

## **Unidade VII**

---

### *Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho*

Margarida Casal, Dorit Schuller e Célia Pais

<b>1. Fermentação à escala laboratorial</b>	<b>4</b>
<b>2. Identificação de organismos por métodos moleculares</b>	<b>7</b>
<b>3. Isolamento de DNA de leveduras</b>	<b>10</b>
<b>4. Preparação da reacção de PCR</b>	<b>12</b>
<b>5. Sequenciação automática</b>	<b>14</b>

A transformação do mosto em vinho é um processo microbiológico muito complexo, caracterizado pela predominância sequencial de diferentes espécies de leveduras, bactérias lácticas e fungos filamentosos. A qualidade e as características sensoriais do vinho estão intimamente associadas com a biodiversidade da flora de leveduras. As leveduras envolvidas na vinificação originam-se da microflora na superfície da uva e da flora secundária que coloniza as superfícies de equipamentos e utensílios aplicados no fabrico de vinhos. A flora indígena inclui espécies dos géneros *Kloeckera* /*Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* ou *Metschnikovia*, que se encontram em elevada concentração na superfície de uvas sãs ( $10^4$ - $10^6$  células/cm<sup>2</sup>), e são responsáveis pelo arranque da fermentação alcoólica. Comparativamente, a levedura fermentativa por excelência, *Saccharomyces cerevisiae*, encontra-se em concentração muito baixa no início da fermentação, mas devido à sua elevada tolerância ao etanol consegue rapidamente predominar após os primeiros dias do processo, sendo geralmente a única espécie de levedura encontrada no final da fermentação, como se verifica na figura 7.1.

A fermentação espontânea baseada unicamente na flora indígena pode produzir vinhos de qualidade excepcional, mas devido a variações na biodiversidade da microflora de um ano para outro, este processo torna-se por vezes pouco eficaz traduzindo-se na dificuldade de produzir em anos seguidos vinho com a mesma personalidade, e que reflecta as características desejadas. Por este motivo, a enologia moderna recorre ao uso de leveduras “starter” que são estirpes de *S. cerevisiae* seleccionadas de variadas regiões com tradição vitivinícola. Estas estirpes foram intensamente estudadas quanto às suas características fermentativas e são comercializadas na forma de leveduras secas activas (LSA). A estirpe inoculada predomina e reprime a flora indígena, permitindo um melhor controlo da microbiologia do processo, e consequentemente uma fermentação rápida e previsível, que se traduz na qualidade reprodutível do produto final, o vinho. Esta prática evita também paragens (“amuos”) da fermentação, que se verificam por vezes em fermentações espontâneas, por exemplo em consequência do uso excessivo de fungicidas durante a maturação das uvas.

No presente trabalho vai ser realizada uma fermentação espontânea em escala reduzida a partir do mosto de uvas. O desenrolar da fermentação será acompanhado ao longo do tempo pelo registo da diminuição do peso do mosto devido à libertação de CO<sub>2</sub>, que está associada à fermentação dos açúcares do sumo de uva. Na fase final da fermentação o mosto será inoculado em meios de cultura apropriados, permitindo o isolamento de colónias de leveduras. Após enriquecimento, e extracção do DNA de

alguns isolados, será realizada a sua caracterização recorrendo a uma técnica baseada na reacção em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR).

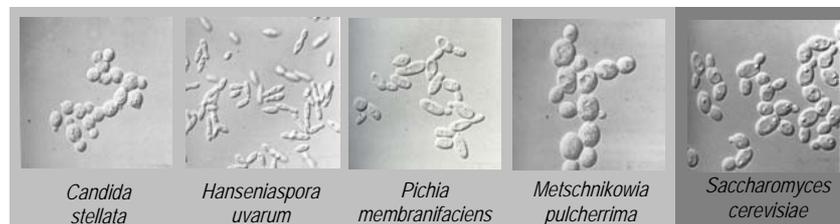
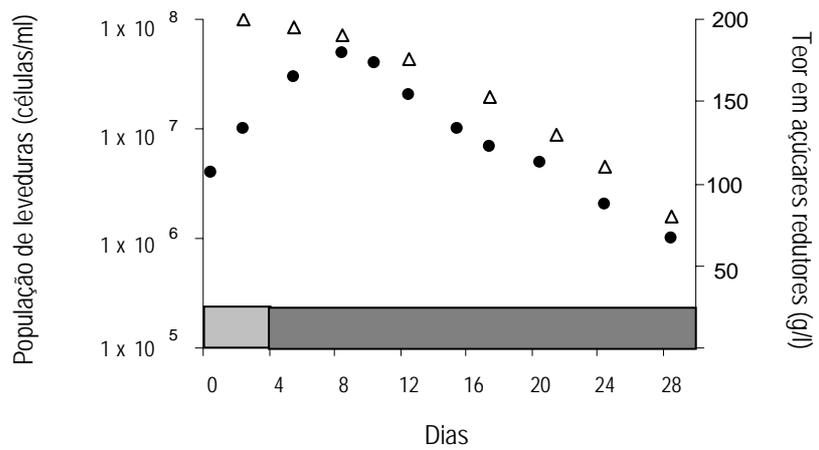


