

2.1- Linhagens utilizadas

2.1.1- Foram utilizadas as seguintes linhagens de *A. nidulans*:

- 1- *pabaA1*
- 2- MSF : *adE20 suAadE20, yA2, acrA1, galA13, pyroA4, facA30, sB3, nicB8, riboB2*
- 3- 47: *frA1 pabaB22 pyroA4*
- 4- Segregante 1 (Rocha *et al.*, 2002) : *yA2, acrA1, tebA7, sB3, nicB8, riboB2*
- 5- GR5 : *pyrG89, wA1, pyroA4*
- 6- RAP 26 : *biA1, ΔargB*
- 7- FGSC 26 : *biA1*

Os genótipos destas linhagens se encontram descritos na tabela 2.

2.1.2- Foram utilizadas as seguintes linhagens de *E. coli* :

- 1- XL1-Blue (*D(mcrA) 183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F', pro AB, lac 1, ZDM15, Tn10 (Tef)]*) (Stratagene).
- 2- DH5α[F'] [*supE44, DlacU169 (f80 lacZDM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1*] sensível à ampicilina
- 3- pMOS Blue *endA1 hsdR17 supE44 recA1 gyrA96 relA1 lac [F', pro AB, lac 1, ZDM15, Tn10 (Tef)]*

Tabela 2 Marcadores gênicos das linhagens utilizadas, sua localização e seus efeitos fenotípicos

Marcador gênico ou Símbolo gênico	Grupo de ligação ou cromossomo	Característica fenotípica do mutante
<i>adE20</i>	I	Auxotrofia para adenina
<i>suAadE20</i>	I	Gene supressor de adenina
<i>yA2</i>	I	Conídios amarelos
<i>biA1</i>	I	Auxotrofia para biotina
<i>pabaA1</i>	I	Auxotrofia para ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>pyrG89</i>	I	Auxotrofia para uridina e uracila
<i>acrA1</i>	II	Resistência à acriflavina
<i>wA1</i>	II	Conídios brancos
<i>DargB</i>	III	Auxotrofia para arginina
<i>galA1</i>	III	Não utilização de galactose como fonte de carbono
<i>pabaB22</i>	IV	Auxotrofia para ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>tebA7</i>	IV	Resistência para terbinafina
<i>pyroA4</i>	IV	Auxotrofia para piridoxina
<i>frA1</i>	IV	Não utilização frutose como fonte de carbono
<i>facA303</i>	V	Não utilização de acetato como fonte de carbono
<i>sB3</i>	VI	Auxotrofia para tiosulfato de sódio
<i>nicB8</i>	VII	Auxotrofia para ácido nicotínico
<i>riboB2</i>	VIII	Auxotrofia para riboflavina

A linhagem denominada de segregante 22 foi obtida através do cruzamento entre as linhagens RAP26 e o segregante 1, e utilizada nos experimentos de nocaute gênico.

2.2 – Soluções para *A. nidulans*

2.2.1 - Solução de elementos-traço (Cove, 1966)

Borato de sódio decahidratado.....	40mg
Sulfato de cobre pentahidratado.....	400mg
Sulfato de ferro heptahidratado.....	532mg
Sulfato de manganês monohidratado.....	292mg
Molibdato de sódio bihidratado.....	800mg
Sulfato de zinco heptahidratado.....	8g
Água destilada estéril (q.s.p.).....	1000mL

Esta solução foi mantida sob clorofórmio (2mL), a 4°C.

2.2.2 - Solução de sais (Cove, 1966)

Cloreto de potássio.....	26g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	26g
Solução de elementos-traço.....	50mL
Fosfato de potássio monobásico.....	76g
Água destilada estéril (q.s.p.).....	1000mL

Esta solução foi mantida sob clorofórmio (2mL), a 4°C.

2.2.3 - Solução de vitaminas (Cove, 1966)

Ácido fólico	25mg
Ácido nicotínico.....	100mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	25mg
B-mesoinositol.....	200mg
Biotina.....	1mg
Cloreto de Colina.....	100mg

Piridoxina.....	50mg
Pantotenato de cálcio.....	100mg
Riboflavina.....	100mL
Tiamina.....	50mg
Água destilada estéril (q.s.p.)	100mL

Esta solução foi mantida em frasco escuro sob clorofórmio (1mL), a 4°C.

2.2.4 - Solução de casaminoácidos ou caseína hidrolisada

Caseína hidrolisada.....	20g
Água destilada estéril (q.s.p.)	100mL

Esta solução foi mantida em frasco escuro sob clorofórmio (1mL), a 4°C.

2.2.5 - Solução de ácido nucléico hidrolisado

Para a obtenção desta solução foram dissolvidos separadamente, 2g de ácido nucléico de levedura em 15mL de HCL (1N), e 2g em 15mL de NaOH (1N). Estas soluções foram aquecidas por 20 minutos, em banho maria, misturadas, e o seu pH ajustado em 6,0. A mistura foi filtrada, o volume final completado para 40mL de água destilada e estocada a 4°C, sob clorofórmio (1 mL).

2.3 - Meios de cultura

2.3.1 - Meio mínimo (MM) (Cove, 1966)

Solução de sais.....	20mL
Água destilada (q.s.p).....	1000mL

O pH do meio foi ajustado em 6,8 e em seguida autoclavado a 1 atm e 120°C durante 20 minutos. As soluções de glicose (50mM) (fonte de carbono) e de nitrato de sódio (70mM) (fonte de nitrogênio), foram autoclavadas separadamente e então acrescentadas ao meio. No preparo do meio mínimo sólido foi adicionado 1,5% de ágar antes deste ser autoclavado.

2.3.2 - Meio completo (MC) (Cove, 1966)

Solução de sais.....	20mL
Solução de vitaminas.....	2mL
Solução de casaminoácidos	10mL
Solução de hidrolisado de ácido nucléico.....	2,5mL
Peptona.....	2g
Extrato de levedura.....	1g
Água destilada (q.s.p.).....	1000mL

O pH do meio foi ajustado em 6,8 e em seguida autoclavado a 1 atm e 120°C durante 20 minutos. As soluções de glicose (50mM) (fonte de carbono) e de nitrato de sódio (70mM) (fonte de nitrogênio), foram autoclavadas separadamente e então acrescentadas ao meio. No preparo do meio completo sólido foi adicionado 1,5% de ágar antes deste ser autoclavado.

2.4- Soluções para obtenção de protoplastos

2.4.1- Solução CT

Sulfato de amônio.....	0,4M
Sacarose.....	1% (m/v)
Ácido cítrico.....	0,05M

O pH da solução foi ajustado em 6,0 em seguida autoclavada a 1 atm e 120°C durante 20 minutos.

