

CULTIVO OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE RNA E AMPLIFICAÇÃO DO Cdna DE *MONILIOPTHORA PERNICIOSA* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA PARA EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UMA CELULASE

Edjane Ferreira¹; Jamille de Santana Melo Adorno², Luiz Henrique Machado Oliveira³; Sandra Aparecida de Assis⁴; Raquel Benevides⁵;

1. Bolsista do Programa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (PIBIC/FAPESB), Graduanda em Ciências Biológicas, Bacharelado, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edjaniny@hotmail.com
2. Mestranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: henriquebiomol@gmail.com
3. Mestranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: henriquebiomol@gmail.com
4. Colaboradora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br
5. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas (DCBio), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: raquelgb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: basidiomiceto, enzimas, celulase

INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero de alta abundância e renovabilidade na terra, sendo uma possível fonte renovável de matéria prima e energia. As celulasas, enzimas degradadoras de celulose, são usadas na indústria dentre outras utilidades para a bioconversão de bioetanol: FUJITA *et al.* (2004). Essa enzima está presente em plantas, microrganismos e trato digestivo de animais: HUANG *et al.*, (2008), WATANABE; TOKUDA, (2010). Os fungos necessitam excretar celulasas que são responsáveis pela degradação da parede celular vegetal: SATANA (2010). O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, um basidiomiceto causador da vassoura de bruxa, é um conhecido produtor de celulasas termoestáveis: SANTANA (2010). Sendo assim, esse estudo propõe uma otimização do protocolo para clonagem dessa enzima que é uma forte candidata à produção recombinante para uso industrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

O *Moniliophthora perniciosa* isolado foi obtido na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com o número de identificação CCMB 257, preservado em método Castellani reativado em meio sólido Agar batata e dextrose (BDA) por 15 dias a 25°C.

Após esse período de incubação o fungo foi inoculado em dois tipos de meios. O primeiro meio de cultivo (WY) foi produzido com os seguintes componentes: 40 g de farelo de trigo; 6 g de extrato de levedura; 1 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄; 0,2 g de KCL e água destilada q.s.p. 1L. O segundo meio de cultivo (CMC) foi produzido com os seguintes componentes: 6,0 g de K₂HPO₄; 5,0 g de carboximetilcelulose; 3,0 g de extrato de levedura; 3,0 g de KH₂PO₄; 1,5 g de Agar; 1,2 g de NaNO₃; 0,2 g de MgSO₄·7H₂O; 0,05 g de CaCl₂·2H₂O; 0,01 g de MnSO₄·7H₂O; 0,001 g de ZnSO₄·7H₂O e água destilada q.s.p. 1L. A incubação foi realizada pelo período de 7 a 15 dias em estufa B.O.D a 26°C.

Após consecutivos repiques do fungo, tornou-se necessário em alguns momentos a reativação em meio de cultivo (Agar batata dextrose) produzido com os seguintes componentes: 200 g de batata cozida e amassada e 30 mL de água destilada. A incubação foi

por um período de 15 dias a 25°C. Após esse período, foi retirado um disco de 1 cm de diâmetro e transferido para placas de petri contendo meio líquido WY.

Para extração de RNA, usou-se o reagente *TRIZOL* (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante, tendo alterações na incubação que o fabricante solicitava a incubação em temperatura ambiente passando a incubar as amostras em baixas temperaturas (utilizando-se gelo ou refrigeradores) durante todo o processo. Para extração foi utilizado ainda o kit de extração (Invitrogen®) conforme recomendações do fabricante, como método alternativo de obtenção de RNA total.

Após extraído o RNA foi analisado no espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific®) seguindo para a eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O resultado foi registrado pelo Transiluminador de ultravioleta L.PIX (Loccus biotecnologia).

Os *primers* específicos utilizados foram desenhados com base em regiões conservadas entre as sequências gênicas de celulase de basidiomicetos, disponíveis no *Genbank* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*).

