

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

Raquel Benevides; Edjane Bastos; Afonso Menezes

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: netonascto35@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Edjanebferreira@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: vassoura de bruxa; sintase da quitina; vetor da clonagem

INTRODUÇÃO

A quitina é um homopolissacarídeo linear com uma função estrutural de extrema importância na composição das membranas celulares dos fungos. Sendo um desses o *Moniliophthora perniciosa*, causador da fitopatologia da cultura do *Theobroma cacao*, a Vassoura-de-bruxa, que infecta as regiões meristemáticas da planta, especialmente frutos novos, lançamentos e almofadas florais, causando queda acentuada na produção, dano nas almofadas florais e causando enfraquecimento da planta (Brasil, 2013). Com os conhecimentos adquiridos a partir da descoberta da sequência do genoma do *Moniliophthora perniciosa* por Souza (2012), foram criadas alternativas para o controle do fungo nas plantações de cacau, onde a inibição ou desregulação das principais enzimas são objetivos importantes para o desenvolvimento de fungicidas (Merzendorfer, 2003). No qual, este presente trabalho se baseia no pressuposto da elaboração de um inibidor para enzimas da rota de síntese da quitina, como a Quitina Sintase, dispendo-se a fazer a clonagem da porção enzimática da Quitina Sintase que proporcionará testes *in vitro* de possíveis inibidores para controle do *Moniliophthora perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O gene sintético da Quitina Sintase foi obtido a partir do trabalho de Souza (2012). Os *primers* foram selecionados a partir da sequência dos nucleotídeos disponíveis no GenBank sob o número EU154354.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com o Kit Toptaq[®] MasterMix (Qiagen[®]) utilizando o termociclador *Mastercycler 5333* (Eppendorf[®]) com os *primers* direto e reverso contendo os sítios de restrição para as enzimas *Sgf1* e *Pme1*, segundo as recomendações do fabricante. Posteriormente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% seguindo os seguintes padrões V = 96; mA 80; W 7; tempo 30 min;

Subsequentemente foi realizada a purificação da amostra da PCR utilizando o kit PureLink[®] PCR purification Invitrogen[®], seguindo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a 4 °C para uso imediato e posteriormente a -20 °C para armazenamento a longo prazo.

A partir daí o incerto e o vetor amplificados foram preparados por digestão com as endonucleases de restrição (*Pme1* e *Sgf1*). A reação foi incubada por 3 horas a 37°C, em seguida foi colocada a 80°C por 20 minutos para desativação das enzimas. Os componentes da reação estão representados na Tabela 1. Em seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% obedecendo aos seguintes padrões V = 96; W = 7; mA = 80; Tempo = 30 min.

TABELA 1: digestão do inserto e do vetor pF3a

DIGESTÃO DO VETOR pF3a		DIGESTÃO DO INSERTO	
COMPONENTE	VOLUME μ l	COMPONENTE	VOLUME μ l
pF3a	20	Inserto Q.S	20
Pme1	1	Pme1	1
Sgf1	1	Sgf1	1
Buffer	5	Buffer	5
BSA	1	BSA	1
H2O	22	H2O	22
Total	50	Total	50

*inserto Q.S se refere a porção enzimática

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO

PCR do gene sintético

O gene sintético utilizado é composto pela porção enzimática e transmembrânica da quitina sintase inserida no vetor pF3a, que contém os sítios de restrição, e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Para amplificação foi utilizado o Kit Toptaq[®] Master Mix Qiagen[®] com os *primers* direto e reverso contendo os sítios de restrição *Sgf1* e *Pme1*. Cujas inserções na sequência a ser amplificada é torna-la compatível com as endonucleases de restrição e com a clonagem no vetor pF3a (NELSON & COX, 2014). A sequência dos *primers* desenhados foram referentes a porção enzimática da Quitina Sintase (TABELA 1).

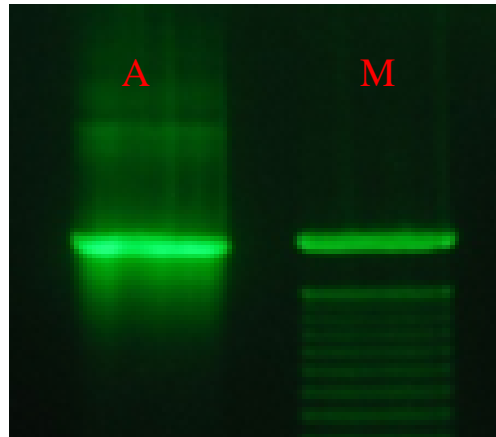
TABELA 2: *Primers* selecionados com suas enzimas de restrição.

