

LUÍZA MARIA DE ARAÚJO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *GlnB* DE *Azospirillum*
*brasiliense***

Monografia apresentada para obtenção
do título de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Dr^a. Leda Satie Chubatsu
Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

CURITIBA
2000

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVEATURAS	iv
RESUMO	v
TABELA 1	14
TABELA 2	14
TABELA 3	17
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. <i>Azospirillum</i>	01
1.1.1. Importância do <i>Azospirillum</i> para agricultura	01
1.2. Fixação biológica de nitrogênio	02
1.2.1. Nitrogenase	03
1.2.1.1 Regulação pós – traducional da nitrogenase	03
1.3. Genes <i>nif</i>	04
1.3.1. Genes <i>nif</i> em <i>Azospirillum brasilense</i>	04
1.4. Assimilação de nitrogênio	05
1.5. Controle do metabolismo pelo sistema <i>ntr</i>	06
1.6. regulação da fixação de nitrogênio em <i>Azospirillum brasilense</i>	10
1.7. Proteínas PII	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Bactérias e plasmídeos	14
3.2 Meio de cultura	15
3.3 Condições de cultivo	17
3.4 Antibióticos	17
3.5 Extração de DNA total de <i>Azospirillum brasilense</i>	18
3.6 Separação eletroforética de DNA	18
3.7 Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão	19
3.8 Amplificação de DNA por PCR	19
3.9 Clivagem do DNA amplificado por PCR com enzimas de restrição	20
3.10 Preparação do vetor de expressão para clonagem do produto de PCR	20
3.10.1 Extração do plasmídeo	20
3.10.2 Clivagem do plasmídeo com enzimas de restrição	21
3.11 Ligação do vetor ao fragmento amplificado	21
3.12 Transformação bacteriana por eletroporação	22

3.12.1 Preparo de bactérias eletrocompetentes para eletroporação	22
3.12.2 Transformação bacteriana	22
3.13 Purificação e análise dos plasmídeos recombinantes	22
3.14 Sequenciamento do DNA	23
3.14.1 Prepara do material para sequenciamento	23
3.14.2 Reação de sequenciamento	24
3.14.3 Análise da sequência obtida	25
3.15 Expressão da proteína GlnB em <i>E. coli</i>	25
3.16 Dosagem de proteína pelo método de Bradford	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Amplificação do gene <i>glnB</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> por PCR a partir do seu DNA genômico	27
4.2 Construção de plasmídeos recombinante contendo o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	30
4.3 Sequenciamento do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> a partir do produto de PCR clonado nos vetores de expressão e sua comparação com banco de dados.	34
4.4 Superexpressão da proteína PII-His.	36
4.5 Superexpressão da proteína PII nativa.	38
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICE 1	56
APÊNDICE 2	57
APÊNDICE 3	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase em respostas aos níveis de nitrogênio intracelular	08
Figura 2 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>Ntr</i> na família Enterobacteriaceae	09
Figura 3 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i> em <i>A. brasilense</i>	11
Figura 4 "Primers" construídos para as regiões 3' e 5' do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> , com seus respectivos sítios de restrições.	28
Figura 5 Alinhamento dos "primers" 5' e 3' com o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> , mostrando a região que foi amplificada por PCR.	28
Figura 6 Eletroforese do produto de amplificação de DNA genômico de <i>A. brasilense</i> utilizando os "primers" específicos <i>AbglnB</i> 3'e 5'.	29
Figura 7 Reação de amplificação do plasmídeo pLMA-MLV1 por PCR da região de policlonagem do clone e do controle pET-28a, a partir de "Primers" 3' e 5' do vetor pET-28a.	31
Figura 8 Esquema do plasmídeo pLMA-MLV1	32
Figura 9 Perfil de reação de restrição do plasmídeo pLMA-4 e do controle pT7-7 cortados com as enzimas <i>NdeI</i> <i>Bam</i> HI	33
Figura 10 Resultado da comparação da seqüência obtida do produto de PCR com banco de dados a nível de nucleotídeos, utilizando o programa BLAST Search (GenBank/NCBI) (ALTSCHUL <i>et al.</i> , 1997).	34
Figura 11 Padrão eletroforético da proteína PII de <i>A. brasilense</i> a partir do vetor pET28-a em gel de poliacrilamida desnaturante.	37
Figura 12 Padrão eletroforético da proteína PII de <i>A. brasilense</i> a partir do vetor pT7-7 em gel de poliacrilamida desnaturante.	39
Figura 13 Padrão eletroforético da proteína PII nativa de <i>A. brasilense</i> a partir do vetor pT7-7 na estirpe de <i>E. coli</i> , <i>glnB</i> ⁻ e <i>glnD</i> ⁻ , RB9065 (DE3) em gel de poliacrilamida desnaturante.	40
Figura14 Comparação do padrão eletroforético das proteínas PII nativa e PII-His de <i>A. brasilense</i> a partir dos vetores pET28a e pT7-7, respectivamente	41