Figura 7.1 - Dinâmica populacional de leveduras e teor em açúcares redutores no mosto ao longo da fermentação.

## 1. Fermentação à escala laboratorial

---

Realizar os passos que se seguem.

1. Recolher uvas (ca. 2 kg) num saco de plástico previamente esterilizado e proceder ao seu esmagamento no laboratório. É importante que as uvas não tenham sofrido recentemente tratamentos químicos com fungicidas.



2. Verter o mosto num balão de *Erlenmeyer* (previamente pesado). Encher o balão completamente para evitar a oxidação do mosto.



3. Retirar uma alíquota de 10 ml de mosto e determinar o seu pH. Opcionalmente, realizar diluições decimais e plaquear 0,1 ml das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  em meio YEPD. Incubar 1-2 dias à temperatura ambiente e registar as observações.



4. Fechar o recipiente com uma rolha de plástico ou borracha. Introduzir uma agulha de seringa na parte lateral da rolha de modo que a ponta da agulha se encontre no interior do frasco. Deste modo é possível a libertação de CO<sub>2</sub> resultante da fermentação alcoólica. A seguir, selar a rolha com *parafilm*.



5. Realizar a fermentação numa estufa de temperatura controlada (20°C).



6. Monitorizar o progresso da fermentação por pesagens diárias. O arranque da fermentação pode ser muito variável e depende de numerosos factores como o estado sanitário das uvas ou o uso de fungicidas. Geralmente, após 3-7 dias verifica-se o início da fermentação, perceptível através do aparecimento de bolhas de CO<sub>2</sub>. Recolher uma amostra de mosto quando se verificar a diminuição do peso do mosto correspondente a 70 g/l (fase final da fermentação). Preparar diluições decimais e inocular 0,1 ml das diluições 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> em meio YEPD.

7. Após 2 dias de incubação, contar as unidades formadoras de colónias. A fim de obter maior biomassa, estender 8 colónias em diferentes secções de uma nova placa com meio YEPD e incubar novamente 1 a 2 dias.



### Interpretação dos resultados

Interpretar os resultados apresentados nas figuras 7.2 e 7.3.

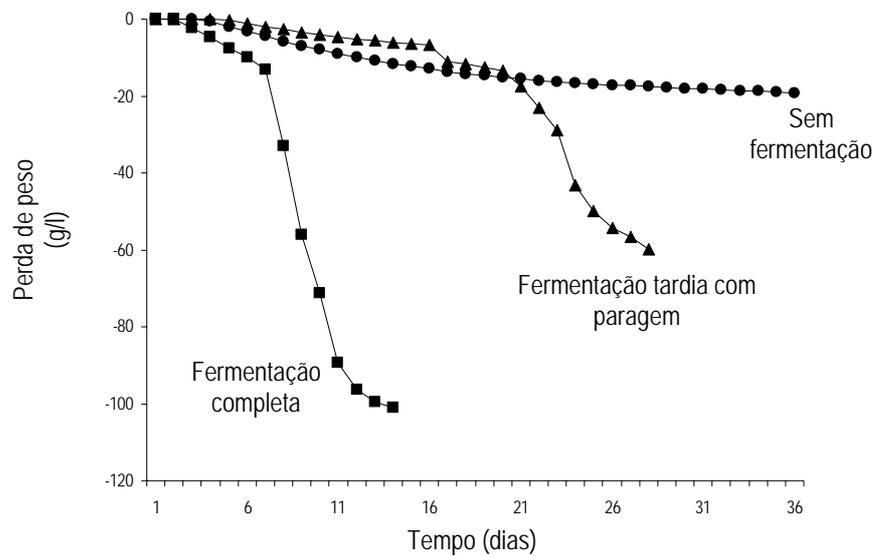


Figura 7.2 – Perfis de fermentação espontânea de mosto de uva.

