



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

Clonagem e expressão heteróloga da Esqualeno Epoxidase de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS- MORA de *Trametes villosa* (STAHEL) em células de *E. coli*.

**Afonso Menezes do Nascimento Neto<sup>1</sup>; Raquel Guimarães Benevides<sup>2</sup>; Edjane Bastos<sup>3</sup>; Henrique Machado de Oliveira<sup>4</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Licenciatura em ciências biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Netonascto35@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgbenevides@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Edjanebferreira@gmail.com
4. Participante do Projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Henriquebiomol@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitopatologia; Vassoura-de-Bruxa; Clonagem Molecular.

### INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa é uma das mais importantes e destrutivas doenças do cacau, chegando a causar perdas de até 90% na produção, a doença foi descoberta pela primeira vez no Suriname, em 1895, e embora ocorresse de forma endêmica na região Amazônica, desde o século XIX, só foi constatada na principal região produtora de cacau do Brasil, o sul da Bahia, em 1989 (OLIVEIRA; LUZ, 2005). Sendo causada principalmente pelo *Moniliophthora perniciosa*, que infecta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento: brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos da doença como hipertrofia dos tecidos infectados.

Muitos esforços foram feitos no combate a esse fitopatógeno, dentre eles estão a execução da poda fitossanitária, controle biológico e a aplicação de novos fungicidas (VIEIRA; & VALLE, 2006). Porém, para o desenvolvimento de novos fungicidas, necessita-se de pesquisas *in vitro* para poder identificar enzimas importantes ao metabolismo do fungo e proporcionar a busca de possíveis inibidores (GALANTE *et al.* 2012). Uma dessas enzimas é a Esqualeno Epoxidase (EE) que atua na conversão do Esqualeno a **Esqualeno-2,3-epóxido** (NELSON; COX 2014).

Em vista disso, este trabalho tem como objetivo clonar de forma heteróloga a enzima EE de *M. perniciosa* em células de *E.coli* e analisar a expressão da enzima recombinante como ferramenta de produção enzimática para futuros testes de inibidor.

### MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

#### *Desenho dos Iniciadores*

A sequência da Esqualeno Epoxidase foi obtida a partir da sequência de nucleotídeos do gene ERG1 (GenBank: KC479662.1), sendo desenhados a partir da sequência nucleotídica na ferramenta on line disponível em <https://www.sigma-agenosys.com/calc/DNACalc.asp>.

TABELA 1: Sequência dos *primers* específicos desenhados para a sequência de EE

Nome	Enzima de Restrição	Sequência nucleotídica	Posição	Temp Anelamento
S	<i>Sgfl</i>	GATAGCGATCGCATGATGGCCAAAGCACAATACG	Direto	64,8°C
P	<i>Pmel</i>	GATAGCGATCGCATGATGGCCAAAGCACAATACG	Reverso	62°C

\*Em negrito, sítios de restrição.

### ***Amplificação da sequência codificadora e do plasmídeo***

A porção codificadora da Esqualeno Epoxidase (EE) e o plasmídeo de interesse foram amplificados utilizando o kit TopTaq® *Master Mix* Qiagen®, disponibilizado pelo LAPEM, segundo a reação demonstradas na tabela 2, e composição da tabela 3 a seguir, em um termociclador modelo Eppendorf.

TABELA 2: Condições para amplificação

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Ext. Inicial	94°C	3 min
Desnaturação	94°C	30 s
Anelamento	58°C	30 s
Extensão	72°C	80 s
Ext. Final	72°C	10 min

TABELA 3: Composição de reação para amplificação

MIX	VOLUME
TAQ	12,5 µL
Primer R	0,5 µL
Primer F	0,5 µL
DNA	2,5 µL
H <sub>2</sub> O	9 µL

### ***Clonagem em vetor de expressão e transformação em *E. coli* BL21 (DE3)***

Os produtos amplificados foram digeridos segundo a reação da tabela 4, utilizando enzimas de restrição previamente selecionadas (*pmel* e *sgfl*). Após isso, os produtos da digestão foram ligados, sendo utilizadas as proporções 3:1 e 5:1 (inserto:vetor), obtida através da fórmula: (Massa do Vetor/Tamanho do Vetor) / (Massa do Inserto/Tamanho do Inserto) = 1. Plasmídeos recombinantes foram transformados em cepas *E. coli* BL21 (DE3) através do método de eletroporação (SAMBROOK, 2001).

TABELA 4: Reação da digestão.

