

Infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana* com *Agrobacterium* para expressão transiente de proteína

Versão simplificada. Baseado em Sparkes, Imogen A, John Runions, Anne Kearns, and Chris Hawes. "Rapid, Transient Expression of Fluorescent Fusion Proteins in Tobacco Plants and Generation of Stably Transformed Plants." *Nature Protocols* 1, no. 4 (November 2006): 2019–25. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>.

Notas

Agrobacterium tumefaciens estirpe GV3101, crescer em LB com agentes de selecção (rifampicina, gentamicina, e os referentes aos genes de selecção no plasmídeo) a 28°C, 200 r.p.m. aprox. 16h.

As plantas devem ter 5-6 semanas de idade, a crescer a 25 °C, 16 hr luz, 8 hr escuridão. O meio de infiltração deve ser preparado na altura ou no dia de infiltração.

1. Preparação do meio de infiltração

0,050 g D-Glucose

1 mL MES (stock a 10x)

1 mL Na₃PO₄.12H₂O (stock a 10x)

25 uL acetoseringona (stock a 200 mM)

Prefazer para 10 mL com dH₂O.

2. Preparação do *Agrobacterium*

Centrifugar a cultura em suspensão (em tubos de 15 mL) 5 min. a 3500-4000 rpm.

Remover o sobrenadante invertendo cuidadosamente o tubo.

Adicionar 1 mL de meio de infiltração e ressuspender o pellet (por ex^o em vórtex).

Fazer uma diluição 1:10 para uma cuvette de plástico: 100 uL de suspensão e 900 uL de meio. Medir a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀).

Com o objectivo de fazer uma diluição da suspensão do *Agrobacterium* em meio de infiltração para a OD=0.1, num volume final de 1 mL (1000 uL), usar o valor obtido de absorvância na fórmula

$$Abs_i \times V_i = Abs_f \times V_f$$

$$(Abs_i \times 10) \times V_i = 0,1 \times 1000$$

Preparar a diluição usando os tubos de 2 mL.

3. Infiltração

Escolher as folhas 3, 4 e 5, contando a partir da mais nova.

Encher a seringa (sem agulha) com cerca de 0,5 mL de Agrobacterium.

Pressionar gentilmente na página abaxial (inferior), fora da zona da nervura central e pressionar o embolo devagar, até aparecer uma zona infiltrada, ou a totalidade da área foliar. Repetir noutra zona da mesma folha ou mudar de folha.

Após a agroinfiltração, as plantas podem ser mantidas nas mesmas condições de crescimento acima referidas.

Marcar com um marcador a zona de infiltração ou a folha.

Secções de folha com cerca de 0,5 cm são examinadas por microscopia confocal para detecção da proteína repórter, entre 2 a 4 dias após a infiltração.

Vídeo https://www.youtube.com/watch?v=GHC7PU_jG2M

Soluções-stock

(10x Stock): 500 mM MES (4,88 g em 50 mL) solvente dH₂O. Manter a 4°C.

(10x Stock): 20 mM Na₃PO₄.12H₂O (0,38018 g em 50 mL) solvente dH₂O. Manter a 4°C.

200 mM acetoseringona (3'-5'-dimethoxyl-4'-hydroxyacetophenone) (0,0392 g em 1 mL) solvente DMSO. Distribuir em doses de 25 µL e manter a -20 °C.