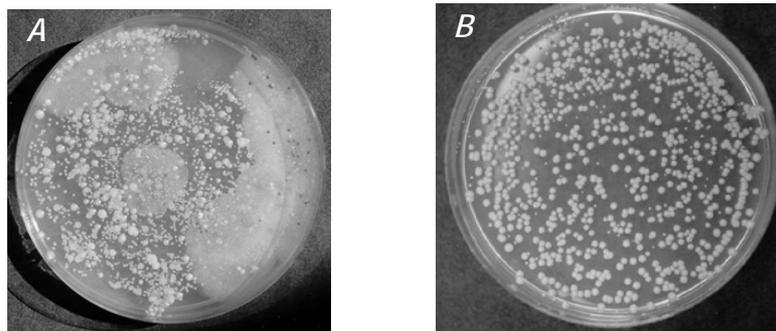


Figura 7.3. Isolamento de microrganismos do mosto em fermentação.

(A) Mosto na fase inicial da fermentação: verifica-se a presença de fungos filamentosos (manchas translúcidas), bactérias (colônias mais pequenas) e leveduras (colônias maiores).

(B) Na fase final da fermentação o mosto contém quase exclusivamente a levedura *S. cerevisiae*.

## 2. Identificação de organismos por métodos moleculares

---

### - Estudos de reassociação DNA-DNA

A comparação da totalidade do genoma de organismos diferentes, realizada por técnicas de reassociação DNA-DNA, tem permitido a determinação da homologia genética existente entre esses mesmos organismos. A utilização desta metodologia é um reafirmar ao nível molecular do princípio evolutivo da ascendência comum. Ou seja, se dois organismos estão relacionados, devem reter nos seus genomas sequências de bases que descendem de um ancestral comum e os organismos mais relacionados conservarão maior proporção dessas sequências de bases do que organismos com maior divergência. A grande confirmação da validade deste tipo de estudos, relativamente à delimitação de espécies, resultou do paralelismo encontrado entre esses resultados e os obtidos por estudos de interfertilidade entre estirpes, os quais se correlacionam com o conceito biológico de espécie. Assim, foram estabelecidas as seguintes correlações entre os resultados da complementaridade do DNA e as relações biológicas entre as estirpes: 1) estirpes conspecíficas, em geral apresentam valores de homologia de DNA superior a 70%; 2) relações varietais podem ser atribuídas a estirpes que apresentem valores entre 40 e 70% de complementaridade do DNA, a não ser que cruzamentos genéticos mostrem ausência de interfertilidade; 3) estirpes apresentando

menos de 40% de homologia de DNA, são quase sempre isoladas geneticamente, representando espécies independentes.

Quando sujeitos a um campo eléctrico, os cromossomas formam um perfil de bandas, considerado característico de cada espécie. No entanto, têm sido observadas bastantes variações de perfis intraspecíficos, devidas a polimorfismos associados ao tamanho dos cromossomas, a rearranjos dos cromossomas e a fenómenos de aneuploidia, o que dificulta a interpretação taxonómica de cariótipos. Para além disso, moléculas do mesmo tamanho podem migrar como dupletos, não havendo também relação linear estrita entre o tamanho molecular e a distância de migração, sobretudo para os cromossomas maiores.

#### **- *Análise de polimorfismos de restrição (RFLP)***

Uma outra técnica bastante empregue na análise do DNA e RNA, principalmente antes do desenvolvimento da técnica de PCR, foi o polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*).

A técnica compreende a quebra do DNA por enzimas de restrição em regiões com determinadas sequências de bases e a separação dos fragmentos resultantes por electroforese. Diferentes perfis de bandas, ou polimorfismos, podem ser observados directamente sob luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídio, ou indirectamente após transferência das bandas para membranas, sobre as quais se faz hibridação com sondas específicas de DNA ou RNA marcado. A detecção da hibridação poderá ser efectuada posteriormente por película de raios-X ou por quimioluminescência, consoante a marcação utilizada.

