéril, colocou-se uma porção de células em duas placas, contendo meio SD acrescido de aminoácidos e bases nitrogenadas necessários para o crescimento das leveduras, exceto o aminoácido complementado pelo plasmídio. Palitaram-se 100 colônias em cada placa utilizando guia auxiliar numerado.

Após o crescimento dessas células, retirou-se uma alçada e inoculou-se em 5ml de meio completo YPD, em tubo de ensaio com tampa. Esta cultura foi vigorosamente agitada em "vortex", para homogeneizar o meio de cultura com as células e procedeu-se a primeira contagem de células, em câmara de Neubauer. Os tubos foram então incubados com agitação de 160 r.p.m. a 28°C durante 24 horas.

No dia seguinte, diluiu-se esta cultura 100 vezes, fez-se nova contagem em câmara de Neubauer e incubaram-se as novas culturas com agitação a 28°C, por mais 24 horas.

Repetiu-se esse processo por dez vezes. No quinto e no décimo repique, após a contagem do número de células, diluiu-se a cultura quantas vezes necessário, e semeou-se em meio YPD sólido, procurando obter aproximadamente 200 colônias em cada placa, permitindo assim, que ocorresse crescimento de colônias isoladas.

Incubou-se em estufa a 28°C.

Em seguida, utilizando o processo de palitagem, transferiram-se 100 das colônias obtidas para placas contendo meio completo e amido (YPDA). Após 4 dias de incubação à 28°C, as colônias foram submetidas a vapor de iodo para verificação de formação de halos pelas colônias amilolíticas.

Foram feitos cálculos para obtenção do número de gerações, através dos valores obtidos em cada contagem do número de células durante o decorrer deste teste.

12. ANÁLISE DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA DAS CÉLULAS DE *S. cerevisiae* TRANSFORMANTES

12.1.) Análise qualitativa da produção de glicoamilase

As células foram analisadas qualitativamente quanto à produção de glicoamilase, através de crescimento em meio sólido contendo 0,5% de amido. Após crescimento das colônias, as placas eram abertas e emborcadas sobre outra placa contendo cristais de iodo sublimado, sendo as colônias expostas ao vapor o tempo suficiente para que o meio de cultura se tornasse corado. Os clones que secretam glicoamilase promovem a degradação do amido ao redor da colônia, resultando um halo incolor sobre o fundo azul-violeta do meio que ainda contém amido.

12.2.) Dosagem da atividade da glicoamilase pela glicose liberada

A determinação quantitativa da glicoamilase foi realizada através da dosagem da glicose liberada por atividade da glicoamilase sobre o amido.

Para dosar a glicose, usou-se o método da glicose oxidase ("kit" CELM) adotado por Camargo (1992).

Inocularam-se as culturas a serem analisadas em 5ml de YPD em tubos de ensaio. Incubou-se por 47 horas a 28°C com agitação.

Contou-se o número de células de cada uma das amostras e em seguida centrifugou-se a 6.000 r.p.m., por 3 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para tubo "eppendorf", que foi mantido no gelo.

O ensaio foi feito utilizando tubos de vidro, onde colocaram-se 200µl de solução de amido 1% e incubou-se durante 3 minutos a 65°C. Em seguida adicionaram-se 200µl do sobrenadante da cultura e incubou-se por mais 20 minutos a 65°C. Após esse intervalo de tempo, adicionaram-se 50µl de Tris HCl 5M, pH7,0. Agitou-se a mistura, que foi mantida à temperatura ambiente.

Paralelamente, fez-se um controle nas mesmas condições do ensaio, onde apenas substituiu-se a solução de amido por igual volume de tampão acetato. Fez-se também outro controle do amido, onde substituiu-se o sobrenadante da cultura pelo mesmo volume de água destilada.

Fez-se a dosagem da glicose, com 50µl do ensaio e 2ml do reativo, incubando-se por 10 minutos a 37°C.

Após a incubação, fez-se a leitura do ensaio em espectrofotômetro a 505nm. Os valores obtidos foram multiplicados por um fator de correção. Este fator de correção é o valor da leitura da glicose padrão a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que acompanha o "kit" do laboratório CELM (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos) utilizado para dosar a glicose livre no sobrenadante. O valor resultante do cálculo anterior corresponde ao valor absoluto de glicose em $\mu\text{g}/\text{volume}$ do ensaio. Para obter-se o valor relativo da atividade amilolítica dos transformantes, divide-se o valor obtido pela concentração celular da cultura analisada.

13. CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA FTPT E TRANSFORMANTE FTPT/CGC

Fez-se a curva de crescimento da cepa FTPT e do transformante FTPT/CGC, partindo de pré-inóculos de 5ml de YPD. Estas culturas foram crescidas com agitação de 160 r.p.m. a 28°C durante uma noite. Na manhã seguinte foram feitos os dois inóculos colocando 0,5ml de pré-inóculo em 50ml de YPD, sendo mantidos nas mesmas condições dos pré-inóculos durante todo o experimento. Neste momento iniciaram-se as contagens de células, que foram feitas em câmara de Neubauer a cada hora durante as primeiras 12 horas, depois mais uma contagem após 25 horas e a última contagem após 29 horas. Para contar as células eram feitas diluições de 10 ou 100 vezes, de acordo com a fase de crescimento das culturas, de modo que fosse possível a contagem das células.

Os valores eram colocados na ordem de 10^6 para facilitar a construção das curvas no gráfico, em logarítmo, para serem analisadas e comparadas posteriormente.

