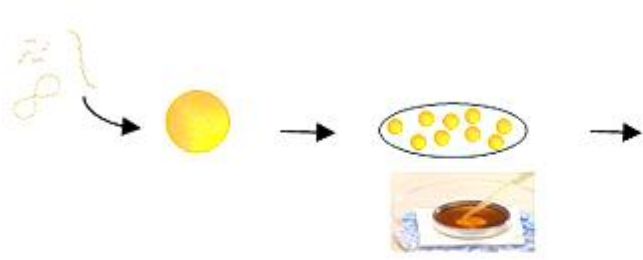


Métodos de transformação genética transiente para localização de proteínas

Teórico-prática

Outubro 2023
smserrazina@fc.ul.pt



Relembrar Fundamentos de Biologia Molecular

Gene – Proteína de Interesse: GDI, PDI

1. Isolamento a partir do ADN, ARN (ex.^o PCR) – muitas cópias do GDI

2. Clonagem inicial:

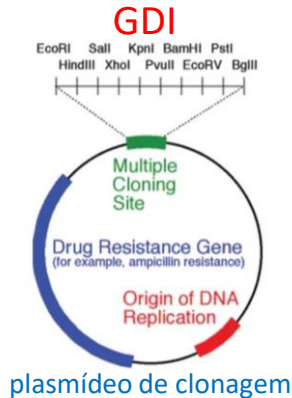
→ inserção do GDI em plasmídeo de clonagem (ex.^o enzimas restrição+ligases)

→ inserção em *E. coli*, cultura sólida com seleção, cultura líquida

→ muitas cópias do plasmídeo com o GDI e armazenamento da bactéria (estável)