O facto do rDNA ocorrer em cópias múltiplas, reflectindo a necessidade de produção de quantidades elevadas pelas células destes genes, tem facilitado a sua análise por RFLP, tendo os polimorfismos obtidos permitido a diferenciação tanto de espécies, como de estirpes de leveduras. De referir que quase todos os sítios de restrição que permitiram a discriminação de estirpes individuais se encontravam localizados na região hipervariável dos espaçadores intergénicos. Este tipo de análise possibilitou também a elaboração de mapas de restrição e a estimativa das relações filogenéticas.

A análise de restrição do DNA mitocondrial tem tido uma grande aplicação no estudo de leveduras, dado por um lado originar um pequeno número de fragmentos (quando comparado com o DNA genómico) conduzindo a electroforegramas pouco

complexos, e por outro, devido ao elevado polimorfismo dos perfis obtidos. Este último aspecto tem-se revelado bastante útil na diferenciação de estirpes, nomeadamente enológicas.

#### **- Técnicas baseadas em PCR**

Pode afirmar-se que a técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR - *polimerase chain reaction*), constitui uma ferramenta básica para inúmeras metodologias de análise do DNA, consistindo fundamentalmente na amplificação de determinados segmentos de DNA. O processo é iniciado com a desnaturação da molécula de DNA de dupla hélice por aplicação de temperatura elevada. Após o abaixamento da temperatura, dois oligonucleótidos de cadeia simples, complementares às regiões flanqueadoras do segmento que se quer amplificar e que funcionam como iniciadores ou *primers*, ligam-se a essas regiões, dando-se início à síntese do DNA por acção de uma DNA polimerase termostável. Ciclos de desnaturação, de ligação dos *primers* e de extensão (elongamento) dos mesmos por acção da DNA polimerase, são repetidos várias vezes resultando na amplificação do segmento alvo.

A grande vantagem da utilização da técnica de PCR baseia-se na necessidade de uma pequena quantidade de DNA para efectuar a análise, o qual não necessita de estar muito purificado. A amplificação pode mesmo ser efectuada a partir de células lisadas sem posterior extracção ou purificação do DNA.

Uma das utilizações mais directas da PCR é a técnica de análise de polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD). O DNA é amplificado numa reacção de PCR, usando um só *primer* com uma sequência arbitrária. O *primer* hibrida aleatoriamente com sequências homólogas ao DNA em estudo, originando fragmentos amplificados. O produto é sujeito a electroforese e, após coloração com brometo de etídio, é visualizado sob luz ultravioleta. Perfis de bandas diferentes indicam sequências diferentes nas moléculas originais de DNA. Em diversos trabalhos de aplicação da técnica de RAPD em leveduras, foi obtida discriminação ao nível da espécie, mas pequenas diferenças nos perfis de diferentes estirpes da mesma espécie, indicam que é possível discriminar ao nível de subespécie. Um dos problemas da análise de RAPD é que os perfis obtidos, quer num mesmo laboratório, quer inter-laboratórios, nem sempre são reprodutíveis. A resolução do problema passa pelo uso de condições muito restritas dos perfis de temperatura usados.

Uma abordagem relacionada com a técnica de RAPD é a amplificação de fragmentos usando como *primers*, oligonucleótidos específicos para sequências de DNA repetitivas, ou *primers* microssatélite, a qual tem permitido a discriminação ao nível da espécie e subespécie. Este método é mais robusto do que o RAPD dado que a temperatura de emparelhamento das bases é superior.

Um alternativa que oferece maior segurança no caso da amplificação por PCR não ser suficientemente específica, é o chamado "nested PCR" (PCR encaixado). No "nested PCR" são usados um primeiro par de *primers* para amplificar um determinado fragmento do DNA original, seguindo-se nova reacção de PCR com um segundo par de *primers*, os quais são complementares a sequências existentes no primeiro produto amplificado. Caso este corresponda ao fragmento que se pretendia amplificar, esta estratégia funciona como um passo de confirmação.