14. TESTE DE PLOIDIA DAS LINHAGENS DE *S. cerevisiae*

Foi empregado o método recomendado no catálogo de cepas (1991) do "Yeast Genetic Stock Center Catalogue" - Universidade Berkeley, California. Este método se baseia na determinação da frequência de mutantes *Can1*, que surgem na cultura após exposição à radiação UV. Uma vez que cepas com ploidia maior que $1n$ teriam mais que 1 cromossomo V, mutantes resistentes à canavanina só seriam obtidos de cepas haplóides.

As cepas industriais FTPT e HTYM-81 foram testadas para verificar se eram haplóides ou não. As cepas YPH252 e YPH274, sendo haplóide e diplóide respectivamente, foram usadas como controles nesse teste.

As cepas foram inoculadas em 5ml de YPD e incubadas a 28°C com agitação de 160 r.p.m. por 24 horas. Após esse período as culturas foram centrifugadas a 5.000 r.p.m. por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina contendo 5mM de EDTA. Após as lavagens o sedimento foi ressuspendido em solução salina. Fez-se a contagem do número de células em câmara de Neubauer para obter uma concentração aproximada de 2×10^8 células/ml. Em seguida, 1ml desta solução foi diluída 10 vezes e transferida para placa de petri,

onde foi submetida à irradiação durante 20 segundos com lâmpada UV 254nm, que tem uma fluência de 2,8J/m².seg. (56J/m²). Segundo aferição com dosímetro UVP J221 - Short Wave UV Intensity Meter. O restante da solução de células não foi irradiado.

Após irradiação a solução de células foi transferida para tubo e centrifugada por 3 minutos a 5.000 r.p.m.. O sedimento celular foi ressuspenso em 1ml de salina.

Em seguida, as células irradiadas e não irradiadas foram espalhadas em meio sólido YPD e SD suplementado e acrescido de canavanina a 60µg/ml. Semeou-se em placas contendo YPD, 0,1mlX10⁻⁵ e 0,2mlX10⁻⁵ de células irradiadas e não irradiadas. Semeou-se em placas SD+canavanina 0,1ml não diluído e 0,1mlX10⁻¹. As placas foram incubadas a 28°C por 4 dias, seguindo-se a contagem das colônias.

15. ELETROFORESE EM CAMPO PULSANTE (Contour-clamped Homogeneous Electric Field - CHEF)

15.1.) Preparação de DNA cromossômico de *S. cerevisiae*

Para preparar DNA cromossômico partiu-se de um inóculo de 100ml de cultura em meio YPD, incubado com agitação a 28°C por 24 ou 48 horas, dependendo da velocidade de crescimento da cepa.

Centrifugou-se a cultura a 7.000r.p.m. por 7 minutos, descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas 2 vezes em EDTA 0,05M pH8,0. Após as lavagens ressuspendeu-se em 1,5ml de

EDTA 0,05M pH8,0 e adicionaram-se 100 μ l de liticase de uma solução 1.000U/ml. Incubou-se a 37°C durante 30 minutos, monitorando-se ao microscópio ótico para observar formação de esferoplastos.

Preparou-se agarose 1,5% dissolvida em EDTA 0,25M pH8,0, mantendo-a a 45°C durante o procedimento para não solidificar. Colocou-se 1,5ml de células num tubo de ensaio, mantendo também a 45°C. Em seguida, adicionou-se 1,5ml de agarose às células do tubo de ensaio, deixando a agarose numa concentração de 0,75%. Essa mistura foi colocada num molde de acrílico com auxílio de pipeta. Após solidificar a agarose, os blocos foram transferidos para tubo contendo 5ml de LET com 100 μ l de β -mercaptoetanol. Incubou-se a 37°C durante 16 a 24 horas. Em seguida, descartou-se a solução do tubo e lavou-se os blocos por 3 vezes, durante 15 minutos cada vez, com EDTA 0,05M pH8,0. Após as lavagens adicionou-se 5ml de tampão NDS e incubou-se a 50°C durante a 16 a 24 horas. Descartou-se o tampão e lavou-se os blocos 2 vezes com EDTA 0,05M pH8,0. Fez-se uma lavagem final com EDTA nas mesmas condições citadas e incubou-se à temperatura ambiente durante uma noite.

Alguns blocos foram utilizados no dia seguinte, os demais foram armazenados na mesma solução de EDTA a 4°C. Podendo ser estocados por até 1 ano.

15.2.) Corrida eletroforética em campo pulsante "Chef"

Para a corrida eletroforética, preparou-se um gel de agarose

0,8% dissolvido em TBE 0,5X, onde foram incluídos os blocos com DNA total de *S. cerevisiae*, preparados anteriormente, como descrito no ítem anterior.

A corrida eletroforética foi feita num aparelho "Chef Mapper and Chef Mapper XA Pulse Field Eletroforesis System da Bio Rad", a 14°C, num tempo total de 24 horas, usando-se o programa "Multi state", nas condições abaixo:

i) Bloco 1: 15h com dois diferentes estados:

- estado 1: 6V/cm, ângulo +60°, por 1 minuto;
- estado 2: 6V/cm, ângulo -60°, por 1 minuto.

ii) Bloco 2: 9h com dois estados:

- estado 1: 6V/cm, ângulo +60°, por 1 minuto e 30 segundos;
- estado 2: 6V/cm, ângulo -60°, por 1 minuto e 30 segundos.

16) TRANSFERÊNCIA DE DNA PARA MEMBRANA DE NYLON

Após corrida eletroforética, tratou-se o gel de agarose com solução de HCl 0,25M para quebrar os cromossomos e facilitar a transferência do DNA para a membrana de nylon. Em seguida substitui-se a solução de HCl por solução de desnaturação, incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período lavou-se o gel com água destilada e incubou-se em solução de neutralização por mais 1 hora à temperatura ambiente.