→ isolamento do plasmídeo recombinante por mini-prep

3. Clonagem para inserção do GDI em diferentes **vetores de expressão**, maiores e de menor cópia

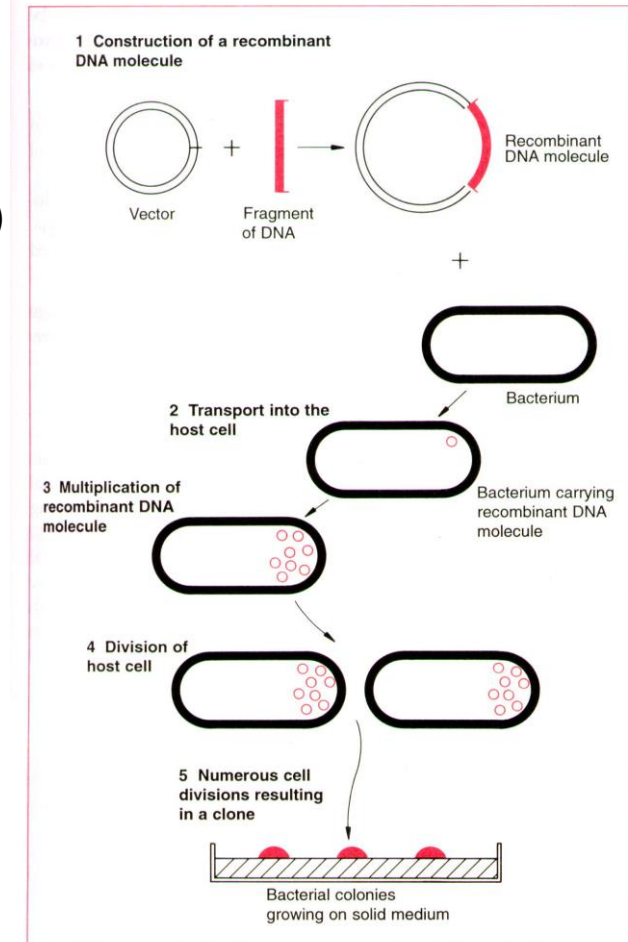


GDI

vector de expressão
com **gene repórter**

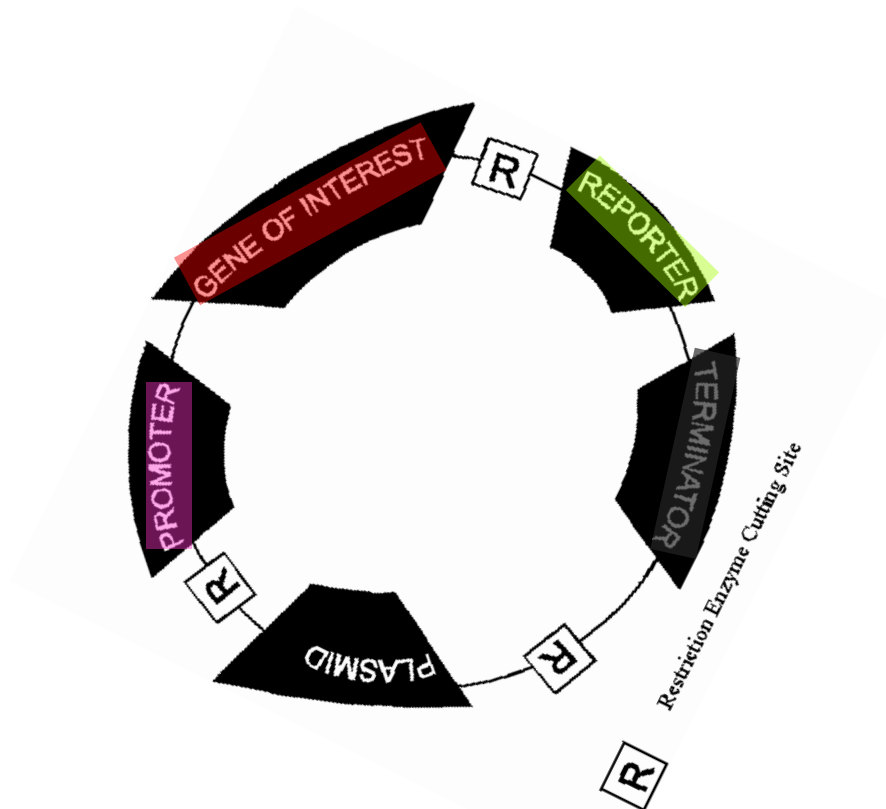
GDI

vector de expressão
para isolar a PDI



3. Clonagens seguintes:

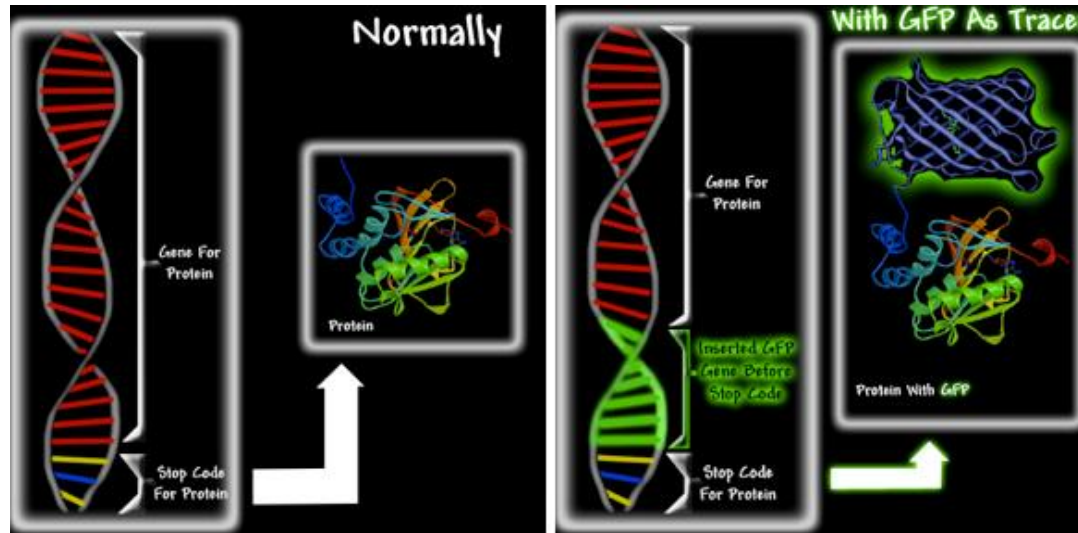
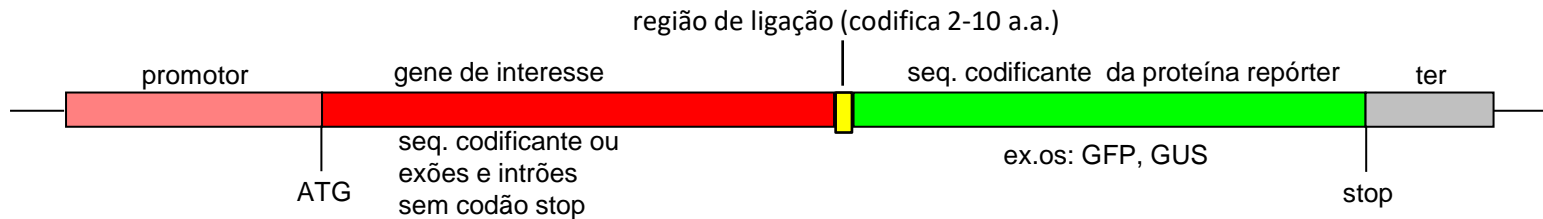
inserção do GDI num **vector de expressão**, numa cassete de expressão, associado ao gene repórter



3. Construção da **cassete de expressão**

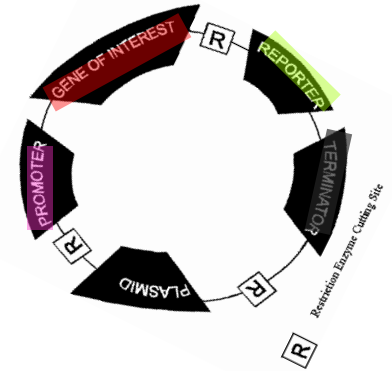
Requisitos: GDI *in frame* com gene da proteína repórter – **Proteína de fusão**

⇒ localização sub-celular de proteínas através de **co-localização com a proteína repórter**;
tráfego da proteína; interação proteína-proteína; **caracterização, função.**



3. **Cassete de expressão no vector de transformação** → *E. coli* → replicação do vector

→ isolamento do vector (mini/midi-prep)

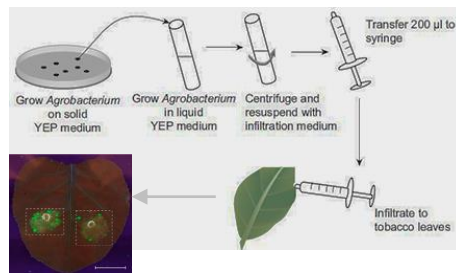


Métodos de transformação genética transiente

4. Agroinfiltração

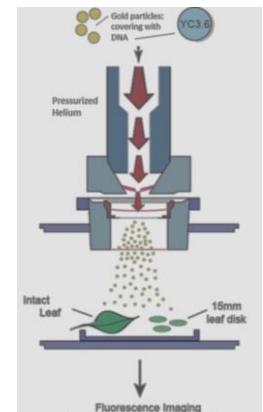
Inserção do vector no agente de transformação **Agrobacterium**

→ infiltração de folhas de *Nicotiana benthamiana*



5. Biolística

Inserção directa do vector em tecido/células



Proteína repórter

expressão forte (fácil detecção)
não presente no organismo em estudo



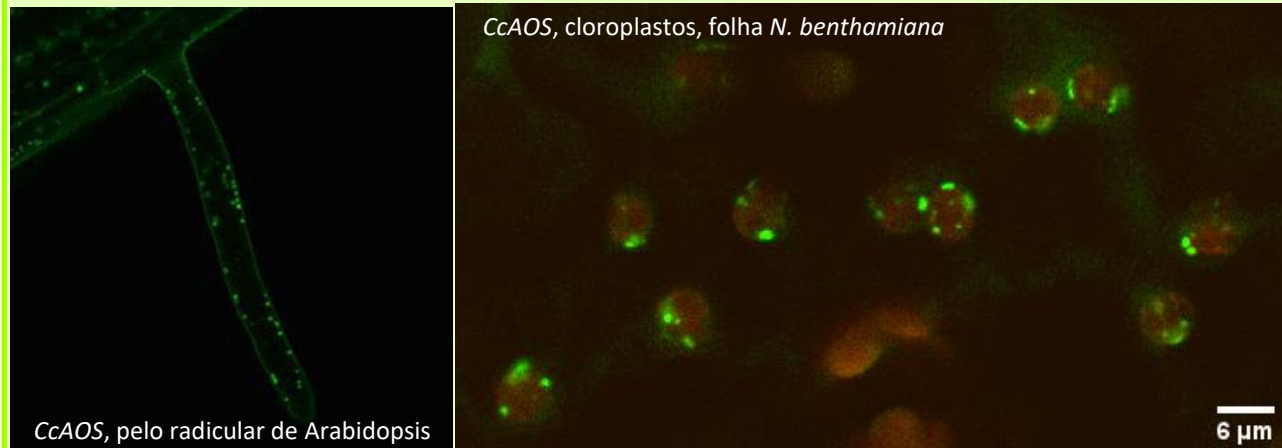
Flor (A) e pólen (B) de *Arabidopsis*. Sousa E., Malhó R. (2008). *The Plant Cell*, 20: 3050–3064.