No genoma de *S. cerevisiae* existem cerca de 150-300 sequências repetidas com tamanho de 300 pb, designadas por sequências  $\delta$ . Pela utilização de *primers* adequados é amplificado o DNA localizado nas regiões entre duas sequências  $\delta$  adjacentes. O resultado da reacção de PCR é uma mistura de fragmentos de tamanhos entre 200 a 2000 pb. Uma vez que o perfil de distribuição de sequências  $\delta$  é muito variável entre diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, este método de tipagem molecular tem sido utilizado para distinguir estirpes enológicas.

### 3. Isolamento de DNA de leveduras

---

Para a obtenção de resultados credíveis e reprodutíveis, certas regras devem ser respeitadas ao manusear o DNA:

- ✓ Verificar que todo o material que entra em contacto directo com o DNA genómico está estéril, para que não haja contaminações com DNases ou por outros ácidos nucleicos.
- ✓ Usar luvas durante as manipulações do DNA, para evitar que as DNases presentes nas mãos contaminem as amostras de DNA.
- ✓ Verificar a perigosidade dos produtos químicos que se usam.

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

1. Inocular uma colónia de *S. cerevisiae* num tubo *Eppendorf* contendo 1 ml de YPD.
2. Agitar o tubo fortemente num vortex até que as células dispersem completamente. Furar a tampa com a agulha de uma seringa.
3. Crescer durante a noite a 28-30°C, numa incubadora com agitação (200 rpm).
4. Centrifugar as células brevemente (30 s, 13000 rpm) numa centrífuga de bancada. Desprezar o sobrenadante.
5. Lavar o sedimento com água: ressuspender as células em 100 µl de água esterilizada, centrifugar as células brevemente (30 seg., 13000 rpm) numa centrífuga de bancada e desprezar o sobrenadante.
6. Ressuspender o sedimento em 100 µl de uma solução contendo sorbitol (1M) e EDTA (100mM), pH 7,5.
7. Adicionar 5 µl da enzima lítase (5 U/µl) que provoca a degradação da parede celular.
8. Proceder a uma incubação de 20 minutos a 37°C.
9. Adicionar 100 µl do tampão Tris HCl (50mM) EDTA (20 mM), pH 7.5.
10. Adicionar 5,0 µl de SDS 10 % (p/v).
11. Incubar 5 minutos a 65°C. A adição do detergente SDS em combinação com a temperatura elevada provoca a lise das células e a libertação dos compostos celulares.
12. Adicionar 80 µl de acetato de potássio (5M).
13. Colocar imediatamente no gelo e incubar durante 5 minutos. O acetato de potássio e a temperatura baixa provocam a desnaturação e precipitação da proteína celular.
14. Centrifugar durante 15 minutos, a uma velocidade de 13 000 rpm, numa microcentrífuga refrigerada (4°C). No sedimento no fundo do tubo *Eppendorf* encontram-se agora os restos celulares bem como a proteína precipitada, enquanto o DNA permanece no sobrenadante
15. Transferir o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf*.
16. Adicionar volume igual de isopropanol e agitar ligeiramente (inverter o tubo 2-3 vezes). Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Verificar a formação de "nuvens" do DNA precipitado pelo isopropanol.

17. Centrifugar 45 segundos a 13 000 rpm numa microcentrifuga para sedimentar o DNA precipitado.
18. Rejeitar o sobrenadante.
19. Lavar o sedimento com 1 ml de etanol 70%, (v/v). A lavagem consiste na adição de etanol, breve agitação, centrifugação e remoção do etanol.
20. Deixar o DNA secar no tubo de Eppendorf com a tampa aberta à temperatura ambiente. Ressuspende o sedimento em 0,1 ml de tampão TE. Guardar a -20°C.

#### 4. Preparação da reacção de PCR

	<i>Procedimento</i>
--	---------------------

1. Num suporte adequado, colocado sobre gelo, dispor um tubo de PCR (0,2 ml) para cada isolado a testar. Os tubos devem estar devidamente identificados.
2. Num tubo de *Eppendorf* preparar a mistura de reacção de acordo com o número de reacções a realizar (os valores estão calculados para uma reacção). Manter a mistura no gelo.