Depois do tratamento do gel de agarose, transferiu-se o DNA para membrana de nylon por capilaridade, durante 48 horas. Após a

transferência do DNA, lavou-se a membrana com SSC 4X para retirar o excesso de agarose. Em seguida, a membrana foi submetida à luz ultravioleta do transluminador (Fotodyne 3-3002 de 50Hz-80A) durante 3 minutos para fixar o DNA à membrana.

17. "SOUTHERN BLOT"

17.1.) Hibridização de sonda não-radioativa

Após fixar o DNA à membrana de nylon, colocou-se a membrana em saco plástico selado, adicionou-se 20ml de solução de hibridização para pré-hibridizar, deixando em banho-maria com leve agitação a 65°C por 1 hora. Após esse período trocou-se a solução por mais 2,5ml de solução de hibridização fresca, adicionando-se a sonda marcada com digoxigenina-11-dUTP. A sonda foi preparada com 100ng de DNA purificado por eluição de gel de agarose, seguindo recomendações do fabricante do "kit". Incubou-se nas mesmas condições anteriores por 16 horas.

A membrana foi lavada no dia seguinte por 4 vezes, sempre com leve agitação. Nas duas primeiras lavagens usou-se 50ml de solução de lavagem 1 por 5min. à temperatura ambiente. Nas duas últimas lavagens usou-se 50ml de solução de lavagem 2 por 15min. a 68°C.

17.2.) Detecção e revelação da sonda não-radioativa

Para detecção da sonda não radioativa (marcada com digoxigenina), lavou-se a membrana de nylon rapidamente com tampão 1, seguindo com incubação por 30min em 100ml de tampão 2, à temperatura ambiente e agitação leve. Lavando novamente com tampão 1, nas mesmas condições anteriores. Incubando novamente por 30min. à temperatura ambiente em 20ml de tampão 1 contendo anticorpo-conjugado (acompanha o "kit") na concentração final de 150mU/ml. Removeu-se a solução de anticorpo-conjugado, lavando-se a membrana 2 vezes por 15min. com 100ml de tampão 1. Incubou-se a membrana por 2min. com 20ml de solução 3. Finalmente incubou-se a membrana por 12h na ausência de luz com 10ml de solução de coloração.

No dia seguinte, quando era possível observar as bandas da sonda hibridizada no DNA cromossomal, parou-se a reação por lavagem da membrana por 5min. em tampão 4.

Após o processo, a membrana foi fotografada.

RESULTADOS

1. CONSTRUÇÃO DO VETOR BIFUNCIONAL YlpC

Para transformação de cepas da levedura *S. cerevisiae* sem marcas auxotróficas, foi construído inicialmente o vetor bifuncional YlpC. Para tanto, foi utilizado o plasmídio integrativo Ylp5 (Fig.2), no qual foi clonado parte do gene *CAN1*, retirado do plasmídio TLC-1 (Fig.5) (Broach *et al.*, 1979).

Inicialmente preparou-se o vetor Ylp5 através da inativação do sítio único que apresenta para a enzima de restrição *HindIII*. Esta medida foi importante para evitar que a molécula se dividisse em 3 fragmentos, quando da digestão posterior do vetor final com *HindIII*. Para tanto, após digestão com *HindIII*, preencheram-se as extremidades coesivas deixadas pela enzima, usando-se a enzima DNA polimerase I (fragmento Klenow) o que resulta em extremidades abruptas. O plasmídio foi então recircularizado por adição da enzima T4 ligase, para ser em seguida hospedado em *E. coli* JM101. Para a confirmação da inativação do sítio, extraíu-se e purificou-se o plasmídio da bactéria e em seguida digeriu-se com *HindIII*. Foi observado após eletroforese em gel de agarose que o plasmídio não se linearizou, enquanto o Ylp5, também submetido à digestão com *HindIII*, apresentava-se linear. Esse novo vetor foi denominado Ylp5-H (Fig.6).

Num passo seguinte, digeriu-se o plasmídio TLC-1 (Fig.5) com a enzima de restrição *SaI* e recuperou-se um fragmento de 2051

pares de bases, contendo parte do gene *CAN1*, por eluição do gel com membrana de DEAE-celulose (ítem 8 - material e métodos). Em seguida, este fragmento foi submetido à nova digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, resultando num fragmento de 1776 pares de bases do gene *CAN1*, com extremidades *Sal*I e *Bam*HI. Este fragmento também foi recuperado de gel de agarose por eluição com membrana de DEAE-celulose (Fig.9).

Por outro lado, o plasmídio YIp5-H (Fig.6) também foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I, liberando um fragmento de 276 pares de bases, restando uma molécula linear de 5265 pares de bases. A esta molécula foi ligado o fragmento *Bam*HI-*Sal*I de 1776 pares de bases obtido do plasmídio TLC-1. A mistura de ligação foi usada para transformar *E. coli* JM101.

Esta clonagem no vetor YIp5-H foi feita dentro da sequência do gene que confere resistência à tetraciclina, facilitando assim, o processo de seleção das colônias transformantes tendo recebido o plasmídio recombinante. Para a seleção, dentre os 300 Ap^R obtidos, escolheram-se as colônias que cresceram apenas em meio YT sólido com ampicilina, desprezando-se aquelas que ainda apresentavam resistência à tetraciclina.