Para a síntese do cDNA, foram colocados 8 µL de RNA total em microtubos de 0,2 ml contendo 1 µL de buffer, 1 µL de DNase I e 8 µL de água *nuclease free* em seguida foi feita a incubação por 15 minutos em temperatura ambiente para a eliminação do DNA genômico na amostra, logo após a amostra foi incubada a 65° por 15 minutos para inativação da DNase I.

Para a reação de transcrição reversa, (formação do DNA a partir de um molde de RNA) foi utilizado 5 µL do RNA tratado com DNase I, 3 µL de água *nuclease free*, 1 µL OligodT (Invitrogen®) e 1 µL de Desoxirribonucleotídeos Trifosfato (dNTPs) a 10 mM e incubou-se a 65°C por 5 minutos.

Em seguida adicionou-se 4 µL MgCl₂ 25 mM; 2 µL Tampão RT 10x; 2 µL DTT 0,1 M; 1 µL RNase, e incubou-se a 42°C por 2 min. No passo seguinte adicionou-se 1 µL Super Script II RT a qual foi submetido a nova incubação a 42°C por 50 min, em seguida houve a paralização da reação a 70°C por 15 min. Para eliminação do RNA foi colocado 1 µL RNase H e realizada última incubação a 37°C por 15 min depois armazenado o cDNA sintetizado a -80°C.

Para amplificação do cDNA foi utilizada a técnica de Reação de Cadeia Polimerase (PCR). Como fita molde foi utilizada a primeira fita de cDNA e, como iniciadores, um dos *primers* específicos para o gene (como senso) e oligo-dT (Anchor Primer, anti-senso).

A reação foi preparada usando três kits o primeiro Kapa Taq, Biossistemas®, o segundo Kapa HiFi Hotstart, Biossistemas® e o último Taq Platinum Invitrogen® seguindo instruções do fabricante.

A PCR foi realizada no termociclador (BIO-RAD Prime Thermal Cycler). Utilizando o programa específico a cada kit mudando apenas a temperatura de anelamento que variou de 58°C a 60°C. Após a amplificação foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,2%. O resultado foi registrado pelo Transiluminador de Ultravioleta L.PIX (Loccus Biotecnologia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Moniliophthora perniciosa* inoculado em meio BDA por 15 dias apresentou crescimento satisfatório. Os inóculos em meio líquido WY apresentaram micélio em quantidade suficiente para extração após 14 dias de incubação. O cultivo em meio líquido favoreceu a extração de RNA, pois nesse meio o fungo obteve maior superfície de contato. Segundo Santana (2010), técnicas de cultivo em meio líquido apresentam maiores vantagens para o desenvolvimento fúngico, devido principalmente a interação dos nutrientes com o microrganismo. Já no meio CMC não houve massa micelial de quantidade e qualidade necessária para extração. O cultivo em meio batata foi utilizado para a reativação do fungo quando necessária, garantindo o crescimento.

As amostras obtidas dos dois protocolos testados para a extração do RNA total analisadas no espectrofotometro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific®) apresentaram resultados muito diferentes. O protocolo com o reagente Trizol obteve uma concentração de ácidos nucléico 0,85 ug/mL, já o com o Kit extração Invitrogen a concentração de ácidos nucléicos foi de 321,8 ug/mL.

Com base nos resultados da extração, o protocolo do reagente Trizol apresentou menor concentração de RNA que o Kit de extração Invitrogen®. Levando em conta o resultado da concentração por meio da espectrofotometria foi realizada uma nova extração de RNA total usando o protocolo do Kit extração Invitrogen®. As amostras com o kit da invitrogen foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando bandas sem arrasto e com boa nitidez conforme figura 1.

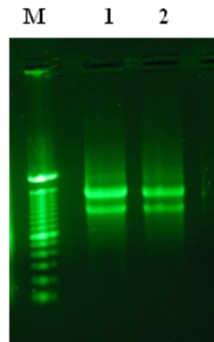


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose 0,8% como resultado da extração de RNA. Da direita para esquerda M: Marcador de massa molecular de 100pb *DNA Ladder*, amostras 1 e 2 da extração com o kit da invitrogen.