	<i>Volume (μl)</i>	<i>Concentração final para um volume de 25 μl</i>
H <sub>2</sub> O	15,7	--
Tampão 10x	2,5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	3 mM
Mistura de dNTPs (10 mM cada)	1	0,4 mM
Primer δ <sub>F</sub> (50 pmol/μl)	0,8	40 pmol
Primer δ <sub>R</sub> (50 pmol/μl)	0,8	40 pmol
Taq DNA polimerase (5U/μl)	0,2	1U

#### *Sequência dos primers:*

δ<sub>F</sub> : 5'-CAA AATTCACCTATATCT-3'

δ<sub>R</sub> : 5'-GTGGATTTTATTCCAAC-3'

3. Distribuir 50 ng de DNA genómico (1  $\mu$ l) de cada isolado a identificar nos respectivos tubos de PCR.
4. Distribuir 24  $\mu$ l da mistura para cada tubo de PCR já com o DNA. Manter os tubos no gelo.
5. Programar o aparelho de PCR:

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2'	} 35
Desnaturação	95°C	30"	
Emparelhamento	43,2°C	60"	
Extensão	72°C	60"	
Extensão Final	72°C	10'	

6. Colocar os tubos no aparelho de PCR e iniciar o programa.
  7. Preparar o gel de agarose 1,5 % (p/v) em tampão TAE 1x e acrescentar 5  $\mu$ l de uma solução de brometo de etídeo (10 mg/ml).
- Nota importante:** O brometo de etídeo é um agente mutagénico poderoso. Pode ser prejudicial por inalação, ingestão e absorção através da pele. Desta forma, deve ser manipulado com luvas apropriadas e o trabalho realizado na hotte. O brometo de etídeo é também irritante para as mucosas e para o tracto respiratório. Dado o seu carácter mutagénico está classificado como uma substância perigosa, pelo que os seus resíduos devem ser incluídos na linha de tratamento de resíduos perigosos.
8. Quando a reacção de PCR terminar, retirar as amostras do aparelho e juntar 2  $\mu$ l tampão de aplicação.
  9. Aplicar no primeiro poço do gel um marcador de DNA com fragmentos de peso molecular conhecidos.
  10. Colocar 10  $\mu$ l de cada reacção de PCR (já com o tampão de aplicação) em cada poço do gel e iniciar a electroforese a 3 V/cm. Utilizar tampão de electroforese TAE 1x.
  11. Desligar a fonte de energia após a electroforese, visualizar o gel num transiluminador de UV e fotografar.
  12. Analisar e comparar os padrões obtidos para cada isolado.

### Interpretação dos resultados

Comparar os perfis obtidos e concluir sobre a identidade das estirpes analisadas.

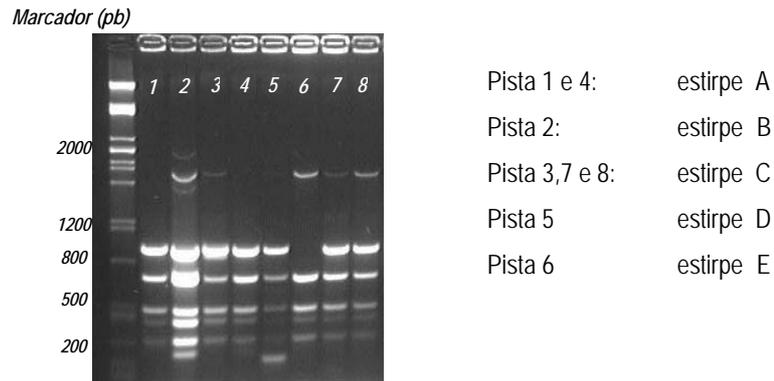


Figura 7.4. Análise do perfil de amplificação de sequências inter- $\delta$  em estirpes de *S. cerevisiae* distintas isoladas do mosto de uva em fermentação, através de uma electroforese em gel de agarose.