Listas de abreviaturas

DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleico trifosfatados
D.O.	densidade óptica (absorbância)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
kb	quilobase
pb	pares de bases
ATP	adenosina trifosfato
RNA	ácido ribonucleico
RNAP	RNApolimerase
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodiamina
TRIS	tris (hidroximetil) – aminometano
UAS	sequência ativadora localizada à montante do promotor (upstream activator sequence)
<i>ntr</i>	sistema regulador geral do nitrogênio (global nitrogen regulatory system)

RESUMO

Azospirillum brasilense é um microrganismo, diazotrofo, endofítico facultativo, encontrado em associação com inúmeras plantas de importância agrícola. O processo de fixação do nitrogênio envolve um alto gasto energético, sendo altamente regulado tanto a nível da síntese do complexo enzimático nitrogenase, quanto a nível de sua atividade. A proteína PII (GlnB), produto do gene *glnB*, é uma das proteínas envolvidas na cascata de regulação da fixação de nitrogênio. Esta proteína é responsável pelo sensoriamento dos níveis de nitrogênio intracelular. O gene *glnB* de *Azospirillum brasilense* foi clonado a partir da amplificação por PCR utilizando como molde o DNA genômico deste organismo e oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. A seqüência de bases desses oligonucleotídeos foi baseada naquela depositada no banco de dados GENBANK. O fragmento amplificado de 369 pb foi clonado e sequenciado nos vetores de expressão pET28a e pT7-7 entre os sítios *NdeI* e *BamHI* e no vetor pTZ19R entre os sítios *XbaI* e *HindIII*, originando os plasmídeos pLMA-MLV1 pLMA-4 e pLMA-2, respectivamente. Após crescimento e indução com IPTG ou lactose, a proteína PII foi superexpressa. O plasmídeo pLMA-MLV1 expressou a proteína PII como uma fusão a uma seqüência contendo 6 histidinas (His-Tag) enquanto o plasmídeo pLMA-4 expressou a proteína PII nativa. A taxa de migração das proteínas em gel de poliacrilamida-SDS foi do tamanho esperado, 15 kDa para a proteína PII-His e 13 kDa para a proteína PII nativa. Ambas as proteínas, PII nativa e PII-His, foram superexpressas e encontradas solúveis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* é constituído por bactérias diazotróficas (capazes de fixar nitrogênio), Gram negativas, microaerófilas, endofíticas facultativas. Estas bactérias são encontradas no solo e associadas com raízes de várias plantas como o milho, trigo, sorgo, arroz, banana e abacaxi, em regiões temperadas e tropicais (DOBEREINER & DAY, 1976; DOBEREINER, 1991; CRUZ *et al.*, 1999). *Azospirillum* sp foi originalmente isolado a partir de raízes de gramíneas (BALDANI *et al.*, 1986).

Este gênero faz parte das α Proteobactérias e contém 7 espécies, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. largimobile* e *A. doebereineriae* (HOLT *et al.*, 1993; FANI *et al.*, 1995; DEKHIL *et al.*, 1997; ECKERT *et al.*, 1999; MADIGAN *et al.*, 2000).

1.1.1. Importância do *Azospirillum* para agricultura

As bactérias do gênero *Azospirillum* são potencialmente benéficas para a agricultura, sendo encontradas na rizosfera onde proliferam utilizando exsudatos da raiz. Em experimentos de inoculação em campo, *Azospirillum* foi capaz de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes como trigo, sorgo e milho, em solos e regiões climáticas diferentes (PATRIQUIN *et al.*, 1983; OKON & VANDERLEYDEN, 1997). Vários estudos indicam que a inoculação de plantas com esta bactéria provoca a proliferação das raízes e aumenta a captação de água e sais minerais devido a ação provável de fitohormônios (MORGENSTERN & OKON, 1987). Entretanto, apesar dos dados experimentais relativos ao estímulo do crescimento de plantas promovido por *Azospirillum*, o modo exato de ação pelo qual esta bactéria promove o aumento do crescimento da planta ainda não é totalmente compreendido (HOLGUIN, 1999).

1.2. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para a síntese de inúmeras biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos e, conseqüentemente, fundamental para a manutenção da vida na terra. O gás dinitrogênio, N_2 , é a forma mais abundante deste elemento e constitui quase 80% da atmosfera da Terra, entretanto nenhum eucarioto é capaz de utilizá-lo diretamente (POSTGATE, 1982; TORTORA *et al.*, 1995) e somente algumas bactérias, conhecidas como diazotrofos, conseguem metabolizá-lo.

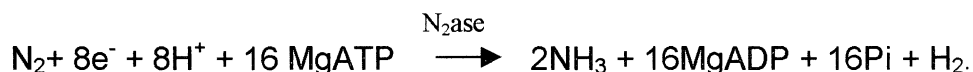
Embora a amônia, NH_3 , seja o composto nitrogenado de mais fácil utilização em procariotos e que ele proporciona uma maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas, em várias situações, a bactéria é obrigada a utilizar outras fontes de nitrogênio e para isso, esses organismos são capazes de sintetizar proteínas visando a captação e metabolização destas fontes alternativas de nitrogênio. Normalmente a síntese e, em alguns casos, a atividade dessas proteínas é altamente regulada em relação a disponibilidade desses compostos (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso a amônia, catalisado pela complexo enzimático denominado nitrogenase. Esse processo ocorre exclusivamente em alguns procariotos denominados diazotrofos e requer condições ambientais favoráveis. Dentre estas incluem-se ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de molibdênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Nitrogênio fixado e oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotrofos estudados (EADY, 1986; POSTGATE, 1982).