Após a seleção dos transformantes bacterianos por antibióticos, procedeu-se à extração dos plasmídios dos clones Ap^R, Tc^S. Analisou-se o DNA através de digestão com as enzimas de restrição *Hind*III, *Sal*I e *Bam*HI, observando-se a migração eletroforética em gel de agarose, comparativamente ao padrão de peso molecular λ /*Hind*III e o plasmídio YIp5-H linear. Quando digerido com *Bam*HI ou *Sal*I separadamente, o vetor apresentou-se

de forma linear de 7,0Kb. Quando digerido com *SalI* e *BamHI* simultaneamente, apresentou duas bandas, sendo uma de 1,7 e outra de 5,3Kb, demonstrando a liberação do fragmento de *CAN1*. O vetor, quando digerido com *HindIII*, apresentou duas bandas, sendo uma de 5,7 e outra de 1,3Kb, confirmando a presença de dois sítios de *HindIII* dentro do inserto *CAN1*. Esse novo vetor foi denominado YIpC (Fig.7).

2. CONSTRUÇÃO DO VETOR BIFUNCIONAL YIpCGC

No passo seguinte, foi clonado no vetor YIpC o cassete de expressão da glicoamilase de *A. awamori* sob os controles de transcrição (promotor e terminador) do gene PGK de *S. cerevisiae*. Esse cassete de expressão encontra-se no plasmídio YEpG2 ladeado por sítios de restrição *HindIII* (Camargo, 1992) (Fig.3). Após digestão com a enzima de restrição *HindIII* e eletroforese, foram observadas 2 bandas de DNA em gel de agarose, tendo sido a banda de 3,8Kb, correspondente ao cassete de expressão, eluída pela técnica de DEAE-celulose. Este fragmento de DNA foi então tratado com a enzima Klenow para ficar dotado de extremidades abruptas.

Para que o cassete de expressão pudesse ser ligado ao vetor YIpC, o vetor foi submetido à digestão com a enzima de restrição *BstEII*, que o linearizou dentro da sequência do gene *CAN1*. Desta forma, o gene *CAN1* ficou dividido em dois fragmentos, um com 856 e o outro com 920 pares de bases (Fig.10). Usou-se a enzima klenow

novamente para obter extremidades abruptas e, em seguida a enzima fosfatase alcalina (CIP), para evitar a religação do plasmídio sem inserção. O vetor e o cassete de expressão tratados como descrito em material e métodos, foram ligados entre si com DNA ligase de T4 (Fig.10). Transformou-se *E. coli* JM101 com a mistura de ligação e selecionaram-se as células transformantes em meio YT sólido contendo ampicilina.

Doze transformantes foram analisados através de extração do DNA plasmidial, sendo dois destes submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e analisados após eletroforese em gel de agarose, comparando-se com o padrão de peso molecular λ /*Hind*III. Foi possível detectar dois tipos de clones recombinantes, havendo cada um deles recebido o cassete de expressão numa orientação diferente (Fig.10 e Fig.11). O plasmídio recombinante foi denominado YIpCGC.

3. OBTENÇÃO DO FRAGMENTO CGC

O vetor YIpCGC foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hind*III, resultando dois fragmentos com aproximadamente 5,1 e 5,6Kb. O fragmento menor foi denominado CGC, por conter o cassete de expressão da glicoamilase ladeado por sequências do gene **CAN1** (Fig.10).

4. TRANSFORMAÇÃO DE *S. cerevisiae*

4.1.) Transformação da cepa YPH252 com o vetor YIpCGC

Para nos certificarmos da obtenção do plasmídeo desejado, numa primeira etapa de transformação utilizou-se o vetor YIpCGC em sua forma circular, para transformar a cepa haplóide YPH252 de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados em meio de omissão SD-uracil, tendo sido obtidos 832 transformantes Ura⁺. Cinquenta transformantes Ura⁺ foram transferidos para placas contendo meio SDA (suplementado). Após crescimento das colônias, as placas foram submetidas a vapor de iodo. Observou-se formação de halo de amilólise em torno das colônias, confirmando portanto a presença do cassete de expressão da glicoamilase em todos os transformantes Ura⁺.

4.2.) Transformação da cepa YPH252 com o fragmento CGC

Empregou-se o fragmento CGC *HindIII-HindIII* de 5,1Kb em várias transformações de levedura. Para tanto, era feita a digestão do vetor YIpCGC com a enzima *HindIII* e empregava-se na transformação diretamente a mistura de digestão, sem qualquer purificação adicional.

A cepa YPH252 de *S. cerevisiae* foi transformada com o fragmento CGC por 4 vezes, sempre utilizando-se por volta de 3 a 4µg do fragmento de 5,1Kb. A seleção dos transformantes de levedura foi feita em meio SDA sólido com canavanina, além de

todos os aminoácidos correspondentes às auxotrofias da cepa, ou seja, SDA + ura, lys, .ade, trp, his, leu.

Como controle, a cepa YPH252 também foi transformada com o plasmídio YIpCGC não digerido, com YEpG2 (controle positivo da atividade amilolítica) e YEp24 (controle negativo da atividade amilolítica). A seleção destes transformantes foi feita em meio SDA sólido suplementado (menos o marcador de auxotrofia do plasmídio), com incubação de aproximadamente 5 dias a 28°C. Após incubação as placas foram submetidas a vapor de iodo, a fim de observar halo resultante da atividade amilolítica das células. As células transformadas com o plasmídio YEpG2 sempre apresentaram halos ligeiramente maiores do que os demais transformantes com YIpCGC e/ou CGC.

O vetor integrativo YIpCGC sempre proporcionou um menor número de células transformantes/ μ g de DNA, comparado aos demais vetores e portanto é aquele que transforma com menor eficiência. O fragmento CGC transforma levedura com eficiência ligeiramente maior que o vetor integrativo, mas muito menor que o vetor episomal (Tabela abaixo).

