CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PORÇÃO ENZIMÁTICA DA QUITINA SINTASE DE *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA A PARTIR DE CÉLULAS DE *Escherichia coli*

Edjane Ferreira¹; Raquel Benevides²; Catiane Souza³

1. Bolsista do (PROBIC/UEFS), Graduanda em Ciências Biológicas, Bacharelado, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edjaniny@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas (DCBio), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: raquelgb@gmail.com
3. Doutora, Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas (DCBio), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: casouza2010@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Clonagem, quitina sintase, *Moniliophthora perniciosa*

INTRODUÇÃO

A quitina é um biopolímero de grande importância para a sobrevivência do fungo, é a principal estrutura da parede celular. Dentre os fungos que possui a quitina em sua composição está o *Moniliophthora perniciosa*. Esse fungo, responsável por causar a vassoura de bruxa é um fitopatógeno da cultura do cacau (*Theobroma cacao*), do qual é responsável por gerar grandes prejuízos na Bahia e aos produtores rurais (Brasil, 2013). Com o conhecimento gerado a partir do sequenciamento do genoma desse fungo por Souza (2012), uma alternativa para controle do fitopatógeno é o desenvolvimento de inibidores das enzimas da rota de síntese da quitina nesse organismo, como a quitina sintase. O estudo *in silico* dessa enzima permitiu a seleção de alguns candidatos a inibidores, que devem ser testados *in vitro* para terem sua ação validada focos. Souza *et al.* (2012). Neste trabalho propomos realizar a clonagem da sequência codificante do gene da quitina sintase de *M. perniciosa* em vetor de expressão, que viabilizará sua produção para os testes *in vitro* de inibidores para o controle da vassoura de bruxa.

MATERIAIS E MÉTODOS

O gene sintético da quitina sintase estava disponível no laboratório. Os *primers* foram selecionados com base na sequência de nucleotídeos disponibilizado no GenBank referente a quitina sintase de *M. Perniciosa*, da qual foi analisada pela ferramenta *online* (NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics –UCLA).

A partir da sequência, foram definidos os sítios de restrição referente ao vetor selecionado (pET-28a, Novagen®) e logo em seguida as sequências foram avaliadas pela ferramenta *online* OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®) e verificadas as temperaturas de anelamento e formação de estruturas secundárias.

Para preparação das células eletrocompetentes, a reativação das cepas foi feita em 5 mL de Meio (L.B) Luria-Bertani (Tryptona a 1%; Extrato de levedura a 0,5 %; NaCl a 1%), por 16 horas a 37°C. Logo após foram inoculadas em 100 mL de L.B. em erlenmeyer e incubadas a 37° C até atingir a densidade ótima de 0,6 medida no espectrofotômetro. Em seguida, as células foram centrifugadas em tubos Falcon de 50 mL a 5000 rpm, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas e centrifugadas em 40 mL de glicerol gelado a 10% a 5000 rpm, a 4 °C por 15 minutos. Essa última etapa foi feita por mais uma vez nas mesmas condições. Por fim o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 160 µl de glicerol a 10%. As células competentes foram estocadas a -80 °C.

Para estocagem do gene sintético, o mesmo foi transformado em células competentes. Para a reação foram utilizados 40 µl da cepa eletrocompetente *E.coli* Top 10 obtida conforme descrito anteriormente e 1 µl (240 ng) do gene sintético da quitina

sintase em um microtubo de 0,2 mL. Após a homogeneização a cultura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 1 mm do eletroporador *Multiporator* (Eppendorf®), onde foi mantida no gelo durante o processo. Em seguida a eletroporação foi realizada com pulso de 1700 mV para procarioto. Imediatamente após o choque foi adicionado 959 µl de L.B a cultura, e transferida para um microtubo de 1,5 mL e incubada a 37°C por 40 minutos sobre agitação. Em seguida a cultura foi centrifugada e 900 µl do sobrenadante foram retirados, o pellet formado foi ressuspensionado com o sobrenadante restante e usados para inoculação em placas contendo (L.B. A) Luria-Bertani-Agar (Tryptona à 1%; Extrato de levedura à 0,5 %; NaCl à 1%; Agar à 12%) e Ampicilina a 100 µg/mL para seleção das colônias transformadas. Após 24 horas a 37°C incubadas as colônias crescidas foram re-inoculadas em 5 mL de L.B com Ampicilina a 100 µg/mL por mais 24 horas a 37°C sobre agitação. Em seguida foram retiradas alíquotas de 750 µl e adicionadas 250 µl de glicerol a 100% e armazenadas a -20 °C e -80 °C o restante foi utilizado para a extração do plasmídeo.