•GUS (β -glucuronidase)

- Gene de *E. coli*
- localização *in situ*, após teste histoquímico → detecção destrutiva
- muito usada em **estudos de promotores.**

•GFP (green fluorescent protein)

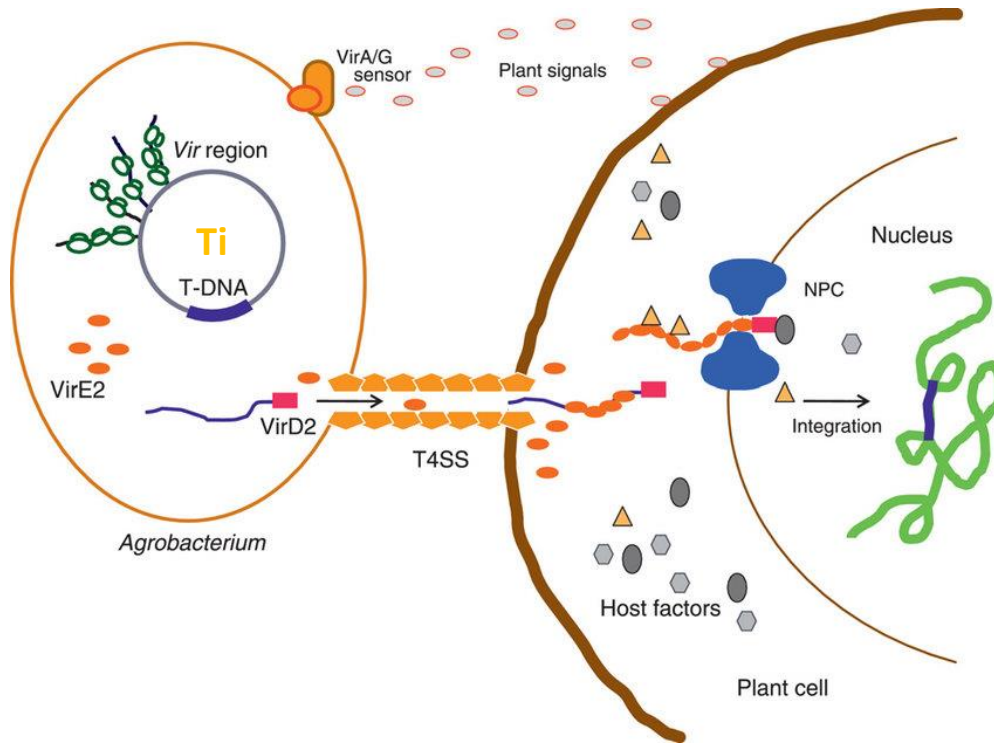
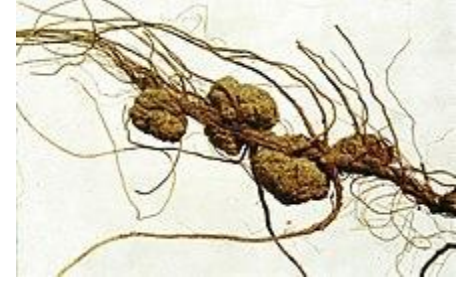
- Gene do cnidário *Aequorea victoria* e modificado
- localização *in vivo* por fluorescência (ex: azul; em: verde)
→ permite detecção progressiva em tempo real
- muito usada em **deteção subcelular.**



Serrazina S., Malhó R. et al. (2021), *Front. Plant Sci.* 12:628697

Agrobacterium: bactérias Gram-negativas

A. *tumefaciens* pode transferir parte do DNA (T-DNA) do plasmídeo Ti (tumor-inducing) para plantas



T-DNA em wild-type:

Enzimas para a produção dos A.A. octopina e nopalina, fontes de C e N para a bact.

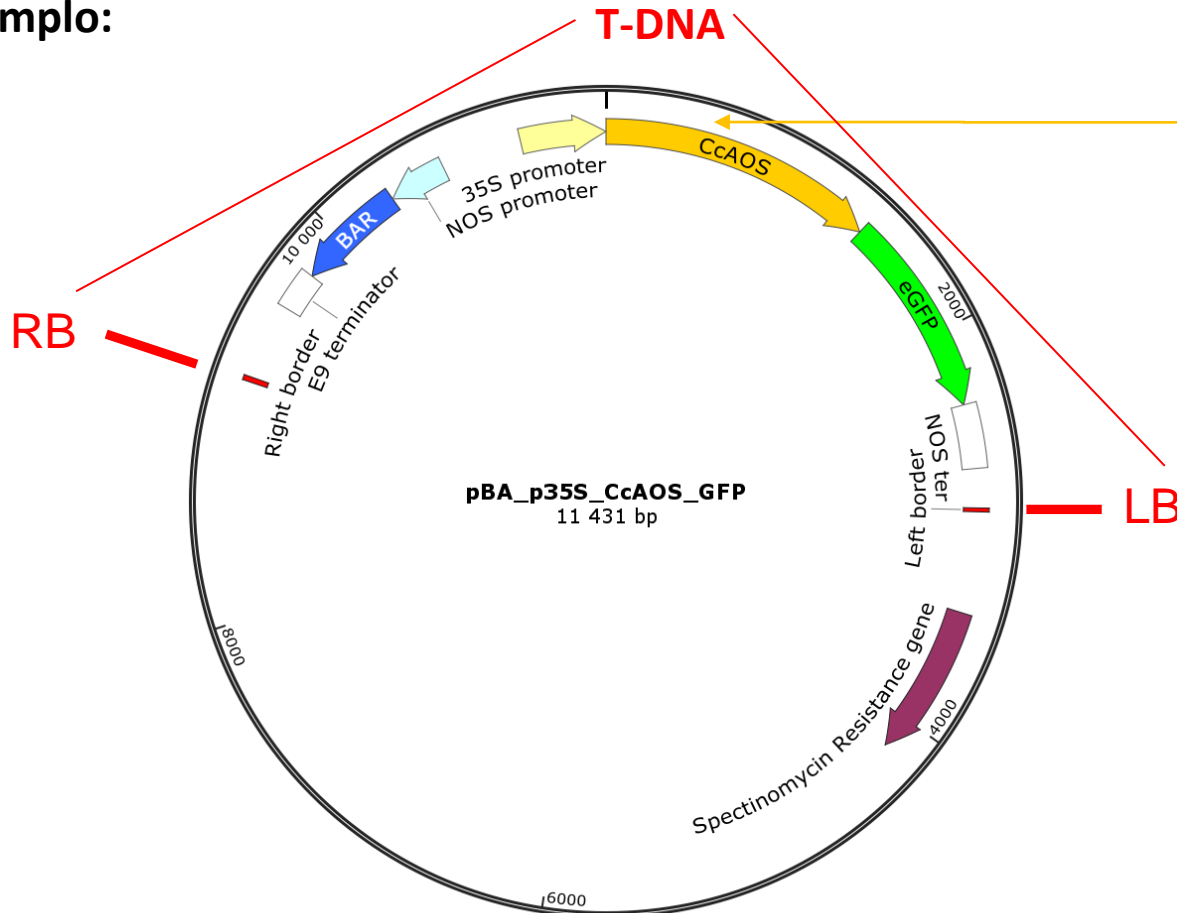
Hormonas vegetais: auxinas e citocininas → desregulação hormonal → tumor