Eficiência de transformação da cepa YPH252

Número de transformantes/ μ g de DNA

YPH252/CGC	YPH252/YIpCGC	YPH252/YEpG2	YPH252/YEp24
45	22	1400	1500

4.3. Transformação da cepa selvagem FTPT com o fragmento CGC

As linhagens de levedura selvagens de que dispúnhamos no laboratório foram analisadas quanto ao caráter de sensibilidade à canavanina (60µg/ml). A cepa FTPT, oriunda da Fundação Tropical de Pesquisa FTPT, mostrou-se sensível à canavanina e portanto uma ótima candidata para a avaliação de nossa proposta de usar o fragmento CGC na transformação de cepa de levedura sem marcador de auxotrofia.

O fragmento CGC foi utilizado para transformar a cepa FTPT selvagem e a seleção das células transformantes foi feita em meio SDA sólido com canavanina. Após crescimento das colônias, por volta de 5 dias, as placas foram coradas com vapor de iodo, o que permitiu a observação de halo incolor ao redor da maioria das colônias.

4.4. Transformação da cepa selvagem HTYM-81 com o fragmento CGC

A cepa HTYM-81 (Laluce *et al.*, 1993) também foi testada em relação à resistência à canavanina e constatou-se que esta linhagem utilizada na indústria para produzir etanol é sensível à droga quando utilizada em meio de cultura na concentração de 60µg/ml. Portanto, também foi utilizada na transformação genética com o vetor CGC. Usou-se a mesma metodologia do item anterior, tanto na

transformação, quanto na seleção dos transformantes e na verificação dos resultados.

Observou-se halo incolor ao redor de algumas colônias quando a placa de petri contendo meio de cultura com amido era submetida a vapor de iodo.

Nesta transformação foram obtidas 76 colônias, sendo que 15 destas colônias apresentaram halo de amilolise.

5. ESTABILIDADE DA INFORMAÇÃO CLONADA

A estabilidade das informações clonadas nas células transformadas foi analisada após 30 a 60 gerações em meio não-seletivo. Esse teste foi feito com colônias da cepa YPH252, transformada seja com o fragmento CGC, seja com os vetores YIpCGC, YEpG2, que apresentaram halo, seja com YEp24.

Para células transformadas com o fragmento CGC e YIpCGC, o teste foi feito durante 10 dias com um repique diário, ou aproximadamente 60 gerações. Nesse período, foi possível verificar 100% de estabilidade do fragmento CGC e 0,05% de perda por geração do vetor YIpCGC. As células transformadas com os vetores YEpG2 e YEp24 foram examinadas por 5 dias, ou aproximadamente 33 gerações. Verificou-se que células transformadas com o vetor YEpG2 apresentaram uma taxa de 2,14% de perda da informação clonada por geração. O vetor YEp24 foi utilizado como controle negativo por não apresentar halo (veja tabela a seguir).

% de perda da informação clonada/geração e N^o. de gerações analisadas

YHP252/CGC	YPH252/YIpCGC	YPH252/YEpG2	YPH252/YEp24
0,00	0,05	2,14	-
-----	-----	-----	-----
60 gerações	60 gerações	33 gerações	33 gerações
analisadas	analisadas	analisadas	analisadas

Esse resultado foi obtido através de contagem do número de colônias que mantiveram a atividade amilolítica após o período do teste.

6. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA GLICOAMILASE

As mesmas colônias de YPH252 transformadas com o fragmento CGC ou os vetores YIpCGC, YEpG2 e YEp24, utilizadas no teste anterior foram aqui empregadas. Os plasmídios YEpG2 e YEp24 foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente (Fig.12).

Como pode ser observado na figura 12, os transformantes YPH252 com o fragmento CGC e com o plasmídio integrativo YIpCGC secretam glicoamilase num nível ligeiramente inferior ao do transformante YPH252/YEpG2.

7. CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA FTPT E FTPT/CGC

Foram feitas contagens a cada hora durante a fase logaritmica e no início da fase estacionária de crescimento, ou seja, durante as primeiras 12 horas do experimento. Após esse período, foram feitas 2 contagens, encerrando a curva 29 horas após seu início.

As culturas foram feitas ao mesmo tempo, utilizando a mesma metodologia, o que permitiu comparar seus resultados.

As curvas de crescimento da cepa FTPT e FTPT/CGC estão representadas no gráfico da figura 13. Os valores das contagens de células de 15 diferentes pontos estão expressos em ordem logarítmica.

8. ANÁLISE DA PLOIDIA DAS CEPAS

De fato, não existem informações sobre a ploidia das cepas industriais FTPT e HTYM-81, que empregamos como hospedeiras de transformação do novo vetor CGC. Para se saber se estas cepas são haplóides ou poliplóides foi feita a determinação da frequência de mutantes resistentes à canavanina (*CAN1*) em populações de células irradiadas e não irradiadas com UV (ítem 14 - material e métodos).

Foram usadas como controles a cepa haplóide YPH252 e a cepa diplóide a/a YPH274. Como pode ser observado na tabela abaixo esta técnica indica que FTPT é haplóide ou, então é aneuplóide e tem apenas um cromossomo V. A cepa HTYM-81, sem

dúvida, é poliplóide (veja tabela abaixo).