Para a extração do plasmídeo as colônias transformadas foram centrifugadas a 13.000 g por 2 minutos para a precipitação celular. Logo após o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi utilizado segundo protocolo dos kits de extração E.Z.N.A.® *Plasmid Mini Kit II* (Omega Bio-tek®) ou *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* (ThermoFisher Scientific®) conforme recomendações do fabricante. Após a extração foi confirmado a presença dos ácidos nucleicos em eletroforese em gel agarose a 0,8% e a concentração utilizando-se o Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific®). A validação da extração plasmidial foi feita por PCR.

Para a reação de amplificação foi utilizado a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o Kit Toptaq® Master Mix,(Quiagen®), conforme recomendações do fabricante. Para a reação foi utilizado o termociclador *Mastercycler* 5333 (Eppendorf®). Após a amplificação a amostra foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Após a confirmação da amplificação pelo gel a amostra foi purificada usando o Kit *PureLink® PCR Purification Kit* da Invitrogen conforme recomendações do fabricante. Logo em seguida a amostra foi purificada.

O vetor pET28a assim como os insertos amplificados foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição conforme recomendações do fabricante. A reação foi incubada por 3 horas a 37°C, em seguida a reação foi colocada a 80 °C por 20 minutos para desativação das enzimas. Após digeridas as amostras foram purificadas usando o Kit *PureLink® PCR Purification Kit* da Invitrogen®, seguindo a recomendação do fabricante, a eluição das amostras foi feita com água *Nuclease-free* em pH 8,0 (Promega®). Após a purificação foi feita a eletroforese em gel de agarose a 0,8% e as amostras foram analisadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific®).

Para a reação de ligação foram utilizadas a proporção 3:1 (inserto:vetor), conforme a fórmula: $(\text{Massa do Vetor}/\text{Tamanho do Vetor}) / (\text{Massa do Inserto}/\text{Tamanho do Inserto}) = 1$. A reação foi preparada conforme recomendação do fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®). As amostras foram incubadas por 17 horas a 16°C no termociclador *Mastercycler* 5333 (Eppendorf®). Após a incubação, as reações foram visualizadas em gel de agarose a 0,8%. Essas amostras foram submetidas a transformação. Após a reação de ligação foi realizada uma transformação, utilizou-se 40µl das células Top 10 (Thermo Fisher Scientific®) e 1µl da reação de ligação. Após a homogeneização a cultura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 1 mm do eletroporador *Multiporator* (Eppendorf®), onde foi mantida no gelo durante o processo. Em seguida a eletroporação foi realizada com pulso de 1700 mV.

Imediatamente após a transformação foi adicionado 959 µl de L.B a cultura, e transferida para um microtubo de 1,5 mL e incubada a 37°C por 40 minutos sobre agitação. Logo após as culturas foram inoculadas em placas de petri com meio L.B.A. e para seleção das colônias transformadas foram utilizados Kanamicina a 30µg/mL para as colônias com pET28a.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados os *primers* após análise da sequência disponível no banco de dados, e os sítios de restrição foram escolhidos *Bam*HI (GGATCC) mais STOP e *Nde*I (CATATG), pois não encontrou restrição na sequência. A tabela 3 apresenta as sequências nucleotídicas sintetizadas pela invitrogen.

Tabela 3: Sequências iniciadoras nucleotídicas para amplificação do gene sintético.