2.4.2- Solução DT

Cloreto de potássio.....	0,6M
Cloreto de cálcio.....	0,1M
Tris-HCl.....	0,01M

O pH da solução foi ajustado em 7.5 em seguida autoclavada a 1 atm e 120°C durante 20 minutos.

2.4.3- Solução ET

Cloreto de potássio.....	0,6M
Cloreto de cálcio.....	0,1M
Tris-HCl.....	0,01M
PEG 8000.....	25% (m/v)

O pH da solução foi ajustado em 7.5 em seguida filtrada em membrana “Millipore”.

2.4.4- Meio mínimo com sacarose (MMS) para regeneração de protoplasto

Solução de sais.....	20mL
Glicose (1%).....	10g
Sacarose (1M).....	342g
Água destilada (q.s.p)	1000mL

O pH do meio foi ajustado em 6,8 e em seguida autoclavado a 1 atm e 120°C durante 20 minutos. Foi utilizado ágar 1,5% (m/v) para o meio

plaqueado ("bottom ágar") e 0,8% (m/v) para o meio a ser misturado com os protoplastos ("top ágar"). A solução de nitrato de sódio (70mM), fonte de nitrogênio, e as soluções de vitaminas ou aminoácidos requeridas para suprir as deficiências nutricionais (auxotrofias) da linhagem de *A. nidulans* utilizada, foram acrescentadas ao meio, quando necessário.

2.5- Soluções e meio de cultura para *E. coli*

2.5.1- Solução de X-gal (5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactoside) (Sambrook *et al.*,1989)

A solução estoque de X-gal foi preparada em N'dimetilformamida na concentração 20mg/mL. Esta solução foi mantida a -20°C em frasco escuro.

2.5.2- Solução de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosyranside) (Sambrook *et al.*,1989)

A solução estoque de IPTG foi preparada em água esterilizada na concentração 20mg/mL. Esta solução foi mantida a -20°C em frasco escuro.

2.5.3- Meio de cultura de Luria e Bertani (LB) (Sambrook *et al.*,1989)

Triptona.....	10g
Extrato de levedura.....	5g
Cloreto de potássio.....	0,2g
Cloreto de cálcio.....	0,6g
Água destilada (q.s.q).....	1000mL

O pH do meio foi ajustado em 7,4 e em seguida autoclavado. Quando necessário, adicionou-se ágar ao meio antes da autoclavagem.

Para a seleção de bactérias resistentes à ampicilina, o meio foi suplementado com 50µg do antibiótico por mL de meio de cultura.

2.6- Soluções de agentes inibidores

2.6.1- Soluções de acriflavina e brometo de etídio

As soluções de acriflavina e brometo de etídio foram preparadas em água destilada esterilizada nas concentrações de 25mg/mL e estocadas a 4°C em frascos escuros.

2.6.2 – Soluções de tioconazol e terbinafina

As soluções de tioconazol e terbinafina foram preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO) nas concentrações de 250µg/mL e estocadas a 4°C em frascos escuros.

2.7- Estoque das linhagens

2.7.1- Estoque das linhagens de *A. nidulans*

Para a preservação das linhagens de *A. nidulans* por um longo período, estas foram mantidas em grânulos de sílica gel. Neste caso, os esporos de culturas recém cultivadas foram ressuspensos em algumas gotas de leite em pó desnatado, diluído a 5% (m/v) e transferidos para tubos ou frascos contendo sílica gel esterilizada e seca. Para utilização de uma determinada linhagem alguns grânulos de sílica foram colocados em placas de Petri contendo meio completo. Esta técnica permite que os repiques das linhagens sejam sempre obtidos de um mesmo estoque, evitando assim subculturas sucessivas.

2.7.2- Estoque das linhagens de *E. coli*

As linhagens de *E. coli* foram crescidas em meio líquido LB por 12-24 horas, a 37°C e alíquotas de 1 mL do meio contendo 15%(v/v) de glicerol estéril foram congeladas a -80°C. Quando necessário, uma alíquota era descongelada e inoculada no meio apropriado. As bactérias contendo plasmídeo com resistência ao antibiótico ampicilina foram estocadas na presença deste antibiótico (50µg/mL).

2.8- Vetores

O plasmídeo pRG4 que foi utilizado como vetor de clonagem foi construído pela substituição da região “polylinker” do plasmídeo pRG3 (pUC19) pela respectiva região do plasmídeo pSK +/- “bluescript” (May *et al.*,1989). Ele contém o gene *pyrG* de *Aspergillus niger*, que complementa a mutação *pyrG89* de *A. nidulans* (Verdoes *et al.*,1994). Este possui também, um sistema azul/branco da β-galactosidase (*lacZ* α-peptídeo) e o gene de resistência à ampicilina, permitindo a seleção em bactérias de plasmídios recombinantes.

Outros vetores utilizados foram os seguintes: pUC19/*Sma*I e BamHI (Amershan Biosciences), pUC18/*Sma*I e BamHI (Amershan Biosciences), pMOS (Amershan Biosciences), pGEM-T “easy vector” (Promega) e pJYargBC22 (cedido por Kapoor Han, Universidade de Wisconsin).

2.9- Extração de DNA plasmidial da linhagem *E. coli*

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 5mL de meio LB contendo o antibiótico ampicilina (50µg/mL) e cultivada a 37°C “overnight” sob vigorosa agitação. Em seguida, a cultura foi transferida para um tubo e centrifugada a 12000 x g por 1 minuto a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado bacteriano foi ressuspendido três vezes: a

primeira em 100µl de solução I gelada (Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM e EDTA 10mM pH 8,0); a segunda em 200µl da solução II (SDS 1% (m/v) e NaOH 0,2M) misturando-se por inversão e mantida no gelo por alguns minutos; a terceira em 150µl de solução III gelada (KOAc 60mL e ácido acético glacial 11,5mL) misturando-se por inversão e mantida no gelo por 3-5 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), misturou-se e centrifugou-se a 12000 x g por 2 minutos a 4°C para separar as fases. O sobrenadante foi outra vez transferido para um tubo limpo e adicionado 2 volumes de etanol e 1/10 (v/v) volume de acetato de sódio 3M. Manteve-se a mistura no gelo por 5 minutos e centrifugou-se a 12000 x g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, o precipitado lavado com etanol 70% (v/v) a 4°C, e ressuscitado em 50µl de tampão TE pH 8,0 contendo RNase (20µg/mL).