CEPAS	YPH252	YPH274	FTPT	HTYM-81
células não irradiadas:				
<i>CAN1</i> /10 ⁷ céls.	7,0	9,0	62,7	1,1
celulas irradiadas com 56J/m ² de UV:				
<i>CAN1</i> /10 ⁷ sobreviventes	970	75	3.000	5,2
% de sobrevi- ventes	44	54	41	49
Ploidia (atribuída)	n	2n	"n"	"xn"

9. LOCALIZAÇÃO DA INFORMAÇÃO CLONADA NO CROMOSSOMO

Para confirmação da integração do inserto CGC no gene *CAN1*, localizado no cromossomo V, foi aplicada a técnica de "Southern blot", onde utilizou-se como sonda o gene estrutural da glicoamilase, retirado do cromossomo YEpG2 através de digestões com as enzimas de restrição *Sma*I e *Bgl*II. A sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (não-radioativo).

Para esta técnica empregamos a cepa haplóide YPH252 utilizada em laboratório e o transformante YPH252/CGC, além da

cepa industrial poliplóide HTYM-81 e o transformante HTYM-81/CGC. A foto da Figura 14 mostra a separação dos cromossomos em gel de agarose, obtido através de corrida eletroforética "CHEF", e ao lado os pesos moleculares de cada cromossomo de *S. cerevisiae*, segundo Löbrich *et al.* (1992).

A membrana de nylon resultante do "Southern blot" (Fig.15), mostra as bandas de hibridização no cromossomo V. Estas bandas estão presentes apenas nas cepas transformadas com o fragmento CGC, o que mais uma vez comprova a integração do fragmento no gene *CAN1*.

DISCUSSÃO

A idéia de utilizar o método de interrupção do gene selvagem *CAN1* da levedura *S. cerevisiae*, interrompendo este gene com um fragmento de DNA contendo um cassete de expressão de uma proteína de interesse nos parece muito elegante. Isto porque, desta forma, sem introduzir qualquer sequência codificadora, tornamos a cepa receptora resistente à uma substância tóxica, a canavanina, uma vez que a permease responsável por sua tomada de fora para dentro da célula fica alterada. Assim, a única inserção de sequência no genoma que se faz é a introdução dos genes do cassete da proteína que se deseja expressar.

Pelo fato do vetor YIpC conter 1776 pares de bases do gene *CAN1*, sendo que nele existe um sítio único para a enzima de restrição *BstEII*, que divide a sequência desse gene praticamente ao meio, resultando em duas partes com fragmentos maiores que 250 pares de bases, que é o tamanho mínimo necessário para haver recombinação homóloga com eficiência, é possível clonar com facilidade qualquer cassete de expressão com extremidades complementares ou abruptas, como no caso do cassete de expressão da glicoamilase, usado neste trabalho.

O vetor YIpCGC permite a remoção do gene estrutural da glicoamilase, mantendo o promotor e terminador *PGK*, possibilitando a clonagem de outro gene estrutural sob o comando do *PPGK*. Apenas com a troca do gene estrutural, e digestão com a enzima de restrição *HindIII*, pode-se obter um novo fragmento para transformação genética de levedura pelo processo de interrupção do gene *CAN1*, aqui proposto.

Como os vetores YIpC e YIpCGC são bifuncionais, as etapas de construção destes vetores são facilitadas, pois a hospedagem em *E. coli* permite o posterior isolamento de plasmídio em quantidade para análise e obtenção de fragmento de DNA necessário para transformação de levedura por interrupção gênica.

Uma das vantagens da transformação de levedura com o fragmento formado pelo cassete de expressão ladeado por sequências do gene *CAN1*, é que não se introduz DNA estranho ao genoma da levedura além do cassete de expressão de interesse. Este fato tem grande importância quando o vetor é usado para transformar cepas industriais que serão envolvidas em processos de produção ligados à alimentação ou medicamentos, por exemplo.

A transformação com o fragmento CGC da cepa haplóide de *S. cerevisiae* YPH252 usada em laboratório tem vantagens sobre o vetor integrativo YIpCGC. Uma vez que, fragmentos lineares de DNA homólogo apresentam, em levedura, maior frequência de recombinação homóloga do que a mesma sequência circularizada em plasmídio (Botstein & Davis, 1982). O fragmento CGC apresenta, como foi visto, maior frequência de transformação em relação ao YIpCGC circular (veja tabela no item 4 - Resultados).

Há vantagens também em relação à estabilidade da informação clonada, em que foi possível observar que não houve qualquer perda da informação genética introduzida na célula pelo fragmento CGC, enquanto que com o vetor integrativo YIpCGC foi obtido perda de 0,05% em cada geração, como mostra a tabela do item 6 de Resultados.

Outra vantagem do fragmento CGC é a viabilidade na transformação genética de cepas selvagens, como pudemos concluir com o uso da cepa FTPT, utilizada na indústria para produção de etanol. Esta cepa não contém marcas auxotróficas, podendo ser transformada com o fragmento CGC por permitir a seleção das colônias recombinantes através da seleção em meio mínimo contendo canavanina.

O fragmento CGC também foi utilizado, com sucesso, para transformar a cepa industrial HTYM-81. Uma vez que verificamos que esta linhagem tem ploidia maior que 1 (veja item 8 - Resultados), fica

demonstrado que o vetor CGC é eficiente na transformação de cepas haplóides e de cepas com ploidia superior sem marcas auxotróficas.