1.2.1. Nitrogenase

A nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do nitrogênio, é uma metaloenzima constituída por duas proteínas distintas, a dinitrogenase redutase ou proteína Fe, e a dinitrogenase ou proteína FeMo. Separadas, nenhuma destas é capaz de reduzir o N_2 , mas reunidas na presença de ATP e de uma fonte de baixo potencial

de redução são responsáveis pela catálise da seguinte reação (POSTGATE, 1982; EADY, 1986):



Como a transferência de elétrons nesta reação é dependente da hidrólise de ATP, a redução do nitrogênio envolve um alto custo energético para a célula (YATES, 1992; DEAN *et al.*, 1993)

Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do dinitrogênio gasoso a amônia, o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado, tanto na atividade da nitrogenase como na expressão dos seus genes. O controle da expressão dos genes estruturais do complexo enzimático nitrogenase é feito de maneira estritamente coordenada, envolvendo cascatas de genes regulatórios. De maneira simplificada, a atividade ou síntese do complexo enzimático nitrogenase só ocorre em baixos níveis de oxigênio e na ausência de amônia.

1.2.1.1. Regulação pós-traducional da nitrogenase

Em um grande número de diazotrofos, a atividade da nitrogenase pode ser regulada por ADP-ribosilação reversível da proteína Fe. Essa regulação ocorre em resposta a adição de amônio ao meio, condições anaeróbicas, ou, devido a queda da luminosidade (em bactérias fotossintetizantes) (MERRICK & EDWARDS, 1995). Este mecanismo envolve as enzimas DraT (dinitrogenase ADP-ribosil transferase), que ADP ribosila a proteína Fe inativando o complexo, e DraG (dinitrogenase reductase ativando glicohidrolase) que remove o grupo ADP-ribose ativando a nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1997). O controle por ADP-ribosilação da nitrogenase foi demonstrado em *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* (HARTMANN *et al.*, 1986), *Rhodospirillum rubrum*, *R. sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azotobacter chroococum* (citado em MERRICK & EDWARDS, 1995). Entretanto, o sinal metabólico que controla a atividade das proteínas DraT/DraG desencadeando o mecanismo de ADP-ribosilação permanece desconhecido (ZHANG *et al.*, 1997).

1.3. Genes *nif*

Os genes *nif* (genes envolvidos com a fixação do nitrogênio) codificam proteínas essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (MERRICK *et al.*, 1982). No microorganismo *Klebsiella pneumoniae*, aonde a fixação de nitrogênio foi melhor estudada, foram identificados 20 genes *nif* agrupados em um único regulon e distribuídos em 8 operons (MERRICK, 1988). Desses 20 genes, pelo menos 14 são essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifB* e *nifQ*) (MERRICK, 1988). Sendo que, os genes *nifHDK* são os genes estruturais da nitrogenase.

As proteínas codificadas pelos genes *nifLA*, são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora de transcrição e a NifL anti-ativadora em *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* e *Azotobacter vinelandii* (MERRICK, 1983).

1.3.1 Genes *nif* em *Azospirillum brasilense*

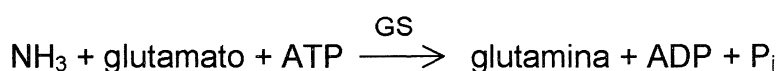
Em *A. brasilense* os genes *nif* apresentam localização cromossomal mas não se encontram agrupados como em *K. pneumoniae*, e sim espalhados em regiões distintas do genoma (PLAZINSKI *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1989; GALIMAND *et al.*, 1989; PASSAGLIA *et al.*, 1991). Distintamente do que ocorre em *K. pneumoniae* onde o gene *nifA* faz parte do operon *nifLA*, em *A. brasilense* este gene faz parte do operon monocistrônico *nifA*. Não há evidência para a existência de gene homólogo ao *nifL* em *A. brasilense*.

Em *A. brasilense* foram isolados e sequenciados os genes *nifHDKTorf1Y* que fazem parte de um único operon (QUIVIGER *et al.*, 1982; DE ZAMAROCZY *et al.*, 1989; SCHRANK *et al.*, 1987; PASSAGLIA *et al.*, 1991). Aproximadamente a 3 kb a jusante do operon *nifHDKTY* foram localizados os operons *nifENXorf3* e *orf2nifUSV* (GALIMAND *et al.*, 1988).