2.10- Preparo da suspensão de conídios de *A. nidulans*

Conídios da linhagem de *A. nidulans* cultivados em meio completo a 37°C por 48 horas, foram coletados com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e suspensos em 10mL de solução salina 0,8%(v/v)-tween-80 0,01% (v/v). Essa suspensão foi agitada para promover desagregação das cadeias de conídios e em seguida filtrada através de lã de vidro para remoção das hifas. Para uma suspensão mais concentrada e limpa, o volume total foi submetido a centrifugação por 5 minutos, a 3000 x g e o precipitado foi ressuscitado em um volume menor de solução salina. O número de conídios por mililitro da suspensão foi estimado a partir de uma diluição a 10^{-2} , contando-os em hematímetro sob microscópio.

2.11- Extração de DNA genômico de *A. nidulans*

Aproximadamente 10^7 conídios da linhagem que teria seu DNA extraído foram inoculados em meio completo líquido, e incubados sob constante agitação por 24 horas a 37°C. Decorrido este tempo a cultura foi filtrada através de um funil de “Buchner” e o micélio resultante foi prensado entre duas folhas de papel filtro para remoção do excesso de umidade e em seguida pesado. O micélio foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido até tornar um pó.

Ao micélio em pó (4g) foi acrescentado 20mL do tampão de extração de DNA (Tris-HCl 200mM, NaCl 250mM, SDS 0,5% (v/v) e EDTA 25mM pH 8,0) e 20 mL de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl, pH 8,0, pré-aquecidos a 65°C em banho maria. Esta solução foi mantida em banho maria a 65°C sob suave agitação durante 20 minutos e centrifugada a 15000 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e acrescentado 20 mL de fenol à temperatura ambiente e novamente centrifugado a 15000 x g por 10 minutos. Uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada ao sobrenadante coletado e em seguida centrifugado a 15000 x g durante 15 minutos. Um volume da mistura clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foi acrescentado ao sobrenadante coletado e centrifugado a 15000 x g durante 5 minutos. Após a extração do sobrenadante, foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol e em seguida o DNA foi coletado com uma pipeta “Pasteur”, lavado em solução de álcool 70% (v/v) e transferido para um eppendorf contendo 100 µl de TE estéril.

2.12- Construção da biblioteca genômica do segregante 1 duplo mutante *acrA1 tebA7* de *A. nidulans*

Clivagens parciais de DNA da linhagem segregante 1 duplo mutante *acrA1 tebA7* foram executadas pela enzima de restrição *SauA3I* em intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos, para padronizar a reação que fornecia a maior quantidade dos fragmentos de interesse (5-15Kb). A clivagem do

DNA por enzimas de restrição foi realizada nos tampões e condições descritas pelo fabricante (Amersham Biosciences). A reação foi interrompida por inativação térmica (65°C) e os fragmentos resultantes foram resolvidos em gel de agarose “low-melting” 1% (m/v), em uma corrida eletroforética de 12 horas à temperatura ambiente, com uma voltagem de 160V. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10mg/mL) e as regiões contendo os fragmentos de interesse (5-15Kb) foram recortados, equilibrados em 100µl de tampão TE por 4 horas a 65°C, para eluição do DNA. Todo o tampão foi recolhido, concentrado em centrífuga “SpeedVac” e o DNA concentrado foi ressuscitado em 10 µl de água estéril. Paralelamente, o método de purificação dos fragmentos digeridos por eletroeluição foi também utilizado. Os fragmentos de interesse foram recortados do gel de agarose com auxílio de um bisturi e introduzidos em um saco de diálise com 0,8mL de TAE (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M) 1/10 (v/v). As condições apropriadas para eletroeluição foram as seguintes: 300V, 20 minutos em TAE 1/10. Após a saída do DNA da agarose foi retirada a solução com o DNA e acrescentou-se 1/20 (v/v) de volume de Tris-HCl 1M, pH 8,0 e fenol (v/v) e que foi centrifugado a 15000 x g por 10 minutos. Em seguida o DNA do sobrenadante coletado foi precipitado em etanol absoluto (2,5 volumes) na presença de NaCl 250mM. Este precipitado foi lavado com etanol 80% (v/v) e dissolvido em 50µl de água esterilizada.

Aproximadamente 200 ng dos fragmentos de DNA (5-15KB) obtidos foram utilizados em reações de ligação com 50 ng do plasmídeo pRG4 *Bam*HI linearizado desfosforilado com 1U da enzima CIP (*Calf Intestine Phosphatase*) em tampão (Tris-HCl 20mM, pH 8,0; MgCl₂ 1mM; ZnCl₂ 1mM) e 1U da enzima T4 DNA ligase. Estas reações foram realizadas em um volume final de 20 µl e mantidas a 15 °C por 8 horas, e em seguida a 4°C. 5 µl de cada reação de ligação foram eletroporadas em células competentes da linhagem XL1-Blue de *E. coli* e as colônias com plasmídios recombinantes foram selecionadas em meio LB adicionado de ampicilina (50µg/mL), na presença de X-gal e IPTG. As colônias bacterianas brancas foram isoladas, cultivadas em meio LB contendo ampicilina, os plasmídios

recombinantes foram estocados como descrito no item 2.7.2 e em seguida purificados como descrito no item 2.9.

2.13- Obtenção de células competentes e transformações por eletroporação

A linhagem “XL1-Blue” de *E. coli* foi inoculada em 5mL de LB, a partir do seu estoque e cultivada a 37°C "overnight". Uma alíquota de 1 mL desta cultura foi inoculada em 200mL de LB e cultivada por mais 2 horas e 30 minutos, a 37 °C, ou até que uma absorbância (550 nm) de 0,5-1,0 fosse atingida. A seguir a cultura foi mantida em banho de gelo por 10 minutos, recolhidas por centrifugação a 4°C e lavadas 4 vezes com água destilada estéril gelada. As células obtidas foram ressuspensas em 140µl de água destilada estéril gelada e DMSO na concentração final de 7% (v/v), alíquotas de 40 µl foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

Uma alíquota de 40µl de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu o DNA transformante (10-50ng). Esta mistura foi colocada em uma cubeta de 0,2 cm, previamente gelada. A cubeta contendo as células e o DNA transformante foi colocada no aparelho da “Bio Rad Gene Pulser” programado nos seguintes parâmetros: 2,5 Kv; 25µF e 2,5 m Sec. Após o pulso as células transformadas receberam a adição de 1mL de meio LB (sem antibiótico) e foram cultivados por 1 hora a 37°C. Alíquotas da transformação foram espalhadas sob meio LB sólido acrescido de antibiótico e cultivados por 14-24 horas a 37°C.