A dosagem da glicoamilase foi feita apenas nos sobrenadantes dos transformantes da cepa YPH252 por ser a única, entre as cepas usadas neste trabalho, que permite transformar e selecionar os recombinantes resultantes da transformação com os vetores YIpCGC, YEpG2, YEp24 e o fragmento CGC, possibilitando comparar a atividade amilolítica entre as células. Como mostra o gráfico da figura 12, o transformante YPH252/YEpG2 apresentou maior atividade amilolítica. Isto se deve ao fato deste vetor conter maior número de cópias em cada célula. Todavia, transformantes com YEpG2 apresentam alta perda por geração da informação genética clonada, chegando a perda total após algumas gerações. Os níveis de atividade amilolítica apresentados por YPH252/YIpCGC e YPH252/CGC são comparáveis e inferiores em relação à YPH252/YEpG2 por conterem apenas uma cópia do cassete da glicoamilase por célula. Mesmo assim, trazem a vantagem de manter a informação clonada mais estável, no caso de YPH252/YIpCGC e totalmente estável em YPH252/CGC.

Através da curva de crescimento da cepa FTPT e FTPT transformada com o fragmento CGC, ficou claro que, o fato da célula selvagem ter o cassete de expressão da glicoamilase adicional ao seu genoma, isto não altera sua velocidade de crescimento, ao menos nas condições de escala de laboratório.

Outra vantagem do método de transformação aqui proposto é que torna as células de levedura resistentes à canavanina, permitindo assim, a seleção das células recombinantes quando houver alguma contaminação de outros microrganismos na cultura, a nível industrial. Isto é possível colocando uma alíquota da cultura contaminada para crescer em meio mínimo contendo canavanina, pois somente as células recombinantes, resistentes à canavanina, serão selecionadas, permitindo a descontaminação rápida e econômica da cepa envolvida na produção industrial.

A confirmação de que a informação genética introduzida nas leveduras YPH252 e HTYM-81 através do fragmento CGC está mesmo integrada, foi feita por "Southern blot". A sonda contendo o gene estrutural da glicoamilase, marcada com digoxigenina, hibridizou exatamente na posição equivalente à banda correspondente a do cromossomo V, onde é localizado o gene *CAN1*. A maior intensidade de hibridização verificada com o transformante HTYM-81/CGC vem de encontro com o fato desta cepa ser poliplóide.

FIGURAS

Fig.2 - Plasmídio integrativo YIp5 (Struhl *et al.*, 1979)

Figura extraída do catálogo Biolabs 1990-1991 (pág.122)

Fig.3 - Plasmídio epissomal YEpG2 (Camargo, 1992)

Fig.5 - Plasmídio TLC-1 (Broach *et al.*, 1979)

Fig.6 - Plasmídio integrativo YIp5-H

Fig.7 - Plasmídio integrativo YIpC

Fig.8 - Plasmídio integrativo YIpCGC

Fig.9 - Esquema da construção do plasmídio integrativo YIpC

Fig.10 - Esquema da construção do plasmídeo integrativo YIpCGC e obtenção do fragmento CGC.

Fig.11 - Foto de eletroforese em gel agarose 0,7%, onde:

- 1- YlpCGC digerido com *Bam*HI
- 2- YlpC não digerido
- 3- YlpCGC digerido com *Hind*III
- 4- YlpCGC digerido com *Bam*HI
- 5- YlpCGC não digerido
- 6- YlpCGC digerido com *Hind*III
- 7- YlpCGC digerido com *Bam*HI
- 8- YlpCGC não digerido
- 9- λ *Hind*III

3, 4 e 5 → clones com cassete de expressão da glicoamilase;
 6, 7 e 8 → clones com cassete de expressão da glicoamilase
 no sentido contrário.

Fig.12 - Atividade amilolítica da cepa YPH252 transformada com os vetores: CGC, YIpCGC, YEpG2 e YEp24

Fig.13 - Curva de crescimento da cepa FTPT e do transformante FTPT/CGC

Fig.14 - (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% (CHEF) de DNA cromossomal de *S. cerevisiae*, onde:
 1- YPH252
 2- YPH252/CGC
 3- HTYM-81
 4- HTYM-81/CGC
 5- YEpG2
 (B) pesos moleculares em Kb dos cromossomos de *S. cerevisiae* (Löbrich *et al.*, 1992)

Fig.15 - Membrana de nylon de "Southern blot" utilizando como sonda o gene estrutural da glicoamilase de *A. awamori*, marcado com digoxigenina-11-dUTP, onde:
1- YPH252
2-YPH252/CGC
3- HTYM-81
4- HTYM-81/CGC
5- YEpg2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Ahmad, M. & Bussey, H. Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the CAN1 gene. *Curr. Genet.*, **10**: 587-92, 1986.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Struhl, R. E. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons, 1989.
- Becker, D. M. & Guarente, L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymol.*, **194**: 182-7, 1991.
- Beggs, J. D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, **275**: 104-8, 1978.
- Botstein, D.; Falco, S. C.; Brennan, M.; Stinchcomb, D. T.; Struhl, K.; Davis, R. W. Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, **8**: 17-24, 1979.
- Botstein, D. & Davis, R. W. Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces-metabolism and gene expression*. J. N. Strathern; Jones, E. W.; Broach, J. R. 1982. p.607-36.
- Broach, J. R.; Strathern, J. N.; Hicks, J. B. Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. *Gene*, **8**:121-33, 1979.

* De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Referências bibliográficas: NB-66. In:---. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-20.

Serial sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990.