Agrobacterium geneticamente modificado - ferramenta de Eng.^a Genética

Plasmídeo Ti:

- deleção dos genes *vir* do T-DNA em wild-type;
- ficam as extremidades LB e a RB;
- clonagem no T-DNA de **cassetes de expressão** promotor - gene repórter e promotor – gene de selecção → **vector de transformação**

Exemplo:



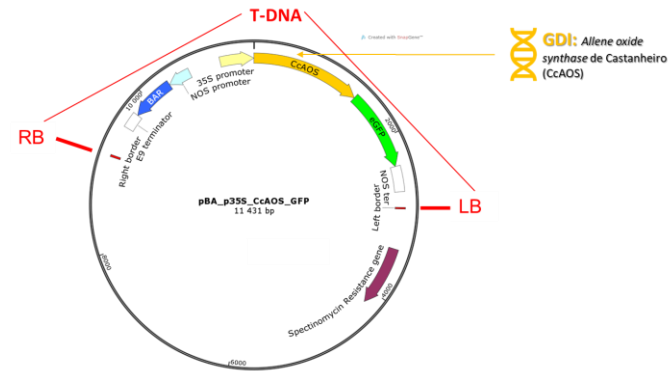
 **GDI:** *Allene oxide synthase* de Castanheiro (CcAOS)

Promotores **constitutivos** → **expressão forte:**

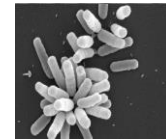
- 35S (viral)
- NOS (bacteriano)

Gene BAR: resistência ao herbicida Bialaphos, precursor do glufosinato.

Vector de transformação



4. Introdução em *Agrobacterium* estirpe GV3101



Agroinfiltração em folhas de *Nicotiana benthamiana*

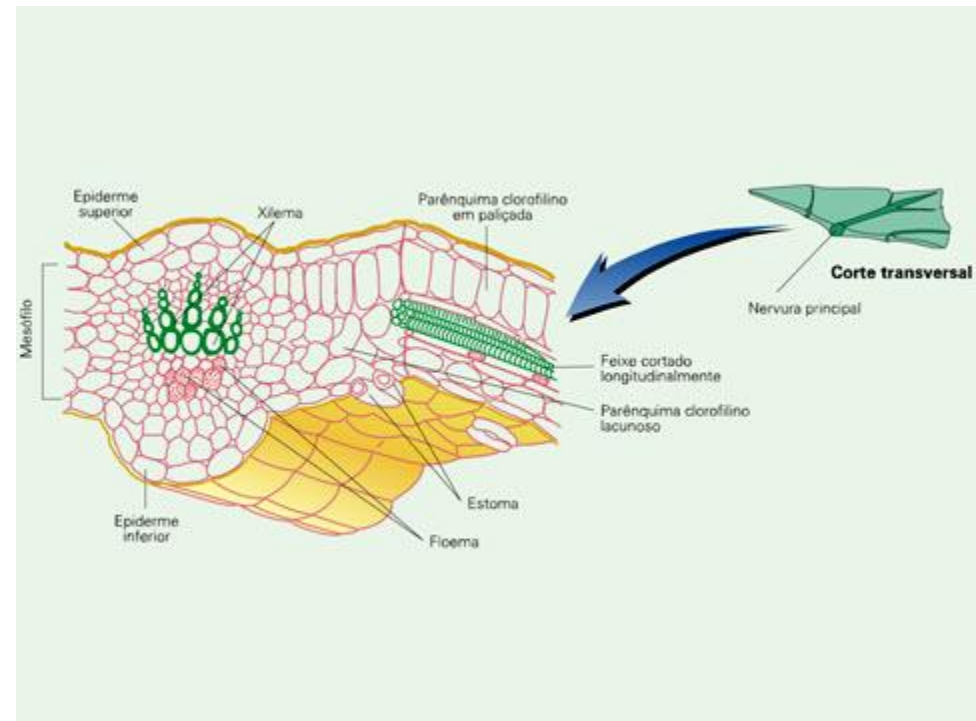


4. Agroinfiltração

Uma suspensão de *Agrobacterium* com acetoseringona* é injectada no interior do tecido foliar, na página abaxial, passa através dos estomas para o parênquima lacunoso. A bactéria fica nos espaços intercelulares e transfere a casete de expressão no T-DNA para as células da planta.

Verificação da expressão da PDI: 2 a 4 dias d.a.i.

Vantagem: rapidez.



*Acetoseringona: aumenta a virulência do *Agrobacterium* → promove a transferência do T-DNA para a planta. Composto fenólico secretado por plantas dicotiledóneas em locais de ferida, envolvido no reconhecimento da planta pelo *Agrobacterium*. Aumenta a taxa de transformação transiente.

5. Biolística

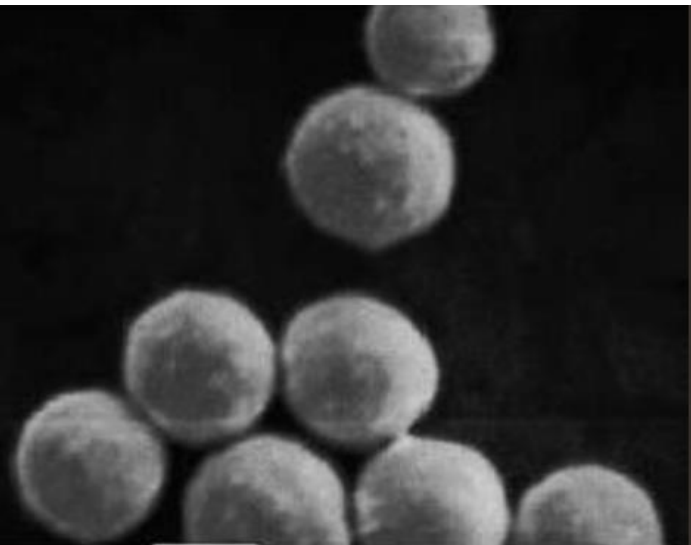
Técnica desenvolvida nos anos 80 do séc. XX