2.14- Obtenção de células competentes e transformações por “heat shock”

A linhagem DH5αfF’ (ou XL1-Blue) foi inoculada em 20mL de LB, a partir de uma célula isolada que foi previamente estriada do estoque e cultivada por 12-24 horas a 37°C. 10 mL desta cultura foram inoculados em

250mL de LB e cultivados por mais 2 horas e 30 minutos até que uma absorbância (550nm) de 0.4-0.5 fosse atingida. A cultura foi então colocada em banho de gelo por 15 minutos, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g a 4°C. A seguir as células foram ressuspensas em 125mL de tampão I (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50mM), esta solução foi incubada em banho de gelo por 15 minutos e as células foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g a 4°C. O precipitado foi ressuspensado em 3,5mL de tampão II (Tris-HCl 10mM, pH 7,5, CaCl₂ 50mM, glicerol 15% (v/v)), as células foram aliqüotadas em volumes de 200 µl e a seguir congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Uma aliqüota de 200 µl de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de DNA transformante (50-100ng). A mistura de células e DNA foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente recebeu o “heat shock” a 47°C por 1 minuto e 45 segundos. A seguir as células foram imediatamente incubadas em banho de gelo por 5 minutos e 1mL de LB (sem antibiótico) foi adicionado às células transformadas que foram incubadas por 1 hora a 37°C. Aliqüotas da transformação foram incubadas sobre meio LB sólido acrescido de 50µg/mL de ampicilina e soluções de IPTG e X-gal. A seguir as placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

2.15- Obtenção de protoplastos de *A. nidulans*

100µl de suspensão de conídios de concentração 10⁹ conídios/mL foram inoculados em 100 mL de meio completo líquido suplementado com uracil e uridil e cultivados por 5 horas a 37°C. À massa micelial obtida, após centrifugação a 5000 x g por 5 minutos, foram adicionados 20mL de KCl 0,6 M, 10 mg de glucanex e por último 0,4 mL de MgSO₄. Em seguida esta mistura foi incubada por 4 horas a 32°C em agitação de 60 x g, para a obtenção dos protoplastos. A solução de protoplastos foi centrifugada por três vezes, sendo que, na primeira vez por 10 minutos e ressuspensada em 20mL de solução CT, na segunda vez por 5 minutos e ressuspensada em

20mL de DT e por último, por 5 minutos ressuspensa em 500 µl da solução DT.

2.16- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) para o tioconazol, acriflavina e terbinafina

Uma alíquota de 100µl de suspensão contendo 10^7 de conídios/mL da linhagem GR5 foi inoculada e espalhada com a alça de “Drigalski” em meio MMS suplementado com antimicótico tioconazol nas concentrações de 7,0; 14,0; 20,0; 30,0; 40,0; 70,0 e 80,0µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para uma suspensão de conídios protoplastizados/mL, nas mesmas concentrações acima citadas.

Para determinarmos o CIM da acriflavina para conídios e protoplastos para acriflavina foram utilizadas as seguintes concentrações de 8,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 70,0 e 80,0µg/mL e para a terbinafina foram as seguintes: 0,01, 0,25, 0,1, 1,0, 10,0 e 20,0µg/mL. Três experimentos independentes com três repetições de cada foram realizados e as placas foram incubadas a 37°C durante 3 dias.

A partir da observação dos resultados foi possível estabelecer o CIM de cada linhagem frente a cada droga, que é definido como a menor concentração da droga em que não se observa o crescimento macroscópico do fungo.

2.17- Transformação de *A. nidulans*

A uma alíquota de 100µl da solução de protoplastos de uma linhagem receptora de *A. nidulans*, como por exemplo a GR5, contendo cerca de 10^7 protoplasto/mL de solução DT, foram adicionados de 5,0 a 10,0µg de DNA plasmidial proveniente de clones da biblioteca em estudo e 50µl de tampão ET. Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 20 minutos, em seguida acrescentou-se 1mL de solução ET e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir foi acrescentada a esta mistura

1mL de solução de meio de regeneração MMS com ágar (0,8%), pré-aquecidos a 47°C e a mistura foi espalhada em placas de petri contendo o mesmo meio de regeneração MMS com ágar (1,5%), quando necessário foi suplementado com 25,0µg/mL de acriflavina. As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 4 dias para a obtenção de colônias transformantes de *A. nidulans*. Para este experimento realizamos vários controles: (a) para o controle da eficiência da transformação dos protoplastos da linhagem sensível à acriflavina e receptora GR5 foi utilizado 1,0–10,0µg do DNA plasmidial pRG4 em meio sem acriflavina, uridina e uracila. Para o segundo controle (b) foi utilizado protoplastos que foram transformados com o DNA plasmidial pRG4 e/ou com o vetor pUC/18Sma I em meio com 25,0µg/mL de droga sem uridina e uracila. E para o último controle (c) foi denominado de mutagenicidade que constitui em cultivar somente protoplastos em meio com acriflavina (25,0µg/mL), na presença e ausência de uridina e uracila.

2.18- Subclonagem do clone C08 da biblioteca genômica do segregante 1 de *A. nidulans*, envolvido na resistência à acriflavina, pela estratégia de “shotgun”

Antes de iniciarmos a técnica de “shotgun”, extraímos o DNA plasmidial do clone bacteriano denominado de C08 da biblioteca do segregante 1 duplo mutante *acrA1 tebA7* por QIAGEM e confirmamos o seu padrão de restrição pela digestão com as enzimas de restrição *Xba* I e *Pst* I. Em seguida, o DNA deste clone foi nebulizado (método físico de digestão do DNA) para obtenção de fragmentos randômicos.

Para a nebulização, o DNA plasmidial foi acrescentado à seguinte solução:

DNA (150µg).....	100µl
1M Tris-HCl(pH 8,0).....	100µl
1M MgCl ₂	30µl
Glicerol 50% (v/v).....	1mL
Água milli-Q (q.s.p).....	2mL

Esta solução foi transferida para a câmara do nebulizador que, acoplado a um cilindro de argônio (contendo um manômetro e dentro de uma câmara fria) exerceu sobre o DNA uma pressão de 3Kgf/cm por 3 minutos. Depois deste processo o recipiente nebulizado foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos e dividiu-se a solução obtida em 4 “eppendorfs”. O DNA fragmentado foi então, precipitado com acetato de sódio 3M (0,1 volume) e etanol 95% (v/v) e após 30 minutos a -80°C , este foi submetido à centrifugação por 30 minutos, 13000 x g, 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% durante 15 minutos e centrifugado a 13000 x g a 4°C . Depois de seco o DNA foi ressuspenso em água “milliQ” autoclavada, e o volume dos quatro eppendorfs foram transferidos para um único tubo, dando um volume final de aproximadamente 50 μl . Deste volume 4 μl foram aplicados em gel de agarose 0.8% (m/v) para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos.