- Burke, T. D. & Olson, M. V. Preparation of clone libraries in yeast Artificial-chromosome vectors. *Methods in Enzymol.*, **194**: 251-70, 1991.
- Camargo, S. S. Co-expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de alfa-amilase pancreática de camundongo e glucoamilase de *Aspergillus awamori*. [Dissertação de mestrado]. Instituto de Ciências Biológicas. Univ. de Brasília, DF, 1992. 111p
- Castilho-Valavicius, B. A.; Takita, A. A.; Thompson, G. M.; Piestun, V. S. The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciênc. Cult.* (São Paulo), **44**: 301-09, 1992.
- Cooper, T.G. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strathern, J. N.; Jones, E. W.; Broach, J. R. eds. The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p.399-461.
- Daggerty, M. & Ehrlich, S. D. Prolongated incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6**: 23-8, 1979.
- Fink, G. R. 1978 apud Schenberg, A. C., 1987. p.535.
- Gietz, D.; St. Jean, A.; Woods, R.; Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids. Res.*, **20**: 1425, 1992.
- Grenson, M.; Mousset, M.; Wiame, J. M.; Bechet J. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **127**: 325-38, 1966.
- Haynes, R. H. & Kuns, B. A. DNA repair and mutagenesis in yeast. In: Strathern, J. N.; Jones, E. W.; Broach, J. R. eds. The Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. p.371-414.
- Hinnen, A.; Hicks, J. B.; Fink, G. R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 1929-33, 1978.

- Hoffmann, W. Molecular Characterization of the *CAN1* Locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **260**: 11831-7, 1985.
- Innis, M. A.; Holland, M. J.; McCabe, R. C.; Cole, G. E.; Wittman, V. P.; Tal, R.; Watt, K. W. K.; Gelfand, D. H.; Holland, J. P.; Meade, J. H. Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **228**: 21-6, 1985.
- Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-8, 1983.
- Kaji, D. A. Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. [Dissertação de mestrado]. Univ. Estadual de Campinas, 1989.
- Kitamoto, K.; Oda, K.; Gomi, K.; Takahashi, K. Construction of uracil and tryptophan auxotrophic mutants from sake yeast by disruption of *URA3* and *TRP1* genes. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 2979-87, 1990.
- Laluce, C.; Abud, B. L.; Greenhalf, W.; Sanches Peres, M. F. Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. *Biotec. Letters.*, **15**: 609-14, 1993.
- Löbrich, M.; Ikpeme, S.; Kiefer, J. Analysis of the inversion effect in pulsed field gel electrophoresis by a two-dimensional contour-clamped homogenous electric field system. *Anal. Bioch.*, **208**: 65-73, 1993.
- Meilhoc, E.; Masson, J. M.; Tessie, J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electroporation. *Bio/Technol.*, **8**: 223-7, 1990.
- Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

- Mortimer, R. K.; Contopoulou, C. R.; King, J. S. Genetic and Physical map of *Saccharomyces cerevisiae*. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: genome dynamics, protein synthesis, and energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 737-812.
- Mortimer, R. K. & Contopoulou, C. R. Yeast Genetic Stock Center Catalogue. Department of Molecular and Cellular Biology Division of Genetics, University of California at Berkeley, 1991.
- Nunberg, J. H.; Meade, J. H.; Cole, G.; Lawyer, F. C.; McCabe, P.; Scheickart, V.; Tal, R.; Wittman, V. P.; Flatgaard, J. E.; Innis, M. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 2306-15, 1984.
- Philippsen, P.; Stotz, A.; Scherf, C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, **194**: 169-82, 1991.
- Romanos, M. A.; Scorer, C. A.; Clare, J. J. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, **8**: 423-88, 1992.
- Rose, M. D. & Broach, J. R. Cloning Genes by Complementation in Yeast. *Methods Enzymol.*, **194**:1995-2229, 1991.
- Rothstein, R. J. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 202-11, 1983.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schenberg, A. C. Engenharia Genética de Leveduras. In: Costa, S. O. P. ed. Genética Molecular e de Microrganismos: os fundamentos da engenharia genética. Manole, São Paulo, 1987. p. 533-46.
- Schenberg, A. C. & Bonatelli Jr., R. Plasmídios de Eucariontes. In: Costa, S. O. P. ed. Genética Molecular e de Microrganismos: os fundamentos da engenharia genética. Editora Manole, São Paulo, 1987. p. 493-509.

- Schenberg, A. C.; Vicente, E. J.; Astolfi-Filho, Spartaco. Expression of heterologous amylases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciênc. Cult.* (São Paulo). **45**: 181-91, 1993.
- Sherman, F.; Fink, G. R.; Lawrence, C. W. *Methods in Yeast Genetics: laboratory manual*. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1979.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**: 19-27, 1989.
- Sikorski, R. S. & Boeke, D. J. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.*, **194**:302-18, 1991.
- Strickberger, M. W. *Genética*. 3. ed. Barcelona, Espanha, Ediciones Omega, 1988. p.37-38.
- Struhl, K.; Stinchcomb, D. T., Scherer, S.; Davis, R. W. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 1035-9, 1979.
- The Merck Index. The Merck Index. New York, Martha Windholz. Merck, 1976. p.221.
- Tuite, M. F.; Dobson, M. J.; Roberts, N. A.; King, R. M.; Burke, D. C.; Kingsman, S. M.; Kingsman, A. J. Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **1**: 603-608, 1982.
- Watson, J. D.; Hopkins, N. H.; Roberts, J. W.; Steitz, J. A.; Weiner, A. M. *Molecular Biology of the Gene*. 4. ed. California, Cummings, 1987. p.550-94.
- Wehner, E. P. & Brendel, M. Vector YFRp1 allows transformant selection in *Saccharomyces cerevisiae* via resistance to formaldehyde. *Yeast*, **9**: 783-5, 1993.

- Whelan, W. L.; Gocke, E.; Manney, T. R. 1979. The *can1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine structure analysis and forward mutation rates. *Genetics*, **91**:35-8.
- Yamasaki, Y.; Suzuki, Y.; Osawa, J. Three forms of α -glucosidase and glucoamylase from *Aspergillus awamori*. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2149-61, 1977.