DNA	Volume	Plasmídeo	Volume
Pmel	1µL	Pmel	1µL
Sgfl	1µL	Sgfl	1µL
Buffer 4	5µL	Buffer 4	5µL
DNA	20µL	Plasmídeo	25µL
H <sub>2</sub> O	22µL	H <sub>2</sub> O	17µL
BSA	14µL	BSA	14µL

### ***Validação da transformação***

Para seleção da transformação, células de *E. coli* após a transformação foram plaqueadas em meio sólido LB ágar contendo 100 µg/mL de Ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Os clones que cresceram foram submetidos à amplificação por PCR a partir da colônia.

## **RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)**

### ***PCR inicial do gene sintético***

Para verificação dos resultados da PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% mostrado na figura 1. A amplificação foi efetuada com sucesso, como mostra a imagem abaixo com a banda de cerca de 1500pb respectivo ao gene sintético EE.

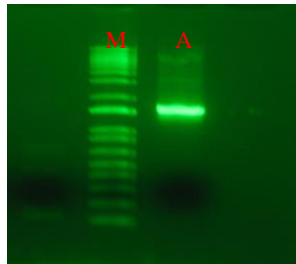


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose a 1% seguindo os seguintes padrões V – 98; mA – 59; W – 60; min 30 (M) Marcador molecular 1kb plus DNA LADDER <sup>®</sup>Invitrogen. (A) Amostra EE amplificada com cerca de 1500pb já com os sítios de restrição.

### ***Digestão Enzimática do inserto e do vetor***

A digestão do inserto e do vetor foi feita seguindo os padrões da reação da tabela anterior. Após a reação as amostras foram purificadas e depois foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% descrita na figura 2. Como pode ser diagnosticado na Figura 2, o vetor pF3a foi digerido, visto que é possível observar os fragmentos de 3323pb (pF3a, 2-B) e 1500pb (EE, 2-A).

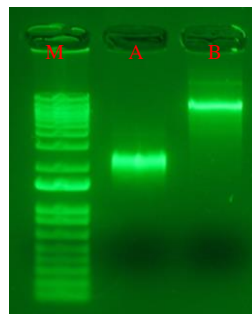


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose a 1% com as seguintes condições V – 98; mA – 59; W – 60; min 30 (M) Marcador molecular 1kb plus DNA LADDER <sup>®</sup>Invitrogen (A) Plasmídeo pF3a (B) Gene sintético.

### ***Transformação das células de E. coli***

Os resultados das células colocadas nas placas de petri para verificar a transformação, infelizmente não foram bem sucedidos, visto que as células não cresceram no meio contendo o antibiótico o qual ela deveria ter resistência. Dentre as diversas variáveis que proporcionaram os resultados negativos no processo de transformação, a densidade das células no meio antes de fazer o procedimento de eletroporação tem destaque, pois segundo Wu et al. (2010) a fase exponencial do crescimento bacteriano é a melhor etapa recomendada para facilitar a captação máxima de DNA exógeno, observações feitas suportam a hipótese de que a frequência de eletrotransformação celular é inversamente proporcional ao tamanho da população celular. Assim, o estágio inicial da fase log resulta em maior frequência de células que são transformadas do que as fases intermediária e tardia da fase log. Desta forma, para evitar eventuais erros, sugere-se verificar a densidade das células no meio utilizando o espectrofotômetro antes de fazer o processo de eletroporação.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível amplificar a sequência de interesse, efetuar a digestão enzimática do gene sintético EE amplificado e do vetor pF3a e fazer a ligação entre o inserto e o vetor. Porém, não foi possível proceder para os testes de expressão heteróloga, pois as células não foram transformadas com sucesso.

### **REFERÊNCIAS**

GALANTE, R. S. et al. Purification, characterization and structural determination of chitinases produced by *M. pernicioso*. An Acad Bras Cienc., v. 84, n. 2, p. 469-86, 2012.

HISTÓRIA e Evolução do Cacau. [S. l.], 24 jul. 2019. Disponível em: [http://www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm). Acesso em: 24 jul. 2019.

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

OLIVEIRA, Marival lopes de; LUZ, Edna Dora Martins Newman. Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil. Ilhéus: [s. n.], 2005.

VIEIRA, D. R.; VALLE, R. R.. Indução de resistência sistêmica para o controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) dos clones ics 1 e ccn 51. 15<sup>o</sup> Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, San José, 2006.

WU, Ning; MATAND, Kanyand; KEBEDE, Bizuayehu; ACQUAAH, George; WILLIAMS, Sonya. Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells. Chile, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning. Tradução . Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.