<i>Primer</i>	Enzimas de restrição	Sequência	T.M*
Direto	<i>Sgf1</i>	GGA ATAGCG ATC GC* ATG GCG AAT CGC CCG CC	70 °C
Reverso	<i>PmeI</i>	GGC GTT TAA AC*A TCA CCG GGC AGG TTG GGA AG	66 °C

*temperatura de anelamento.

Demonstra-se o resultado da PCR na Figura 1, onde é possível visualizar o amplificado em torno de 1800 pb. A PCR é extremamente útil na obtenção de DNA para clonagem recombinante, uma vez que o gene ou os genes de interesse podem ser facilmente amplificados se suas sequências de interesse forem conhecidas (NELSON; COX, 2014).

FIGURA 1: Gel de agarose a 1% obedecendo aos seguintes padrões: V = 96; W = 7; mA = 80; Tempo = 30 min

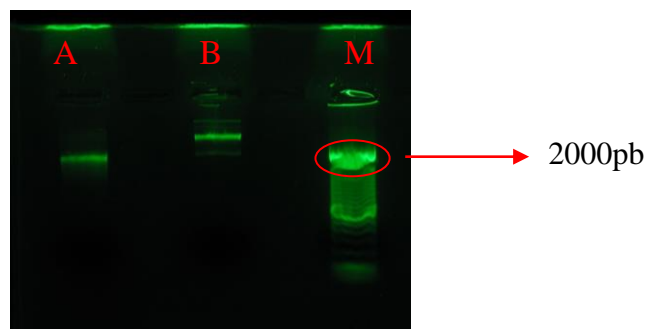


Legenda: (A) Banda com gene sintético com a sequência codificante da porção enzimática amplificada (1800pb); (M) marcador molecular 100 bp (Primeira banda 2000pb) (Invitrogen® LADDER).

Digestão por endonucleases de restrição

Após a purificação do produto da PCR, o inserto amplificado a ser clonado foi preparado por digestão com endonucleases de restrição para obter o fragmento de 1800 pares de bases, assim como o vetor pF3a. A reação apresentou boa eficiência, como se apresenta na Figura 2.

FIGURA 2: Gel de agarose a 1% obedecendo aos seguintes padrões: V = 96; W = 7; mA = 80; Tempo = 30 min



Legenda: (A) inserto após digestão; (B) plasmídeo (pF3a) após digestão; (M) marcador molecular 100 bp (Invitrogen® LADDER)

Logo em seguida foram analisadas as concentrações do inserto (porção enzimática) e plasmídeo (pF3a) no NanoDrop (Thermofisher scientific®) (TABELA 2), os quais não apresentaram concentrações suficientes para a ligação (> 30 ng/μl) e, posteriormente, a transformação em células de *E. coli*. Isso se justifica pois, as ligações experimentais devem conter entre 0,01 e 0,1 μg do inserto e diferentes quantidades do plasmídeo; sendo que as proporções devem variar de 1:4 a 8:1 (Joseph & Russell, 2001). Em razão das baixas concentrações obtidas, não foi possível prosseguir com a ligação.

Este resultado destaca a importância do desenvolvimento de métodos otimizados para a purificação dos ácidos nucleicos submetidos a reações enzimáticas.

QUADRO 2: Análise da concentração do plasmídeo e inserto

Plasmídeo	17 ng/μl
Inserto	12 ng/μl

CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados, foi possível amplificar a região de interesse com boa concentração e efetuar a restrição enzimática do gene sintético com sucesso. Porém, devido à baixa concentração da recuperação da amostra após digestão, a continuação da pesquisa foi inviabilizada. Para recuperar o purificado em maior concentração após a digestão, sugere-se realizar a diluição final em menor volume, obtendo-se assim um purificado em concentração suficiente para proceder ao passo de clonagem e transformação em *E. coli* e assim viabilizar os experimentos de expressão heteróloga.

REFERÊNCIAS

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BRASIL. Ceplac. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Cacau**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acesso em: 08 ago. 2018

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.