Enzima de restrição	Sequência	Direção	T.A*
<i>Nde</i> I	GGAATC <u>GCT AGC</u> ATG GCG AAT CGC CCG CC	Direto	69.4°C
<i>Bam</i> HI	GGA <u>GGA TCC</u> TTA ATC ACC GGG CAG GTT GGG AAG	Reverso	66 °C

*Temperatura de Anelamento

Após a confirmação da transformação na cepa de clonagem Top10 com o gene sintético, foi feita a extração plasmidial conforme figura 1, onde apresentou boa concentração confirmada no NanoDrop que foi de 135 ng. O melhor resultado da extração plasmidial foi usando o Kit E.Z.N.A.® *Plasmid Mini Kit II* (Omega Bio-tek®), onde apresentou melhor concentração e integridade da amostra comparado com o kit de extração *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific®).

Esse processo de transformação em cepas de clonagem do gene sintético permite o armazenamento a longo prazo e aumento do numero de copias preservados. Em seguida à extração plasmidial, o gene sintético foi amplificado (figura 2) com os sítios de restrição desejado, confirmado a amplificação da região de interesse.

A digestão apresentou boa eficiência, comprovada na eletroforese em gel como se apresenta na figura 2 amostras da purificação do inserto e do vetor.

Figura 1: - Eletroforese em gel de agarose 0,8% como resultado da PCR. Da direita para esquerda. 1: amostra da PCR e M: Marcador de massa molecular de 100pb *DNA Ladder*, Invitrogen.

Figura 2: - Eletroforese em gel de agarose 0,8% como resultado da purificação da digestão. Da direita para esquerda. A: Fragmentos do inserto, B: Fragmentos do vetor pET28a. M: marcador molecular 1000 pb, *PCR Marker*, Promega.

A ligação foi confirmada com eletroforese em gel (figura 3) apresentado 3 bandas, sendo uma o inserto não ligado, a segunda o vetor não ligado e a última e mais alta o vetor ligado ao inserto, apresentando produto de ligação que permite o processo de transformação.

Após o processo de transformação, as colônias não apresentaram crescimento esperado; segundo Oliveira, entre 8 e 14 horas após a transformação as colônias já se apresentam crescidas, o que não foi visualizado após a tentativa de transformação.

No processo de eletroporação, a célula pode ter sofrido dano ou morte, pela formação de grandes poros, o que pode ter causado perda de compostos celulares e comprometido sua viabilidade final (NELSON & COX, 2014). Outro fator que pode ter levado à ineficiência na transformação pode ter sido a baixa ligação na proporção inserto : vetor (3:1) utilizada.

Nesse momento, novos ensaios de transformação estão sendo realizados testando-se diferentes proporções inserto : vetor (5:1; 8:1) para viabilizar a etapa final de expressão recombinante do inserto referente à quitina sintase.

Figura 3: - Eletroforese em gel de agarose 0,8% como resultado da ligação. Da direita para esquerda. A: Amostra da ligação B: Amostra da ligação. M: marcador molecular 1 kb, *plus DNA Ladder*, invitrogen.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados, foi possível amplificar a região de interesse e otimizar o uso de kits de extração de plasmídeo com melhor concentração, além de conseguir ligá-la em uma pequena proporção ao vetor de expressão pET-28a. Nas condições testadas, não se obteve êxito para transformar células com o produto de ligação inserto-vetor.

Novas alternativas e experimentos tem sido testados para fazer viabilizar a expressão da região de interesse, como montar a ligação inserto:vetor em maiores proporções, como 5:1, a qual possibilita uma maior probabilidade de clonagem. Além disso, foi iniciado em paralelo o uso do vetor de expressão pF3a como opção de clonagem.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ceplac. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Cacau**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acesso em: 26 abr. 2016.
- SOUZA, C. S. 2012. Sintase da quitina de *moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora: caracterização, clonagem, expressão heteróloga e triagem virtual e teste in vitro de inibidores. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- OLIVEIRA, ANIBAL SILVA DE. 2013. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes NS1 e NS3 do vírus da dengue tipo 3. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- NELSON, David L.; COX. 2014. Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Artmed Editora.