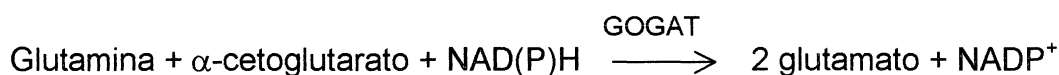
1.4. Assimilação de nitrogênio

A amônia formada no processo de redução do N₂ atmosférico ou captada do meio externo é utilizada para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, esses compostos servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Em procariotos a assimilação de amônia pode ocorrer por duas vias: na primeira, a glutamina sintetase (GS) catalisa a conversão de glutamato e amônia em glutamina (REAÇÃO 1) e a glutamato sintase (GOGAT) catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o α -cetoglutarato produzindo 2 moléculas de glutamato, uma reação dependente de NAD(P)H, (REAÇÃO 2). Na Segunda via, a glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a conversão de amônia e α -cetoglutarato em glutamato, uma reação também dependente de NAD(P)H, (REAÇÃO 3) (MERRICK & EDWARDS, 1995).

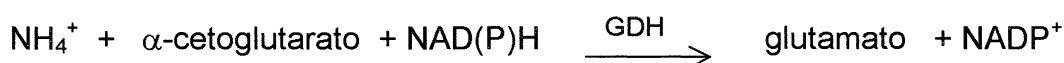
REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



A via da GDH é utilizada quando as células crescem na presença de excesso de nitrogênio fixado, enquanto a via GS/GOGAT em condições limitantes (MERRICK &

EDWARDS, 1995).

1.5. Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr*

O sistema *ntr* compreende um conjunto de genes cujos produtos estão envolvidos numa cascata regulatória que controla a expressão dos genes do metabolismo nitrogenado. Este controle do metabolismo de nitrogênio envolve a regulação da biossíntese de enzimas das vias de utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Em enterobactérias este sistema é composto por sete proteínas: NtrB (produto do gene *ntrB*), NtrC (produto do gene *ntrC*), GlnD (produto do gene *glnD*), proteína PII ou GlnB (produto do gene *glnB*), GlnE (produto do gene *glnE*) e glutamina sintetase (produto do gene *glnA*). Essas proteínas interagem em um complexo mecanismo em cascata esquematicamente apresentado na figura 1 (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A atividade das proteínas NtrB, NtrC e glutamina sintetase, é dependente da relação α -cetogluturato/glutamina (BUENO *et al.*, 1985). Em baixas concentrações ambientais de íons amônio, quando a relação α -cetogluturato/glutamina é alta, PII liga α -cetogluturato induzindo uma mudança conformacional favorecendo uma conformação ótima para sua uridililação pela proteína GlnD. O produto do gene *glnD* possui duas atividades catalíticas dependendo do nível intracelular de nitrogênio fixado: em condições limitantes de NH_4^+ a proteína GlnD possui atividade de uridililtransferase e catalisa a adição do grupamento UMP à proteína PII ligada a α -cetogluturato, enquanto que em condições de excesso de NH_4^+ , GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP (DE MEL *et al.*, 1994). A proteína PII-UMP não interage com NtrB que, na sua forma livre, catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. A proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) é um ativador de transcrição de promotor σ^N dependente. NtrC-P ativa a transcrição de genes envolvidos na utilização de fonte de nitrogênio. Em *K. pneumoniae*, entre estes genes estão o gene *nifA*, cujo produto é ativador de transcrição dos genes da fixação do nitrogênio, e o operon *glnAntrCB*, que responde pelo aumento de síntese de glutamina sintetase (GS) e NtrC (MERRICK, 1983; REITZER & MAGASANIK, 1985 e MAGASANIK, 1989). PII-UMP interage com a

adenililtransferase (ATase, produto do gene *glnE*) que catalisa a desadenilação da glutamina sintetase (BROWN *et al.*, 1971; KAMBEROV *et al.*, 1995 e MERRICK & EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase desadenilada passa então a produzir glutamina (KEENER & KUSTU, 1988). Assim em baixos níveis de nitrogênio fixado, a atividade de GS é máxima e sua síntese aumentada para a captação de amônia.

Em condições de excesso de nitrogênio fixado a proteína GlnD liga glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e ativa a de enzima removedora de UMP, desuridililando PII-UMP (DE MEL *et al.*, 1994). A proteína PII desuridililada estimula a atividade de fosfatase da proteína NtrB, desfosforilando NtrC-P e inativando-a. Ao mesmo tempo a PII desuridilada age sobre a ATase, que passa a catalisar a adenilação da glutamina sintetase. A glutamina sintetase adenilada é inativa (HAWKES *et al.*, 1985; MERRICK & EDWARDS, 1995).

A proteína NtrC faz parte do grupo de proteínas ativadoras de promotores σ^N dependentes. Somente NtrC-P é capaz de ativar a transcrição (WEISS *et al.*, 1992 e WYMAN *et al.*, 1997). Em condições limitantes de nitrogênio fixado a proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição dos genes *glnAntrBC*, dos genes *nifLA* e de outros sistemas alternativos de assimilação de fonte nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995) (FIGURA 2).