O próximo procedimento foi o reparo das extremidades dos fragmentos produzidos, pois há a necessidade de extremidades abruptas para que estes fragmentos randômicos sejam clonados no sítio *Sma*I do vetor pUC18. Foi utilizada uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase e a Klenow DNA polimerase na seguinte reação:

Fragmentos de DNA.....	44,0 μl
50mM MgCl_2	2,0 μl
0,5mM de dNTPs.....	6,0 μl
T4DNA polimerase (8,3U/ μl).....	3,0 μl
Água estéril.....	3,6 μl

A reação foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e a seguir foram adicionados 2 μl (6U/ μl) da Klenow. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 100 μl de fenol, homogeneizou-se por vortex e centrifugou-se por 2 minutos, a 13000 x g. Este procedimento com fenol foi repetido ainda uma segunda vez, somente então o DNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol 95% (v/v), como

já descrito anteriormente e lavado com etanol 70% (v/v). Depois de seco o material foi ressuspenso em 46µl de água estéril.

Para que a ligação com vetor fosse possível, as extremidades 5' dos fragmentos obtidos foram fosforiladas pela enzima T4 polinucleotídeo quinase na seguinte reação:

DNA.....	46,0 µl
20mM ATP.....	6,0 µl
T4 PNK (10U/µl).....	1,0 µl
10x tampão T4 PNK.....	6,0 µl
100 Mm DTT.....	1,0 µl

Esta solução foi incubada a 37°C por 30 minutos, e em seguida a T4 polinucleotídeo quinase (PNK) foi inativada a 65°C por 5 minutos. Para a recuperação dos fragmentos de 0,7 a 2,0Kb foi preparado um gel de agarose “Low Melting Point” 0,7% (v/v) em tampão TAE 1x sem brometo de etídeo. Toda a amostra foi aplicada no gel e paralelamente às amostras, foram aplicados marcadores de pesos moleculares, de modo a indicar (após coloração separada com brometo de etídeo) a porção do gel que continha os fragmentos de interesse. Então o gel de agarose foi recortado e em seguida recuperado e colocado em tubos “eppendorfs”, os quais foram aquecidos a 65°C por 15 minutos, para a fusão do gel.

Para extração do DNA, adicionou-se 500µl de fenol, agitou-se no vortex e centrifugou-se por 15 minutos, a 13000 x g. Recuperado o sobrenadante, o DNA foi então precipitado com acetato de sódio 3M e etanol absoluto, e em seguida lavado com etanol 70% (v/v).O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspenso em 25µl água esterilizada.

A concentração de DNA desta solução foi determinada a partir da absorbância a 260nm lida em espectrofotômetro, e também em gel de agarose. A próxima etapa consistiu na ligação dos fragmentos ao vetor na seguinte reação:

DNA (400ng).....	5,0µl
Ligase (10U/µl).....	1,0µl
Buffer 10x.....	2,0µl
PUC/18Sma I.....	2,0µl
Água estéril.....	10,0µl

Esta solução permaneceu “overnight” a 4°C e então realizamos a eletroporação para a transformação de bactérias. Estas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina 50µg/mL, IPTG e X-Gal.

Para a montagem da sub-biblioteca, as colônias transformadas e isoladas foram inoculadas em placas de Elisa contendo meio LB líquido e ampicilina (50µg/mL) e estocadas -80°C.

2.19- Obtenção e análise do alelo selvagem do gene que confere resistência à acriflavina

2.19.1- Biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*

A biblioteca genômica cromossomo-específica da linhagem selvagem FGSC A4 *A. nidulans*, construída nos cosmídios pWE15 e pLORIST2 (Brody *et al.* 1991), foi adquirida do “Fungal Genetics Stock Center, Kansas-USA”. O cosmídio pWE15 (*Stratagene*) possui os genes de resistência à ampicilina e à canamicina e o pLORIST2 possui o gene de resistência à canamicina. A biblioteca possui aproximadamente 4800 clones bacterianos construídos nestes vetores, e estocados em meio LB sólido suplementado com canamicina. Estes clones foram cultivados em meio LB líquido suplementado com o mesmo antibiótico (50 µg/mL), e incubados a 37°C por 24 horas. À estas culturas foi acrescentado glicerol estéril na concentração final de 15% (v/v) antes de serem congeladas. As placas foram mantidas em freezer a -80°C.

2.19.2- Preparação das membranas de “nylon” da biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*

Uma membrana de “nylon” recortada no formato de uma placa de elisa foi colocada sobre a superfície de uma placa de petri contendo colônias bacterianas da biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*, cultivadas em meio LB sólido suplementado com antibiótico canamicina (50 µg/mL). Desta maneira os clones da biblioteca foram transferidos para a membrana de “nylon”. Em seguida a membrana foi tratada com as seguintes soluções: SDS 10% por 3 minutos, solução desnaturante (0,5N NaOH, 1,5M NaCl) por 5 minutos, solução neutralizante (1,5M NaCl, 0,5M Tris.Cl [pH 7.4]) por 5 minutos e por último na solução de SSC (2x) (v/v) por 5 minutos. Após este tratamento a membrana ficou secando por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi exposta à luz ultra violeta do transiluminador por 2 minutos para a fixação das moléculas de DNA na membrana.

2.19.3- Marcação da sonda

Foi utilizado como sonda um fragmento do clone C08 que foi capaz de retransformar a linhagem sensível em resistente à droga em estudo, no rastreamento do gene selvagem supostamente presente na biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*. Este fragmento foi também usado como sonda nos experimentos de “*southern blotting*” e “*northern blotting*”. O fragmento subclonado no plasmídeo pUC18/*Sma* I era obtido pela digestão com as enzimas *Kpn*I e *Bam*HI, extraído e purificado do gel de agarose 0.8% (m/v) através do Kit “ConcertTM Nucleic Acid Purification System” (Gibco BRL), segundo as instruções da fabricante. Em seguida 40ng do DNA sonda foi marcado pelo método de “random primer” utilizando o Kit “Oligolabelling System” (“Invitrogen”), seguindo as orientações do fabricante. Este DNA foi aquecido a 97°C por 7 minutos, incubado em banho de gelo, onde foi adicionado 15µl de tampão reagente

mix, 2µl de dATP 250µM, 2µl de dGTP 250µM, 2µl de dTTP 250 µM, 3µl de [α -³²P] dCTP (10 µCi/µl) e 1 µl da enzima Klenow (5U). A reação foi incubada à temperatura ambiente por 2-3 horas. Após este período, esta reação foi aquecida a 97°C por 3 minutos, resfriada rapidamente em banho de gelo e depois foi adicionada à solução de hibridação.