Objetivo: melhoramento de arroz (monocotiledónea), resistência a insectos, salinidade e seca

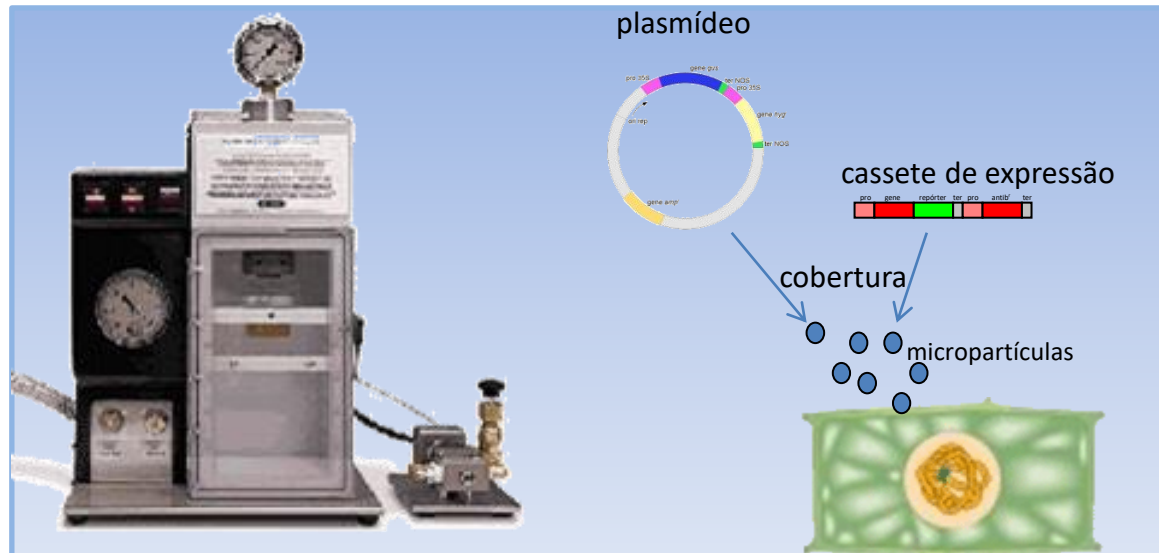
Inserção directa de DNA em células:

- cobertura de micropartículas (ouro, tungsténio) com DNA
- bombardeamento direccionado das células/tecido.

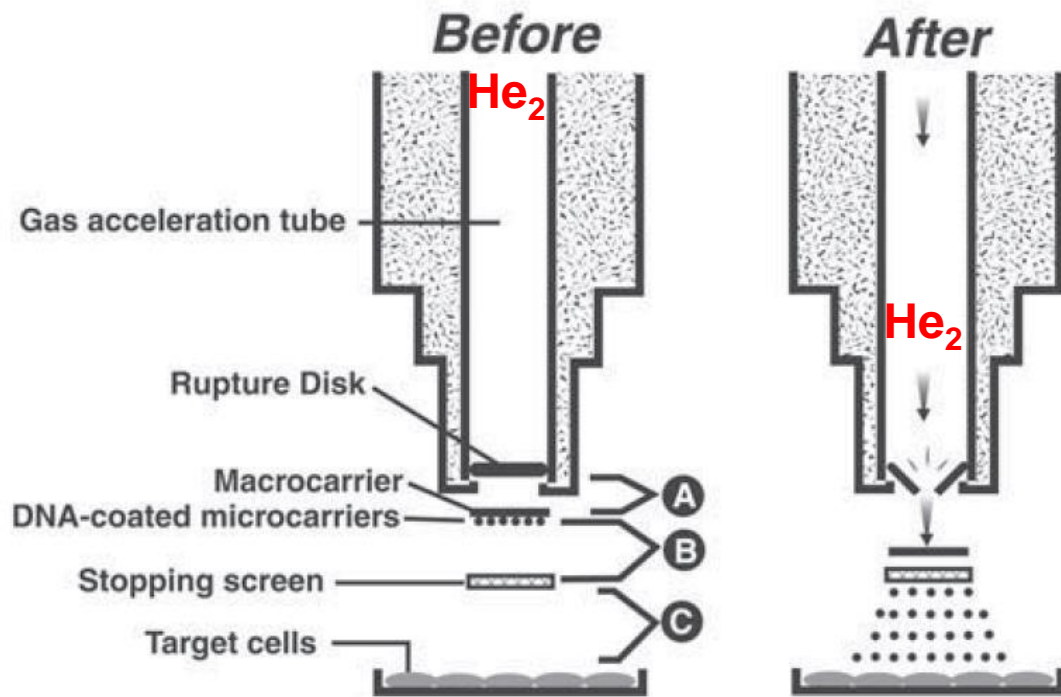
DNA: **vector de transformação** ou só **cassete de expressão** (ex^o promotor-GDI-GRep-ter)



Microscopic nucleic acid-coated gold particles.



PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System



Gás hélio pressurizado

Células/tecidos em vácuo

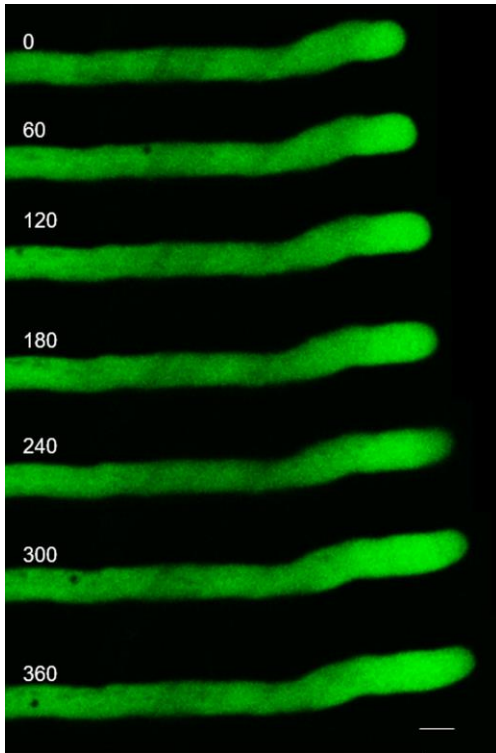
Partículas revestidas ao entrar e sair da célula deixam o DNA → ressuspensão no interior da célula (nucleoplasma, citosol...)

Integração ao acaso no gDNA

Expressão da PDI a partir de 1 dia após o bombardeamento.