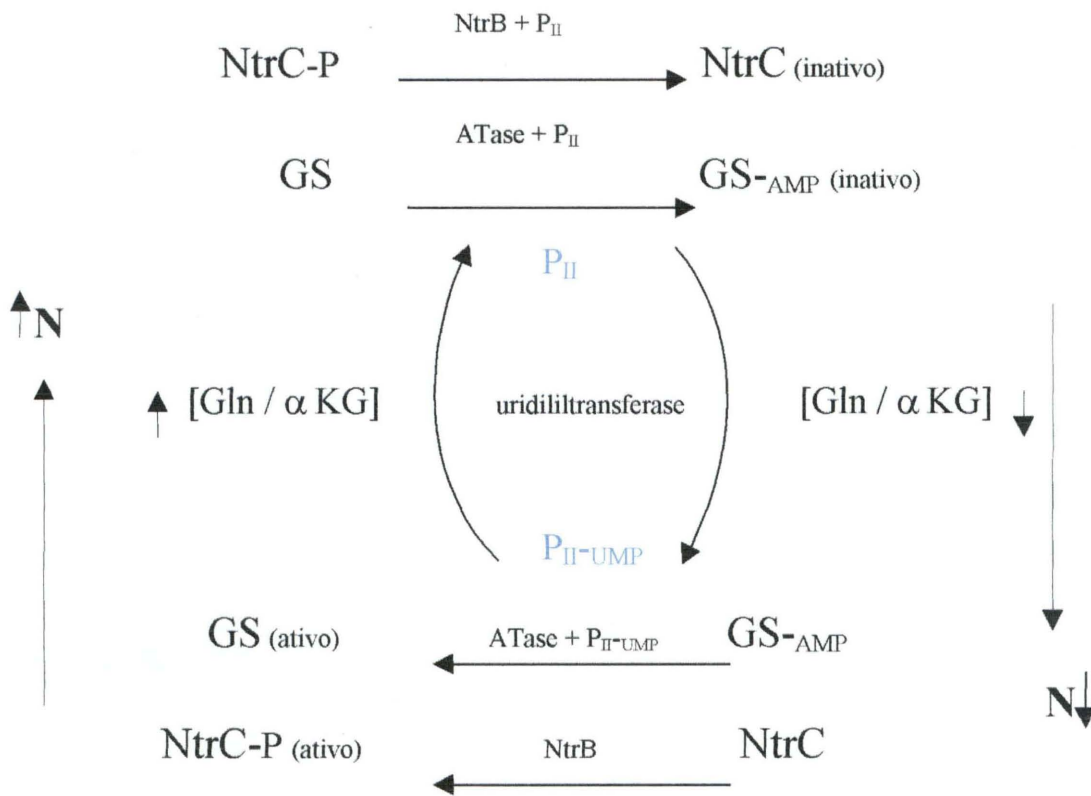


Figura 1: Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular (adaptado de HOTEL & MERRICK, 1989 por MACHADO *et al.*, 1995).