Com base nas sequências obtidas no banco de dados do projeto genoma do *M. pernicioso* sintetizamos 4 melhores *primers* (IDT DNA), seguindo os parâmetros de temperatura de *melting* (T_m) que variou de 60°C a 63,1°C e teor de C/G que variou de 52% a 58,3% (Tabela 1).

Tabela 1 *Primers* desenhados para amplificação

<i>Primers</i>	Sequência 5'→3'	Teor de C/G	Temperatura de <i>melting</i> (T_m).
CELase3RACE2	AGT CCT GGT CGT GGA ATG GGA GAG	58,3%	62,1 °C
CELase3RACE1	ATT GGG GGT GGA GGA GGT TTC GTG	58,3%	63,1 °C
EndoGlcMpn1	ATG TTC TAC CGG CTC CTA CTC GTC T	52,0%	60,7° C
EndoGlcMpn2	AAG CAT GGT CCG CAC TTT CTC	52,0%	61,0° C

A amplificação do gene *Moniliophthora pernicioso* com o uso dos *primers* desenhados a partir do RNA extraído não apresentou formação de bandas com especificidade, apresentando pouca nitidez e de tamanho inferior do desejado. Na figura 2, pode-se ver que não foi possível amplificar a região de interesse do cDNA sintetizado, aparecendo bandas de baixo peso molecular de aproximadamente 200 pb nas amostras 5 e 7 usando o kit kapa taq.

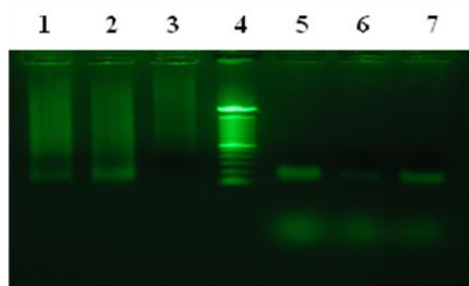


Figura 2: Gel de agarose a 1,2% com resultado de PCR de *M. Perniciosa* cultivado em meio líquido WY. Da direita para esquerda: amostra 1: kit taq platinum, temperatura 58°C, *primer* EndoGlcMpn1, amostra 2: kit taq platinum, temperatura 60°C, *primer* EndoGlcMpn1, amostra 3: kit taq platinum, temperatura 60°C, *primer* CELase3RACE1, amostra 4: Marcador de massa molecular de 100pb *DNA Ladder*, amostra 5: kit Kapa Taq, temperatura 60°C, *primer* EndoGlcMpn1, amostra 6: kit Kapa Taq, temperatura 60°C, *primer* CELase3RACE1, amostra 7: kit Kapa Taq, temperatura 58°C, *primer* EndoGlcMpn1.

Mesmo com 4 *primers* desenhados e usando 3 kits para a reação a amplificação não foi como esperada. Diante desses resultados, podemos levantar duas hipóteses: o fungo está expressando pouco o gene da celulase nos meios indutores utilizados, dessa forma produz pouco RNA mensageiro referente a enzima em questão, ou os *primers* desenhados não se anelaram adequadamente com o cDNA sintetizado. Novas condições de cultivo e de amplificação estão em teste.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados, o meio líquido WY proporcionou um desenvolvimento de massa micelial e de material para extração de forma satisfatória. Para a extração o kit da invitrogen comparado ao reagente Trizol foi o que houve melhor resultado. Até o momento, os meios de cultivo utilizados e condições de amplificação não geraram o inserto esperado. Tem-se proposto novas condições de cultivo do fungo, que induzam a expressão do gene de interesse, assim como o teste de novos *primers* e variações de condições de amplificação como temperatura de anelamento.

REFERÊNCIAS

- AIME M. C., PHILLIPS–MORA, W.** 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, v97, n5, p1012-1022.
- FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A.** 2004. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1207–1212.
- HUANG, H.; YANG, P.; LUO, H.; TANG, H.; SHAO, N.; YUAN, T.; WANG, Y.; BAI, Y.; YAO,.,2008.** B.High-level expression of a truncated 1,3-1,4-β-D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 95–103.
- SANTANA, M. L.** 2010. Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- WATANABE, H.; TOKUDA, G.** 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 609–632.