

Análise da expressão da proteína GUS em explantes sujeitos a transformação

Formador Susana Serrazina (smserrazina@fc.ul.pt)

Objectivos

Apreender as vantagens do uso de genes repórter na detecção de proteínas de interesse por co-localização.

Conhecer o teste histoquímico GUS.

O gene reporter *gus*

Introdução

Os genes repórter foram introduzidos em biologia molecular como um meio de conhecer e seguir uma variedade de eventos celulares, que de outra forma seriam difíceis ou impossíveis de observar (Davis e Vierstra, 1998). Analisam a situação do momento, permitindo ter uma ideia imediata da fiabilidade da transferência genética, eficiência, nível e localização da expressão. São genes que codificam produtos facilmente detectáveis em células individuais, quer por fluorescência e luminescência, quer por testes histoquímicos (Herrera-Estrella e Simpson, 1988).

Um dos genes repórter mais comum é o gene *gus* (ou *uid A*) de *Escherichia coli*. O seu produto de expressão corresponde à enzima β -glucuronidase e o método de detecção pode ser histoquímico (localização *in situ*) ou fluorimétrico (quantitativo). Ambos os métodos revelam sensibilidade, facilidade e rapidez de análise, permitindo obter quer dados quantitativos (nível de expressão), através da utilização de substratos fluorogénicos (4-MUG), quer qualitativos (localização de expressão), utilizando o substrato X-gluc (Slater *et al.*, 2003)

O gene *gus* existe em *Escherichia coli* e outras bactérias, vertebrados e é praticamente ausente em plantas. A enzima hidrolisa glicosídeos do tipo glucurónidos conjugados segundo a reacção muito simplificada



Vários substratos da β -glucuronidase estão disponíveis para a detecção da expressão do gene *gus*, os quais contêm o ácido D-glucopiranosidurónico ligado, através de uma ligação glicosídica, ao grupo hidroxilo de uma molécula de fluorocromo ou outra molécula detectável.

O teste histoquímico da actividade da enzima β -glucuronidase permite uma localização tecidual e celular específica, pela deposição de um precipitado azul insolúvel resultante da sua actividade. Dada a natureza destrutiva do processo, devido à utilização de reagentes tóxicos, não permite a análise *in vivo*.

Teste histoquímico para detecção da β -glucuronidase

Material

Para a detecção da actividade da enzima utiliza-se o substrato cromogénico X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido).

Tampão GUS

-0,1 M K_2PO_4 , pH 7,2;

-0,5% (v/v) Triton X-100.

Solução de X-gluc:

0,04% (p/v) de X-gluc dissolvido num pouco de DMSO (dimetilsulfóxido), em tampão GUS. Armazenar a $-20^\circ C$.

Procedimento

Explantes sujeitos a metodologias de transformação genética (ou não – controlo negativo) são colocados dentro de tubos de 2,0 mL, cobertos com solução X-gluc e incubados durante a noite a $37^\circ C$. Após este período, retira-se a solução de X-gluc e adiciona-se etanol a 70% para remover clorofilas e facilitar a observação. As amostras são mantidas à temperatura ambiente durante algumas horas, observando-se de seguida o material vegetal à lupa.

Referências

1. Davis, S.J., Vierstra, R.D. 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 36, 521-528.
2. Herrera-Estrella, L., Simpson, J. 1988. Foreign gene expression in plants. *Plant Molecular Biology. A practical approach*. C.H. Shaw. Oxford, IRL Press.
3. Slater, A., Scott, N., Fowler, M. 2003. *Plant biotechnology. The genetic manipulation of plants*. New York, Oxford University Press Inc.