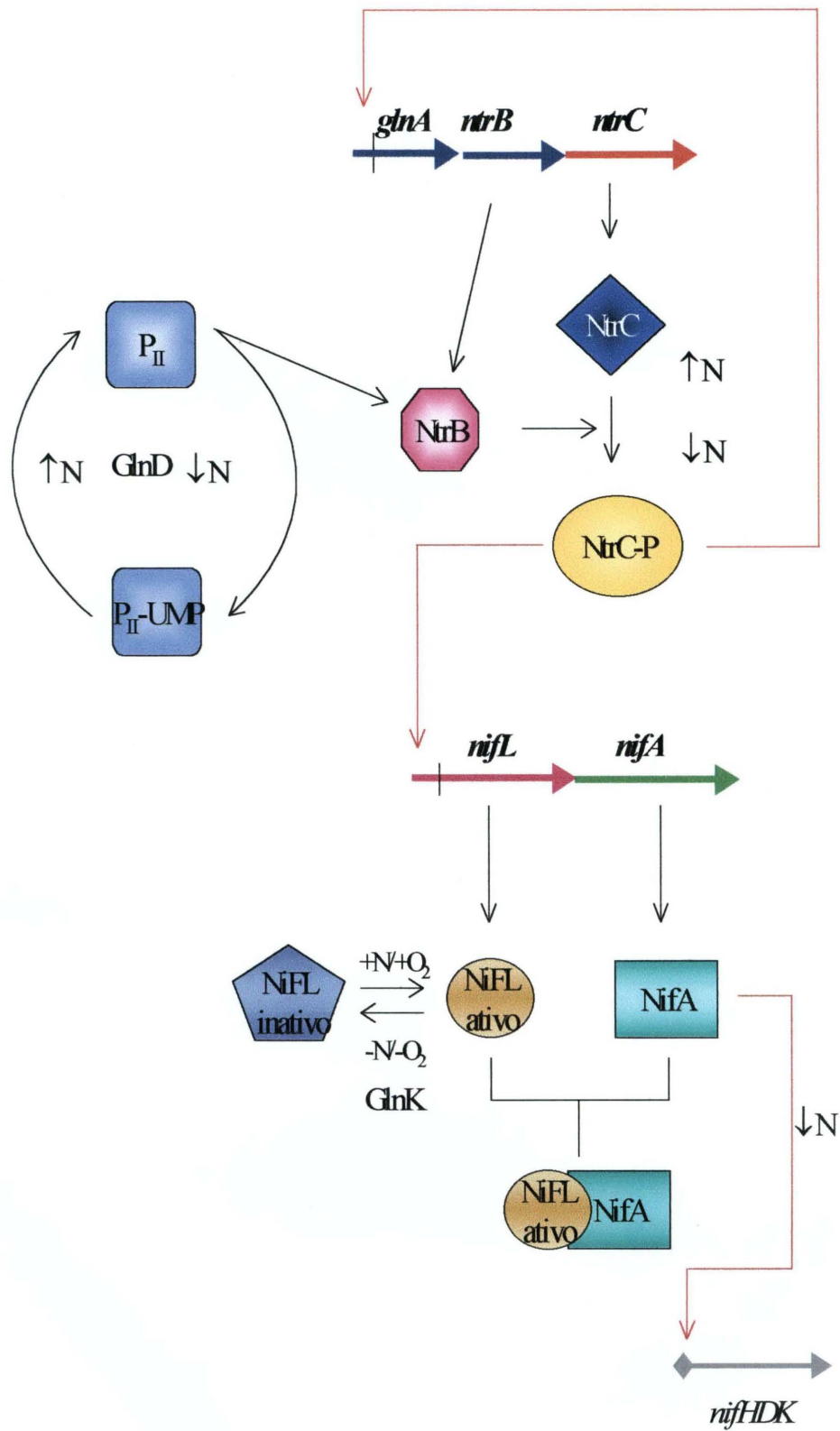


Figura 2: Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr* em *k. pneumoniae* (FISCHER, 1994).

1.6. Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*

A expressão dos genes do controle do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense*, como em outros diazotrofos, está sob o controle de fatores ambientais como fonte de nitrogênio e concentração de oxigênio (DOBEREINER & PEDROSA, 1987).

Análise da região promotora do gene *nifA* de *A. brasilense* sugerem que a sua transcrição, embora estimulada na ausência de amônia, é independente de NtrC (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1991, 1993). É possível que a proteína NtrX, uma análoga da NtrC, participe na regulação da expressão do gene *nifA*, como ocorre em *A. caulinodans* (PAWLOWSKI *et al.*, 1991; STIGTER *et al.*, 1993) Além disso, outros mecanismos de regulação do promotor *nifA* de *A. brasilense* podem estar envolvidos. A caracterização da região promotora do gene *nifA* de *A. brasilense* por FADEL-PICHETH (1999) indicam um promotor do tipo σ^{70} como provável promotor do gene *nifA* e que a repressão máxima deste gene depende do efeito combinado entre amônio e oxigênio.

Em *A. brasilense* não foi identificado gene homólogo a *nifL*, semelhante ao que ocorre com *H. seropedicae* e rizobia. Nestes organismos, NifA apresenta-se sensível a oxigênio, aparentemente, devido a um motivo que contem cisteínas. Nas proteínas NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, o sensoramento dos níveis de amônia parece envolver o domínio N-terminal. Em 1996, ARSENE *et al* sugeriram que a proteína PII talvez esteja envolvida neste processo. Em *A. brasilense*, a proteína PII é requerida para modulação da atividade de NifA em respostas a mudanças nos níveis de nitrogênio intracelular (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993, 1996) e não é essencial no processo de adenililação reversível da GS (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

Enquanto os genes *glnB* e *rpoN* são essenciais para a fixação do nitrogênio em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; MILCAMPES *et al.*, 1996), mutantes *ntrB*, e *ntrC* possuem um fenótipo Nif⁺, indicativo de outra diferença na regulação da fixação neste microrganismo (LIANG *et al.*, 1993).