Biolística – bombardeamento de grãos de pólen de *Nicotiana tabacum*

Germinação do pólen após a transformação e observação em microscopia de fluorescência/confocal

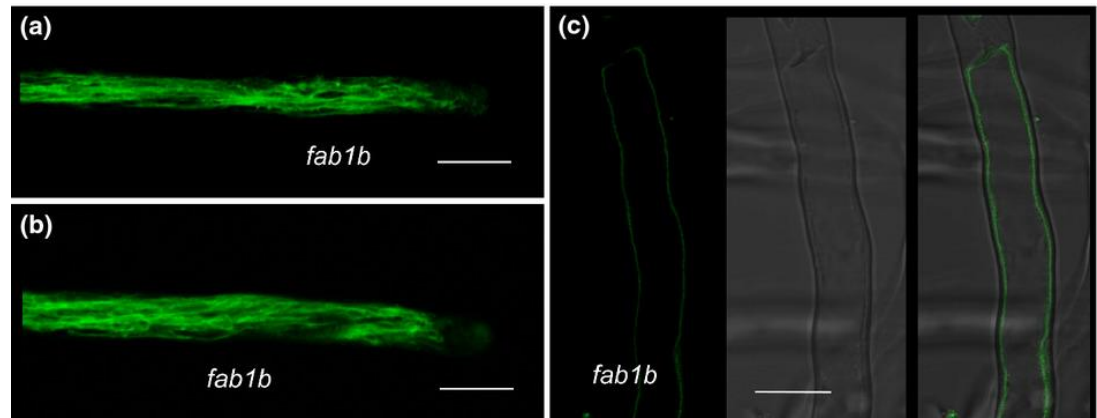


Revestimento das micropartículas com
pLAT52:DGK4:mGFP4

Localização: citosol.

Função: sinalização de eventos de secreção – crescimento do tubo polínico.

F. Vaz Dias, S. Serrazina, R. Malhó et al. 2019,
New Phytologist 222 (3)



Revestimento das micropartículas com **pLAT52:FAB1B:mGFP4**

Localização: endossoma perto do ápice; tonoplasto em zonas distais.

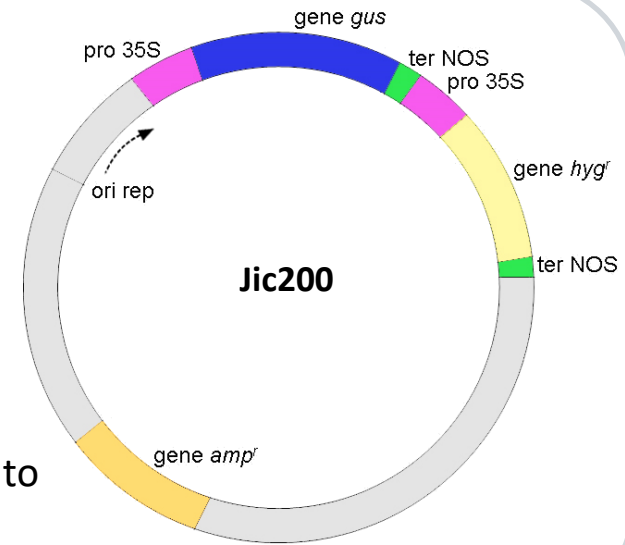
Função: reorganização membranar e endocitose – crescimento do tubo polínico.

S. Serrazina, F. Vaz Dias, R. Malhó 2014, New Phytologist 203 (3)

No vídeo: Demonstração da Biolística

- Apresentação do equipamento
- Revestimento das micropartículas com o plasmídeo Jic200
- Explantes de folha de *N. benthamiana* são sujeitos a bombardeamento

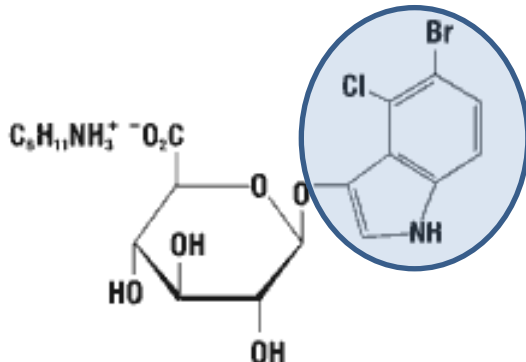
p35S:GUS



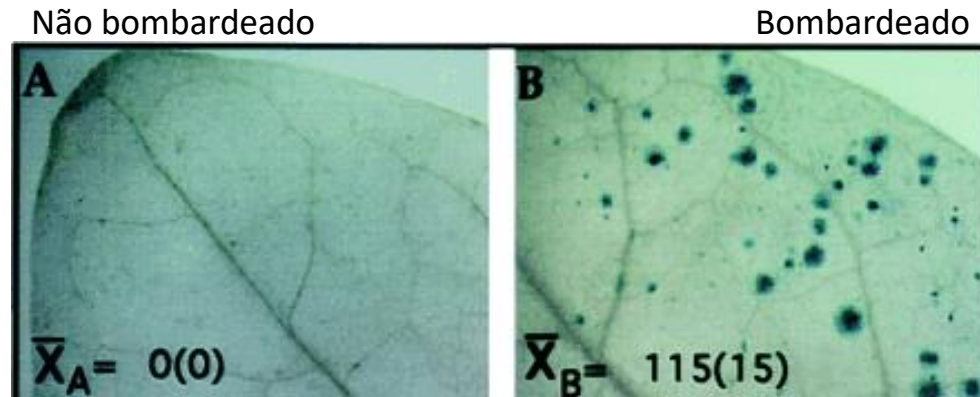
Observação após a transformação transiente:

Teste histoquímico → pontos de cor azul correspondentes a grupos de células com o produto de reação da **β-glucuronidase** no citoplasma → células com expressão da GUS

β-D-glucurónido + H₂O → Cl Br-indigo + ácido D-glucurónico (reação muito simplificada)



substrato X-gluc: tóxico, permite análise *in situ* mas não *in vivo*.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Ex^o: células neuronais de rato

Optimized heterologous transfection of viable adult organotypic brain slices using an enhanced gene gun