## 5. Sequenciação automática

Muita informação sobre a estrutura e expressão génica pode ser obtida pela determinação directa da sequência de bases numa molécula de DNA. A utilização de sequenciadores automáticos (Figura 7.5) é essencial quando se deseja realizar sequenciação em larga escala, como por exemplo em projectos genoma. O desenvolvimento e utilização de sequenciadores automáticos torna mais eficiente e rápida a sequenciação de DNA na medida em que as etapas de leitura do gel e o processamento de sequências são realizadas através de computadores. Alguns sequenciadores conseguem ler cerca de 1000 bases numa separação. A reacção de sequenciação é baseada no método de Sanger, do mesmo modo que a manual que utiliza ddNTPs (di-desoxinucleotídeo-tri-fosfatos) que impedem a síntese nos respectivos nucleotídeos (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Assim, por exemplo, as reacções com ddGTP terão fragmentos de diferentes tamanhos todos eles com o ddG no final, correspondendo a regiões onde existam Cs no DNA. A análise dos fragmentos em

eletroforese permite a identificação das posições dos Cs. Do mesmo modo é executado o processo para os demais nucleótidos.

O método original utiliza marcação radioactiva enquanto que novos métodos utilizam marcação fluorescente. O sequenciador a laser permite que todas as reacções (A, C, G, T) sejam corridas juntas pois utiliza-se uma cor fluorescente diferente para cada base.

São utilizados quatro fluorocromos diferentes e uma vez excitados por um feixe de laser emitem luz em comprimentos de onda distintos. É possível marcar com estes fluorocromos o *primer* universal M13 ou então cada um dos nucleotídeos (terminadores). Assim, uma vez que em cada uma das reacções (A, T, C, G) é empregue um fluorocromo diferente é possível juntar estes produtos e realizar uma corrida num único gel. Os produtos da reacção de sequenciação, marcados com os fluorocromos, ao serem submetidos a eletroforese passam pelo feixe de laser, que promove a excitação dos fluorocromos. A luz emitida pelos fluorocromos é detectada por um fotomultiplicador e a informação é processada através de um computador (Figura 7.6).



Figura 7.5 – Aparelho de sequenciação automática (ABI Prism 310).

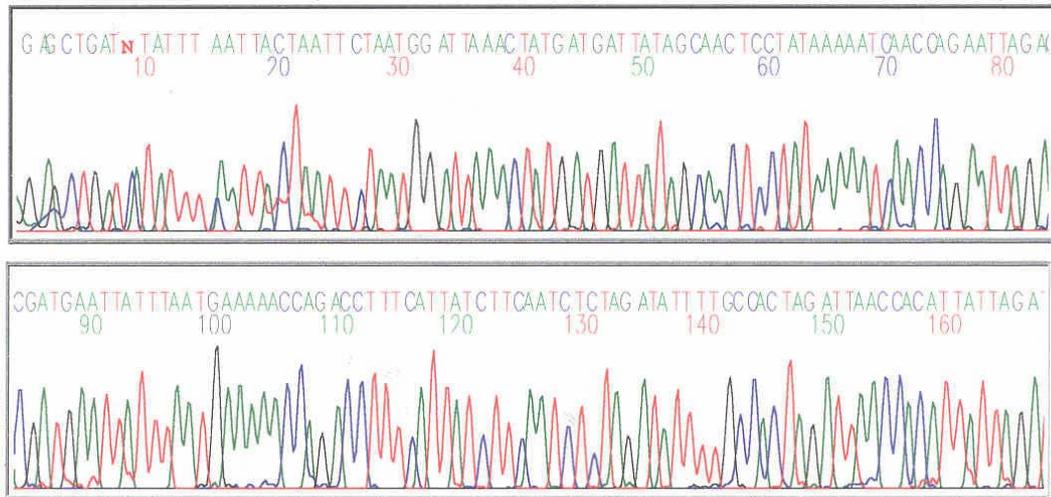


Figura 7.6 - Electroferograma obtido num sequenciador automático recorrendo ao uso de nucleótidos marcados com fluorescência (N representa uma base que não foi identificada nesta reacção).

### ***Purificação do produto de PCR***

Para purificar os ácidos nucleicos devem usar-se colunas com resinas apropriadas (Amersham Bioscience – MicroSpin columns) e seguir as instruções do fabricante.

### ***Preparação das amostras para o sequenciador***

	<i>Reacção de sequenciação</i>
--	--------------------------------

A reacção de sequenciação é realizada com base no protocolo do Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready reaction Kit da Applied Biosystems.