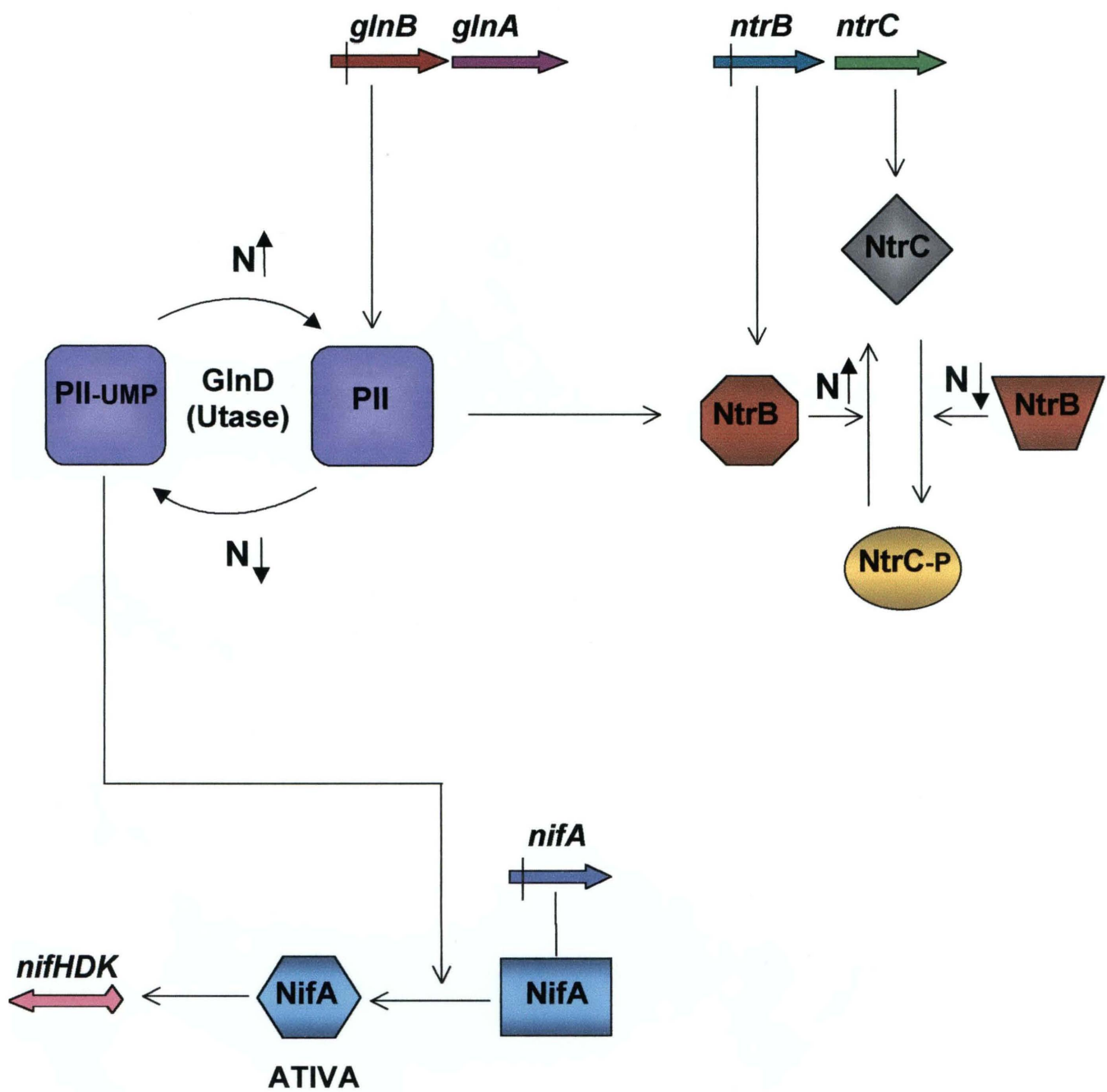


Figura 3: Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr* em *A. brasilense*

1.7. Proteínas PII

O gene estrutural da proteína PII, *glnB*, foi clonado e sequenciado inicialmente em *E. coli* (SON & RHEE, 1987) e *K. pneumoniae* (HOLTEL & MERRICK, 1988) e previsto codificar um polipeptídeo de 12,4 kDa. Este gene é bem conservado entre os organismos, sendo que, um total de 33 genes prováveis codificadores de membros da família PII foram sequenciados (citado em NINFA *et al.*, 2000). Estes genes codificam para peptídeos que possuem um resíduo de tirosina conservado no sítio de uridililação (resíduo de tirosina 51 – Tyr-51) e alguns parecem ser funcionalmente homólogos as proteínas PII de enterobactérias (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Um dos genes expressos a nível secundário na cascata de regulação do metabolismo de nitrogênio em *E. coli* é o gene *glnK*, que codifica para a proteína GlnK (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996), uma paróloga de PII. GlnK parece estar especificamente designada em funcionar sob condições limitantes de nitrogênio e pode interagir com as proteínas NtrB e ATase (ATIKINSON & NINFA, 1998; ATIKINSON & NINFA, 1999). Em *K. pneumoniae* a proteína GlnK regula a atividade das proteínas NifA ou NifL (HE *et al.*, 1998; JACK *et al.*, 1999)

A proteína PII de *Azospirillum brasilense* é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio. Esta proteína difere em função das proteínas PII clássicas de enterobactérias.

Embora apresente alta similaridade, estudos fisiológicos indicam que a proteína GlnZ (PZ), uma paróloga de GlnB em *A. brasilense*, apresenta funções diferentes desta (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Mutantes *glnB* apresentam fenótipo *nif*⁻ enquanto mutantes *glnZ* apresenta um aumento no transporte de amônia em relação à bactéria selvagem (DE ZAMAROCZY, 1998).

2. OBJETIVOS

Considerando o fato da proteína PII (GlnB) exercer um papel fundamental na regulação da fixação biológica do nitrogênio e sabendo-se que a proteína PII de *A. brasilense* aparentemente apresenta características diferente das demais proteínas PII, o seu estudo permitiria a obtenção de maiores informações sobre a regulação da fixação de nitrogênio neste microrganismo.

Desta forma os seguintes objetivos foram propostos.

- Subclonagem do gene *glnB* de *A. brasilense*;
- Expressão da proteína GlnB (PII) de *A. brasilense* em *E. coli*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídeos

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizadas neste trabalho estão nas tabelas 01 e 02.

Tabela 01: Estirpes de bactérias.