Jason Arsenault and John A O'Brien*

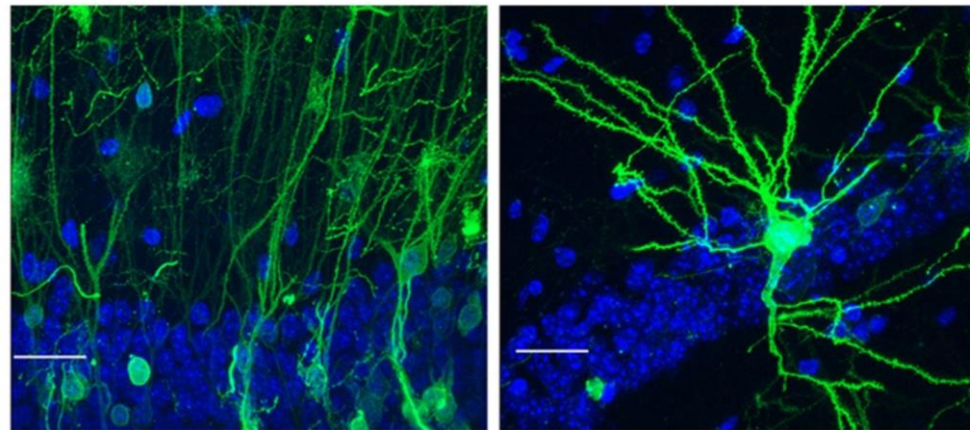
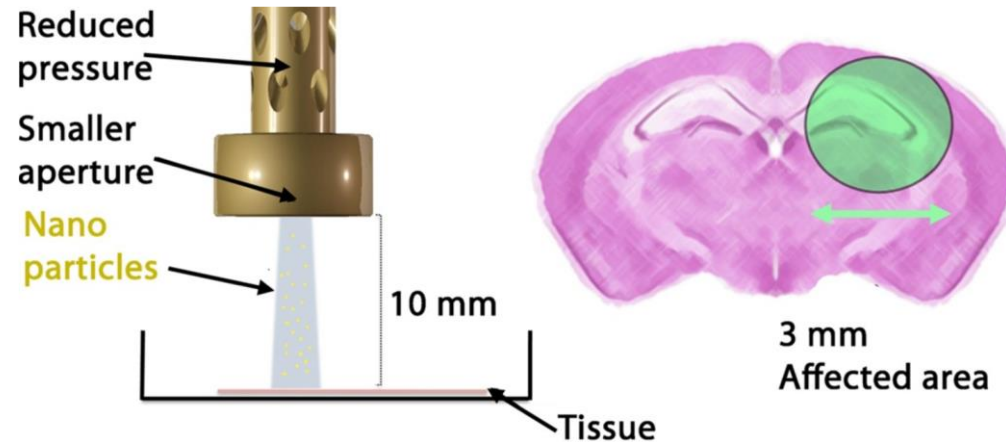
Abstract

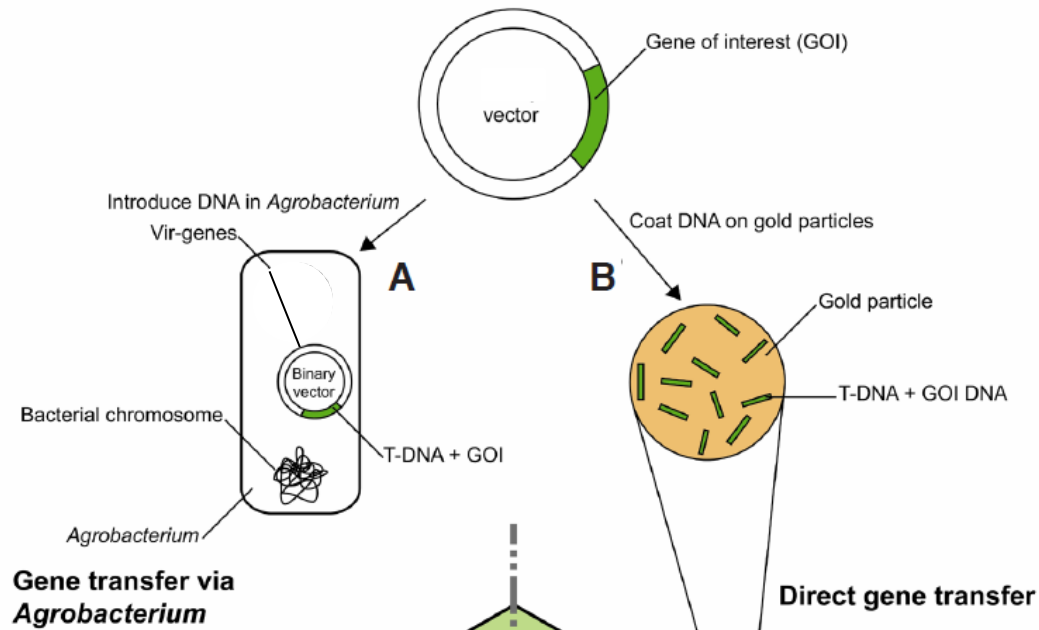
Background: Organotypic brain slices (OTBS) are an excellent experimental compromise between the facility of working with cell cultures and the biological relevance of using animal models where anatomical, morphological, and cellular function of specific brain regions can be maintained. The biological characteristics of OTBS can subsequently be examined under well-defined conditions. They do, however, have a number of limitations; most brain slices are derived from neonatal animals, as it is difficult to properly prepare and maintain adult OTBS. There are ample problems with tissue integrity as OTBS are delicate and frequently become damaged during the preparative stages. Notwithstanding these obstacles, the introduced exogenous proteins into both neuronal cells, and cells imbedded within tissues, have been consistently difficult to achieve.

Results: Following the *ex vivo* extraction of adult mouse brains, mounted inside a medium-agarose matrix, we have exploited a precise slicing procedure using a custom built vibroslicer. To transfect these slices we used an improved biolistic transfection method using a custom made low-pressure barrel and novel DNA-coated nanoparticles (40 nm), which are drastically smaller than traditional microparticles. These nanoparticles also minimize tissue damage as seen by a significant reduction in lactate dehydrogenase activity as well as propidium iodide (PI) and dUTP labelling compared to larger traditional gold particles used on these OTBS. Furthermore, following EYFP exogene delivery by gene gun, the 40 nm treated OTBS displayed a significantly larger number of viable NeuN and EYFP positive cells. These OTBS expressed the exogenous proteins for many weeks.

Conclusions: Our described methodology of producing OTBS, which results in better reproducibility with less tissue damage, permits the exploitation of mature fully formed adult brains for advanced neurobiological studies. The novel 40 nm particles are ideal for the viable biolistic transfection of OTBS by reducing tissue stress while maintaining long term exogene expression.

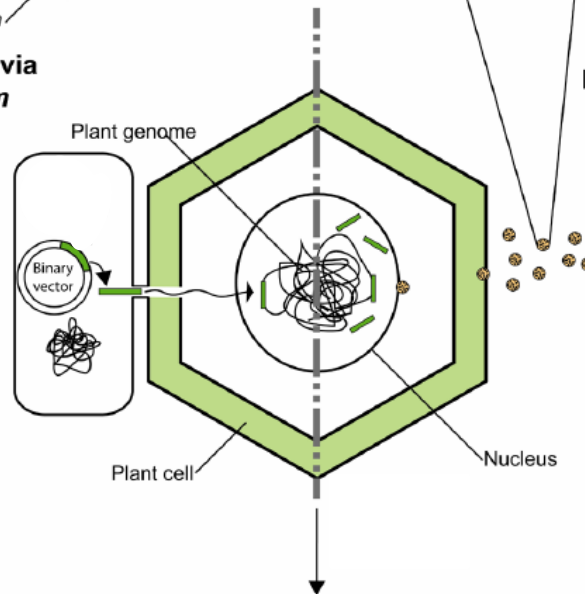
Keywords: Organotypic brain slices, Vibroslicer, Gene gun, Biolistic transfection, Nanoparticles, Tissue slicer





Gene transfer via *Agrobacterium*

Direct gene transfer



Expressão após transformação transiente
(microscopia confocal, mic. fluorescência, histoquímica...)