2.19.4- Hibridação e rastreamento de clones positivos da biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*

As membranas de “nylon” contendo o DNA foram transferidas para frascos de hibridação contendo 20mL da seguinte solução: SDS 7% (m/v), tampão fosfato de sódio 0,5M (pH 7.5), e mantidas por 1 hora a 65°C para a pré-hibridação da membrana. Após este período, 40 ng de sonda marcada radioativamente foram adicionados à solução. A hibridação ocorreu a 65°C durante 12-18 horas, sob suave agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas em solução I: 1mM de EDTA (pH 8.0), SDS 5% (m/v), tampão fosfato de sódio 40mM (pH 7.2) (2 vezes por 15 minutos a temperatura ambiente) e solução II: SDS 0.1% (m/v), tampão fosfato de sódio 40 mM (pH 7.5) por 15 minutos à temperatura abaixo da temperatura de hibridação, quando necessário, para retirar o excesso da sonda marcada. Após as lavagens, as membranas foram expostas ao filme autorradiográfico.

Um dos clones positivos da biblioteca genômica cromossomo-específica do cosmidio pWE15 foi o W27D11.

2.19.5- Identificação do inserto de interesse presente no cosmidio W27D11

Primeiramente digerimos 10µg de DNA do clone W27D11, em cada uma das seguintes reações: 1- *EcoR* I (enzima de restrição presente no “polylinker” do vetor pWE15), 2- *EcoR* I e *BamH* I, 3- *EcoR* I e *Pst* I, 4- *EcoR* I e *Kpn* I, 5- *EcoR* I e *Hind* III, 6- *EcoR* I e *Sma* I e 7- *EcoR* I e *Xba* I, 8-

Not I (enzima de restrição, também presente no “polylinker” do vetor pWE15), 9- *Not* I e *Bam*H I, 10- *Not* I e *Pst* I, 11- *Not* I e *Kpn* I, 12- *Not* I e *Hind* III, 13- *Not* I e *Sma* I e 14- *Not* I e *Xba* I. Assim obtivemos quatorze padrões de restrição com as enzimas acima relatadas, que foram identificados em gel de agarose 0.8 % (m/v). A seguir o gel recebeu o seguinte tratamento: 10 minutos em solução despurinizante (HCl 0.2M), 45 minutos em solução desnaturante (NaOH 0.5M, NaCl 5M), 30 minutos em solução neutralizante (Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M [pH 7.2]), a solução foi trocada e o gel foi tratado por mais 15 minutos com esta solução. A cada troca de solução o gel foi lavado com água deionizada. O sistema de transferência de DNA para uma membrana de “nylon” foi por capilaridade e montado de acordo com Sambrook *et al.*, (1989). Após a transferência, a membrana foi fixada pela luz ultra-violeta do transiluminador por 2 minutos em ambos lados da membrana e em seguida foi utilizada em experimentos de hibridação com sondas radioativas.

2.19.6- Subclonagem de fragmentos marcados pelo “Southern-blotting”

Duas bandas do padrão de restrição *Eco*R I e *Hind* III, que foram identificadas com uma sonda do clone C08, (uma de aproximadamente de 4.5Kb e a outra 2.5Kb), foram subclonadas. 500ng de DNA destas bandas foram extraídos do gel de agarose 0.8% (m/v) e purificadas através do Kit (item 2.19.3) pré-tratadas com a enzima Klenow para o preenchimento das extremidades coesivas tornando-as abruptas, e em seguida ligadas em 100ng do pUC18 *Sma*/BAP, com 5U da enzima T4 ligase, tampão da ligase 1x num volume final de 10 µl de reação a 4°C “overnight”. A seguir 5µl da reação de ligação foi usado para transformar células bacterianas de *E. coli* DH5α competentes por “heat shock” (item 2.14). O DNA plasmidial das colônias transformadas com cada fragmento foi purificado, digerido com enzimas do “polylinker” do pUC18 para confirmar o tamanho dos insertos e suas extremidades foram sequenciadas.

O fragmento de aproximadamente 4.5Kb foi extraído do clone denominado nº 2 e digerido parcialmente com a enzima *Sau3A I*. Esta enzima reconhece sítios de 4pb, GATC, que geram fragmentos compatíveis com o vetor pUC18/*Bam*HI. Em seguida, 150-400ng de DNA dos fragmentos parcialmente digeridos contendo 0.5 a 2.0Kb, foram ligados em 100ng pUC18/*Bam*HI com o auxílio da enzima T4 ligase, tendo a reação de ligação um volume final em 10µl, a qual foi mantida a 4°C por 18 horas. Após a ligação, a mistura foi usada nos experimentos de transformação bacteriana por “heat shock”. Todas as colônias transformadas foram então inoculadas em placas tipo Elisa, contendo meio LB líquido com 50µg/mL de ampicilina, cultivadas por 24 horas a 37°C, e posteriormente estocadas a -80°C. Em seguida todos os DNAs destas colônias subclonadas foram seqüenciados.

2.19.7- Seqüenciamento do gene de resistência e de seu alelo selvagem

O seqüenciamento automático foi realizado para ambos os alelos, o resistente e o selvagem, pelo aparelho “ABI Prims 377” (“Perkin Elmer”). As reações de seqüenciamento foram feitas com o Kit “Big Dye Terminator Cycle sequence Ready Reaction”, seguindo os protocolos recomendados com algumas modificações, utilizando os “primers” universais M13 “forward” ou “reverse”.

Para as análises e alinhamentos de seqüências nucleotídicas e seqüências traduzidas foram utilizados os programas “phredPhrap”, “Gene Runner”, “Clustal” e “Blast” (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.20- Análise da expressão gênica por “*northern blotting*”

2.20.1-Condições de cultivo

Conídios da linhagem de *A. nidulans* em estudo cultivados em meio completo sólido a 37°C por 48 horas, foram coletados com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e suspensos em 10mL de solução de salina. A partir desta solução preparamos uma suspensão de conídios 1×10^8 /mL, da qual 1 mL foi inoculado em 50mL de meio completo líquido e cultivado por 18 horas sob agitação. Após esse período, a massa micelial obtida foi filtrada, lavada com água deionizada estéril e transferida para 50mL de meio completo líquido, acrescido da droga em estudo, para avaliação da provável influência dela sobre a expressão do gene em estudo. O tempo de exposição do micélio, no caso da droga acriflavina, foi de 5 a 30 minutos, nas concentrações acima de 85 µg/mL, que foi a concentração mínima inibitória (CIM).