1. Colocar 2,5 µl de amostra de DNA purificada num tubo de PCR.
2. Adicionar 2 µl de "Terminator ready reactions MIX".

“Terminator ready reactions MIX” é uma solução constituída por: Terminadores marcados (A-[RGG]; C-[ROX]; G-[R110] e T-[TAMRA]), dATP, dCTP, dITP, dUTP, AmpliTaq DNA Polimerase FS, MgCl<sub>2</sub> e tampão Tris-HCl (pH 9,0). Esta solução vem completamente preparada no Kit de sequenciação utilizado.

3. Terminar a mistura com a adição de 0,5 µl de uma solução contendo os respectivos *primers* na concentração de 2,5 µM.
4. Misturar bem e colocar no termociclador previamente programado com o seguinte programa:

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	4'	} 35
Desnaturação	96°C	10"	
Emparelhamento	58°C	5"	
Extensão	60°C	4"	
Extensão Final	60°C	10'	

#### Purificação dos produtos de extensão após reacção de sequenciação

Após a reacção de sequenciação as amostras são purificadas em colunas de purificação AutoSeq 50 da Amersham Biosciences. O objectivo desta purificação é essencialmente a remoção de terminadores não incorporados que poderão interferir na obtenção de um bom perfil de nucleótidos. As amostras quando não são purificadas imediatamente após a reacção de sequenciação, devem ser conservadas a 4°C.

1. Agitar as colunas no vortex de modo a ressuspender a resina. Cortar a ponta e inserir em tubos de *Eppendorf*.
2. Abrir ligeiramente as tampas e centrifugar a 2000 *g* durante 1 minuto.
3. Remover o excedente dos tubos, limpar a parte inferior de cada coluna, colocar as colunas em tubos novos e retirar as tampas.
4. Aplicar a amostra (produtos da extensão) no centro da coluna e centrifugar a 2000 *g* durante 1 minuto.
5. Descartar as colunas. Os produtos purificados ficam no fundo do tubo.

	<i>Sequenciação</i>
--	---------------------

A 5 µl de produto extenso purificado, adicionar 15 µl de formamida, transferir para um tubo de sequenciação e desnaturar a 95°C durante 2 minutos. Após a desnaturação, colocar em gelo pelo menos 5 minutos. Proceder à sequenciação no Genetic Analyzer 310 ABI PRISM (Figura 7.6).

	<i>Soluções</i>
--	-----------------

**Tampão TAE 50 x (solução Stock)**

Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA Na <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	37,2 g

Dissolver o Tris em 800 ml de água desionizada, e juntar a seguir o EDTA e o ácido acético glacial. Perfazer o volume a 1000 ml. Verificar o pH da solução que deve estar a 8,5.

Para preparar 1 l de tampão TAE, adicionar 20 ml de TAE 50x a 980 ml de água desionizada.

**Tampão TE**

Tris HCl	10mM
EDTA	1 mM

Ajustar o pH a 8,0.

**Tampão de aplicação de amostras em geles de agarose 10 x**

Ficoll	20 g
Azul de bromofenol	0,05 g
TAE 10 X	2 ml
EDTA	0,4 g

Dissolver os compostos em 100 ml de água desionizada.

**Meio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar)**

Extracto de levedura	10 g/l
Peptona	20 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	20 g/l

	<i>Bibliografia</i>
--	---------------------

- Ciani, M. Biodiversity and biotechnology of wine yeast. 2002. Research Signpost.
- Griffin, H V e Griffin, A M. 1994. *PCR technology: current innovations*. CRC Press, Inc.
- Fleet, G.H. Wine: Microbiology and biotechnology. 1994. Harword Academic
- Fugelsang, K.C. Wine microbiology. 1997. Chapman and Hall. New York
- Pascal Ribéreau-Gayon T, P. Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 1999. The Handbook of Enology: Microbiology of Wine, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley and Sons.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. e Casal, M. (2003) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Letters, 11366: 1-8.

	<i>WWW</i>
--	------------

[http://www.genome.ou.edu/protocol\\_book/protocol\\_index.html](http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_index.html)

[http://www.lallemandwine.com/products/yeast\\_strains.php#BDX](http://www.lallemandwine.com/products/yeast_strains.php#BDX)

<http://www.vinhoverde.pt/>

<http://www.sigmo.fr/idntificationgenetique.htm>