Biolística (demonstração em vídeo):

- Equipamento e amostra
- Preparação das partículas de Au
- Adição do plasmídeo Jic200 e revestimento
- Distribuição por carregadores (carriers)
- Preparação do bombardeamento e disparos

[Observação após teste histoquímico (GUS)]

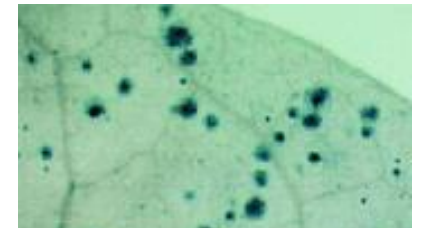
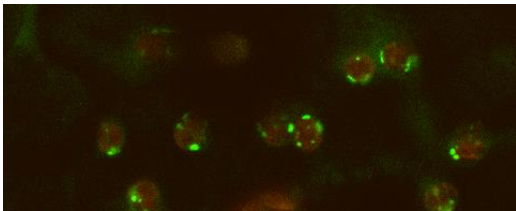
Agroinfiltração:

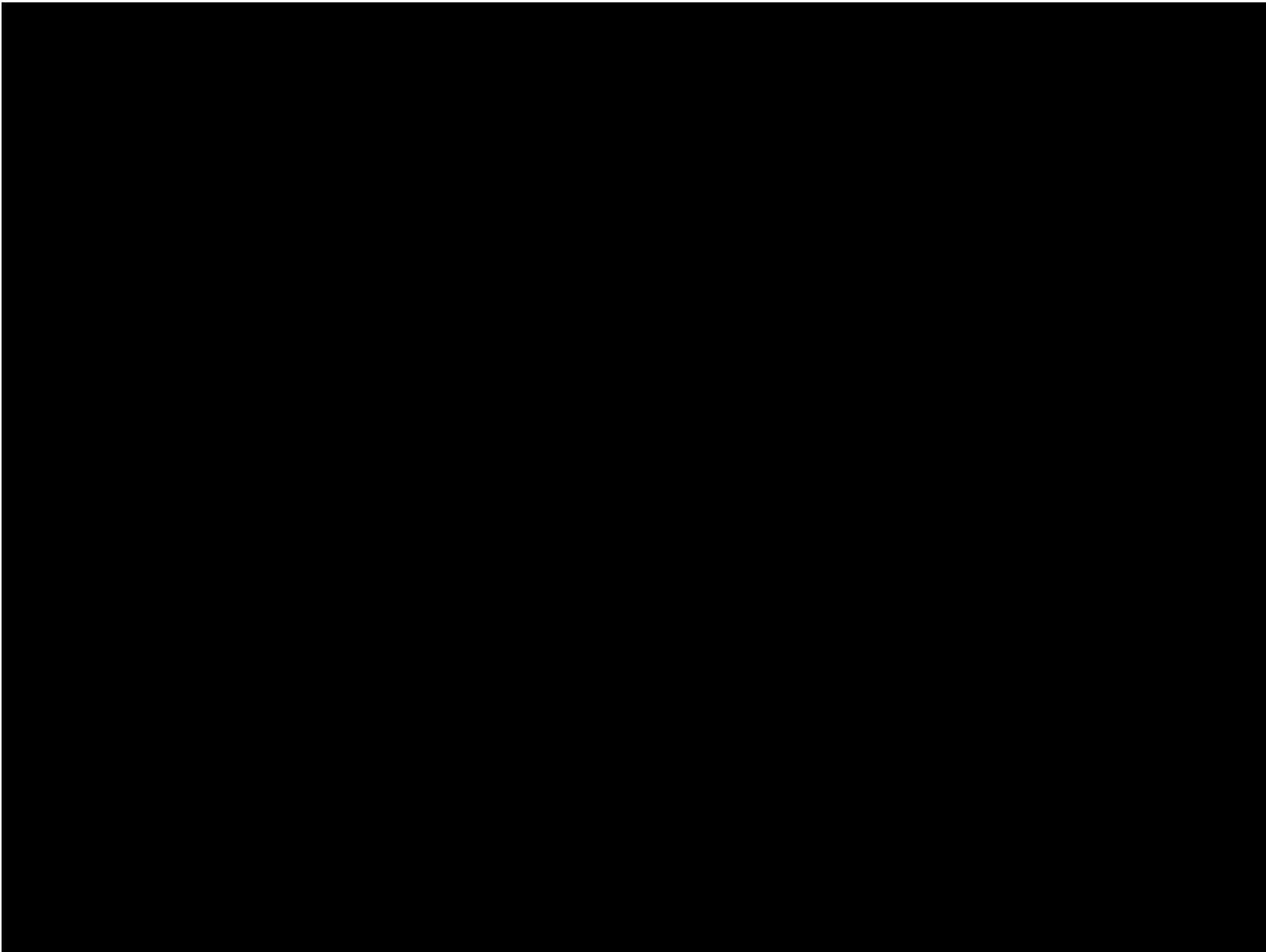
1º dia (ontem) - Crescimento do *Agrobacterium* em meio líq. com agentes de seleção.

2º dia (hoje!)

- Preparação da solução de infiltração
- Adição da solução de infiltração ao *Agrobacterium*
- Medição da densidade óptica (DO)
- Acerto da DO
- Infiltração das folhas

Observação da expressão da PDI em aula futura (CcAOS-GFP)





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

Protocolo de Agroinfiltração (simplificado)

1. Preparação da solução 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 de Agrobacterium 5-10 min a 4000 rpm.

Remover o sobrenadante invertendo cuidadosamente o tubo.

Adicionar 1 mL de meio de infiltração e ressuspender o pellet (agitar ou usar o 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).

Diluir a 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

$$\text{Abs}_i \times V_i = \text{Abs}_f \times V_f$$

$$(\text{Abs}_i \times 10) \times V_i = 0.1 \times 1000$$

Preparar a diluição usando os tubos de 2 mL.

3. Infiltração (LUVAS)

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 suspensão de infiltração.

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. Podem ser necessárias 1-4 infiltrações por folha.

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