Após o crescimento das culturas na presença da droga, o micélio foi filtrado em funil de “Buchner”, congelado em N₂ líquido e mantido a – 80°C até o momento da extração do RNA.

2.20.2- Extração de RNA total

Nesta etapa foi utilizado água destilada tratada com DEPC (“Diethyl pyrocarbonate”). O DEPC foi acrescentado a água destilada numa concentração de 0.01% (v/v) e incubado a 37°C por 18-20 horas. A seguir foi autoclavado por 30 minutos.

500mg do micélio foram macerados em almofariz de porcelana e pistilo estéreis com o auxílio de nitrogênio líquido e após a completa maceração as amostras foram transferidas para tubos de 15mL, ressuspendidos com 6mL do tampão desnaturante (26mM de citrato de sódio pH 6,8; 0,5% (m/v) de N-lauril sarcosine; 125mM de β mercaptoetanol; 4M de tiocianato de guanidina), 0,6mL de acetato de sódio 3M pH 4,8, em

seguida foram incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Adicionou-se 6mL de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (125:24:1) e os tubos foram vigorosamente agitados e incubados por 15 minutos em banho de gelo. A mistura foi centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o RNA foi precipitado com mesmo volume de isopropanol. A mistura foi incubada por no mínimo 30 minutos a -20°C e centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 5 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O “pellet” (precipitado) foi seco invertendo-se os tubos em papel absorvente por 2 minutos, dissolvido em 200µl de água tratada com DEPC e incubado por 5 minutos a 65°C. A concentração do RNA foi determinada por absorbância a 260 nm e a integridade do mesmo foi testada em gel de agarose 1,5% (m/v) em condição desnaturante.

2.20.3- “Northern blot”

Quantidades iguais (20µg) de cada amostra de RNA foram misturadas com: 2µl de tampão MOPS (5x), 3,5µl de formaldeído, 10µl de formamida e 2µl de “loading buffer” (MOPS 1x, 30% (v/v) de glicerol um traço de azul de bromofenol), contendo brometo de etídio (1µg/ µl). Os RNAs foram incubados a 65°C por 15’ e a seguir foram resfriados rapidamente em banho de gelo. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão MOPS 1x, contendo 2% de formaldeído e submetidos à eletroforese por 2,5 horas a 80V. O gel de RNA foi tratado com uma solução de NaOH 0,05N por 20 minutos, lavado com água DEPC e transferido para uma solução de 20xSSC por 45 minutos. O RNA foi transferido para membranas de “nylon” (*Hybond N+/ Amersham*) por capilaridade com 4 folhas de papel filtro umedecidas em solução 20xSSC, membrana em solução 10xSSC e 2 folhas de papel filtro 2XSSC por 12 horas e fixadas à 80°C por 2 horas. O tampão MOPS 5 x foi preparado da seguinte forma: 20,6g de MOPS foram dissolvidos em 800mL de acetato de sódio 50mM (pH 8,0). O pH foi acertado para 7,0 com NaOH 2N. Adicionou-se 10 mL de

EDTA 0,5M pH8,0. O volume foi ajustado para 1000mL com água deionizada autoclavada.

As membranas foram pré-hibridadas durante 6 horas a 42°C em tubos de hibridação (10mL) contendo a seguinte solução: 5mL de Solução de Pré-Hibridação/Hibridação (12x SSC, 10X solução Denhardt's), 0,125mL de Solução de tampão fosfato de sódio 2M, 5mL de Dextran Sulfato 10x em formamida. Ao final da marcação, 25ng de sonda radioativamente marcada (50 µl), foram adicionados à solução. A hibridação ocorreu a 42°C, com leve agitação, durante 12-18 horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas em:

Solução I: 2x SSC + 0,1% de SDS (2x por 10' à temperatura ambiente).

Solução II: 0,1% de SSC + 0,5% de SDS (1x a 65°C, se necessário)

Após as lavagens, as membranas foram expostas ao filme autorradiográfico.

2.21- Nocaute gênico em *A. nidulans*

2.21.1- Gene da arginina (*argB*)

O plasmídio JYargBC22 de aproximadamente 3.0Kb foi digerido com a enzima *Sma*I liberando o gene da arginina (*argB*) de aproximadamente 1.7Kb. A seguir este fragmento de 1.7Kb foi recortado, recuperado e purificado em gel de agarose 0.8% (m/v), através do Kit de extração de bandas (Gibco), segundo o protocolo do fabricante. Uma concentração entre 100 a 300ng deste DNA do gene *argB* foi utilizada na construção do cassete para o nocaute gênico em *A. nidulans*.

2.21.2- Construção do cassete para o nocaute gênico

O mesmo clone n° 02 contendo um inserto de aproximadamente 4.5Kb clonado no vetor pUC 18/*Sma*I (2.6kb), mencionado no item 2.19.6, foi também usada para a construção do cassete do nocaute gênico. 1.0µg do DNA plasmidial do clone n° 2 foi digerido com as enzimas

EcoRV, e dois fragmentos foram obtidos, um de aproximadamente 6.0kb e o outro de 1.1Kb. A seguir o fragmento maior foi extraído e purificado em gel de agarose 0.8% (m/v) por um Kit de extração de bandas (Gibco), seguindo as instruções do fabricante. A banda de 6.0Kb obtida corresponde ao vetor pUC18 e às âncoras (parte do inserto de 4.5Kb). Este fragmento foi recortado, recuperado e purificado do gel de agarose 0.8 % (m/v) pelo Kit acima mencionado. A seguir 500ng deste DNA plasmidial da banda de 6.0Kb foi desfosforilado com 1U da enzima CIAP por 30 minutos a 37°C. Em seguida 100ng deste DNA purificado foi ligado em 200-300 ng de DNA do gene *argB* de 1.7Kb, com o auxílio da enzima ligase (5U), 1 x tampão da ligase, num volume final de 10µl, esta ligação foi incubada por 18 horas a 4°C. 5µl da ligação foi utilizada para transformar células competentes por “heat shock” (item 2.14). O fragmento de 1.1 Kb extraído do clone nº2, correspondente à parte central removida do gene que confere sensibilidade à acriflavina, foi usado como sonda nos experimentos de “*southern blotting*” para comprovar a ruptura do gene.

2.21.3- Transformação da linhagem segregante 22 de *A. nidulans* com o gene que confere resistência à acriflavina rompido pelo gene da arginina (*argB*)

A linhagem segregante 22 ($\Delta argB\ acrA^R$) foi obtida através de cruzamento entre as linhagens RAP26 ($\Delta argB\ acrA^+$) e o segregante 1 (*argB* *acrA*^R). As soluções de suspensão de conídios, dos protoplastos e os experimentos de transformação em fungos foram realizados como descrito nos itens 2.10, 2.15 e 2.17. Todos transformantes obtidos foram cultivados na ausência do aminoácido arginina e alguns posteriormente utilizados nos experimentos de “*southern blotting*”. O mutante $\Delta acrA$ foi utilizado em testes de sensibilidade a drogas.

2.22- Expressão diferencial de genes (“Differential Display”- DDRT-PCR)

Foram realizadas reações de amplificação a partir de RNA total (descrito no item 2.20.2) e de oligonucleotídeos aleatórios (“random primers”) hexâmeros (Tabela 3). 2 µg de RNA total em um volume final de 22µl foram desnaturados a 65°C por 5 minutos. A mistura de reação foi preparada contendo 10mM de DTT, 500µM de cada dNTP, 100ng de cada oligonucleotídeos (LT11C, Eca5), 5X tampão (primeira fita) (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) e 400U de transcriptase reversa M-MLV. Aos 22µl de RNA foram adicionados 18 µl da mistura de reação acima citada e em seguida foram incubados no seguinte programa de PCR: 1 ciclo de 22°C por 10 minutos; 1 ciclo de 37°C por 50 minutos e 1 ciclo de 70°C por 15 minutos. O cDNA resultante da amplificação foi reamplificado utilizando outros dois oligonucleotídeos (Eca5, Es5). O volume final da reação foi de 30µl, contendo 2µl de cDNA, 500nM de cada oligonucleotídeo, 100 µM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂, 10 X tampão para PCR (200mM Tris-HCl, pH 8.4, contendo 500mM KCl) e 1U *Taq* DNA polimerase. As reações foram incubadas a 94°C por 2 minutos e assim amplificadas por 40 ciclos utilizando o seguinte programa: 94°C por 1 minuto; 60°C por 4 minutos e 72°C por 1 minuto. As reações foram estocadas a -20°C (Graf *et al.*, 1997).

Tabela 3 Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no experimento de DDRT-PCR

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' → 3')
LT11C	TGC CAA GCT TTT TTT TTT TC
Eca5	AAG CTA ACT ACG G
Es5	GTT GAG ATC G

2.23- Amplificação de DNA e do cDNA por PCR

Foram extraídos os DNA genômicos das linhagens de *A. nidulans*, sensível (*pabaA1* e FGSC26), resistentes (segregante 1 e MSF) à acriflavina conforme descrito no item 2.11. 100ng de cada DNA genômico separadamente foi adicionado à reação contendo tampão 10 X, 10 mM de cada dNTP, 50 mM de MgCl₂, 3.2pmoles de cada oligonucleotídeo (Tabela 3) e 5U de *Taq* DNA polymerase. O volume final de reação de 50µl foi incubado no seguinte programa de PCR: 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto (por 39 ciclos) e 72°C por 8 minutos.

Tabela 4- Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no experimento para confirmar uma região na seqüência de nucleotídeos que continha um “stop códon”

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' → 3')
“Stop” F	GAA AAG ATG ATA GGA TTG GC
“Stop” R	GCA AAC CTC ACC ATA GCG

Foram extraídos os RNA totais das linhagens sensível (*pabaA1*) e resistente (segregante 1 (duplo mutante *acrA1 tebA7*)) à acriflavina de *A. nidulans* conforme descrito no item 2.20.2 . Este experimento teve por objetivo confirmar uma região e o posicionamento de um possível íntron, devido à presença de um “stop códon” nesta região. 5µl (2µg) de cada RNA total separadamente foram adicionados 28 µl de água DEPC e desnaturados a 65°C por 5 minutos. Após este tempo, foi acrescentado 3.2 pmoles do oligonucleotídeo LT11C, 500µM de cada dNTP, 5 X tampão (primeira fita) (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) e 400 U de transcriptase reversa MMLV. A reação foi incubada no seguinte programa de PCR: 1 ciclo de 22°C por 10 minutos; 1 ciclo de 37°C por 50 minutos e 1 ciclo de 70°C por 15 minutos. Esta reação foi reamplificada utilizando-se os oligonucleotídeos da tabela 4, com o seguinte programa de PCR: 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto (por 39 ciclos)e 72°C por 8 minutos.

2.24- Análise genética

2.24.1– Obtenção de heterocários

Os heterocários são um conjunto de hifas contendo núcleos geneticamente diferentes em citoplasma comum. Para a obtenção destes heterocários foi usado o método descrito por Pontecorvo *et al.* (1953). Esta técnica consiste na inoculação em meio completo, por pontos alternados e distantes um do outro 5mm, de conídios de duas linhagens com auxotrofias complementares e coloração de conídios diferentes. As placas de petri foram inoculadas por 24 horas a 37°C para permitir um pequeno desenvolvimento dos conídios e assim possibilitar a anastomose das hifas. Após este período, as partes onde as duas colônias diferentes se juntam (interfaces) eram recortadas e enterradas em meio mínimo sólido, onde foram cultivadas a 37°C para que as hifas heterocarióticas se desenvolvessem.

2.24.2– Análise meiótica

A análise meiótica foi realizada baseada no ciclo sexual de *A. nidulans*. Os segregantes meióticos foram obtidos através do cruzamento entre duas linhagens diferentes quanto a resistência, auxotrofia e a cor dos conídios. A interface deste cruzamento (heterocáριο) foi enterrada em placas contendo meio mínimo. Após um dia de incubação a 37°C, as placas de Petri foram seladas com fita crepe e colocadas novamente na estufa por 10 a 15 dias para a formação dos cleistotécios. Os cleistotécios maiores foram coletados sob lupa, limpos e rolados em meio mínimo sólido, para remoção de conídios e células de Hulle aderidas à sua parede. Cada cleistotécio isolado foi transferido para um tubo contendo 2mL de solução de salina (0,85%) e esmagado contra a parede deste tubo, para a liberação dos ascósporos. Uma alíquota de cada suspensão de ascósporos foi semeada, através de estrias, em placas contendo meio completo, para se certificar quais os cleistotécios continham ascósporos de diferentes colorações, o que

indicava os cleistotécios híbridos. A suspensão de ascóporos de um cleistotécio híbrido escolhido foi então diluída e semeada em oito placas contendo meio completo sólido, de forma a obter cerca de 30 colônias isoladas por placa. Após 48 horas de incubação, os segregantes meióticos foram inoculados, um a um, em pontos prefixados junto com as linhagens parentais em placas contendo meio completo para a obtenção de placas mestras. Os segregantes meióticos foram analisados com relação a requisitos nutricionais e resistência e sensibilidade às drogas.