<i>Escherichia coli</i>	Genótipo/ fenótipo	Referência
BL21 (λ DE3) <i>pLysS</i>	<i>hsdS gal</i> (λ clts 857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>) produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs.	SAMBROOK <i>et al.</i> , (1989)
RB9065	<i>glnB2306 glnD99::Tn10, Tc^R</i> ;	BUENO <i>et al.</i> , (1985)
RB9065 (λ DE3)	RB9065 produtora de T7 RNA polimerase.	BENELLI, (1997)
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i> F' [<i>traD36 proAB⁺ lacIq lacZΔ M15Tn10(tet^R)</i>].	SAMBROOK <i>et al.</i> , (1989)
<i>A. brasilense</i>	Genótipo/ fenótipo	Referência
FP2	Sp7 (ATCC 29145) Nif ⁺ Nal ^R Sm ^R	PEDROSA e YATES (1984)

Tabela 02: Plasmídeos.

Plasmídeos	Genótipo/ fenótipo	Referência
pET28a	Gera proteína de fusão com uma sequência His-Tag. vetor de expressão/ promotor T7. Km ^R	Novagen
pT7-7	vetor de expressão/ promotor T7. Amp ^R	Biolabs
pTZ19R	vetor de expressão/ promotor <i>lac</i> . Amp ^R	Pharmacia
pLMA-MLV1	Contém o gene <i>glnB</i> clonado no vetor pET28a	Este trabalho
pLMA-2	Contém o gene <i>glnB</i> clonado no vetor pTZ19R	Este trabalho
pLMA-4	Contém o gene <i>glnB</i> clonado no vetor pT7-7	Este trabalho

3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura líquidos utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram: Luria-Both (LB) e Terrific-Broth (MANIATIS *et al.*, 1982).

O meio LB apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio sólido LA foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15g/L ao meio líquido LB.

O meio Terrific-Broth apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	24,0
Triptona	12,0
Glicerol	4,0
KH ₂ PO ₄	2,31
K ₂ HPO ₄	12,54

Para detecção de atividade de β -galactosidase em estirpes de *E. coli* foi utilizado meio sólido MacConkey. Este meio apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Peptona	17,0
Polipeptona	3,0
Lactose	10,0
Sais biliares	1,5

NaCl	5,0
Ágar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

O meio NFbHP foi utilizado para cultivo de *A. brasilense* (PEDROSA & YATES, 1984) e apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-1}$
Ácido Nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mmol/L. As soluções de fosfato e de cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio frio no momento do uso. Quando completo o meio de cultura apresentou pH 6,8 e foi denominado NFbHPN.

3.3 Condições de Cultivo

A estirpe de *Azospirillum brasilense* FP2 foi cultivada em meio líquido (NFbHPN), a temperatura de 30° C sob agitação (130 rpm).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido (LB) ou Terrific-Broth a temperatura de 37° C e agitação (130 rpm).

Para cultivo de bactérias em meio líquido foi sempre mantida a relação de 1/5 de volume de meio para o volume total do frasco. Esta relação foi utilizada para manutenção da aeração durante o crescimento

Estoques das estirpes de *E. coli* e *A. brasilense* foram preparados centrifugando-se 1 mL da cultura saturada por 1 minuto a 13.000 rpm. O sedimento de células obtido foi ressuspenso em 1ml de glicerol 50% e conservado a -20° C.

3.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados, as concentrações das soluções estoque e suas concentrações de uso estão na tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de antibióticos e concentrações utilizadas.

Antibióticos	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ácido nalidíxo (Nal)	20	5
Ampicilina (Amp)	100	200
Canamicina (Km)	50	50
Estreptomicina (Sm)	80	100
Tetraciclina (Tc)	10	10

As soluções estoques dos antibióticos foram preparadas em água destilada autoclavada, esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22 µm) e mantidas a -20° C, exceto a solução estoque de tetraciclina que foi preparada em etanol e armazenada na ausência de luz a -20° C.

3.5 Extração do DNA total de *Azospirillum brasilense*

Cinquenta mililitros de uma cultura saturada de *A. brasilense* em NFbHPN foi transferida para tubos de centrífugas e centrifugadas a 6.000 rpm, 4° C por 10 minutos. O sedimento de células foi lavado uma vez com 30 ml do tampão TES (Tris-HCl pH 8,0 50 mmol/L, NaCl 200 mmol/L) e ressuspenso em 20 mL de TES. À solução foi adicionado lisozima (100 µg/mL) e a suspensão incubada a 30° C por 30 minutos. Em seguida, SDS (dodecilsulfato de sódio) foi adicionado [para concentração final 1% (m/v)], a mistura incubada à temperatura ambiente por mais 5 minutos.

Após lise celular Pronase E (200 µg/mL) foi adicionada e o sistema homogeneizado por inversão seguida de incubação a 50° C por 3 horas.

Para a purificação do DNA foram procedidas quatro extrações com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o DNA gênomico de *A. brasilense* foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 300 µL de TE (Tris.HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM).

3.6 Separação eletroforética de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). A concentração de agarose variou de 0,7 a 1,5% (m/v), dependendo do tamanho do DNA a ser analisado.

O DNA foi visualizado em um transluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL). O perfil eletroforético foi registrado fotograficamente (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou utilizando um sistema de vídeo-documentação (GDS 5000).

3.7 Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão

A eletroforese para purificação de fragmentos de DNA foi conduzida em gel de agarose de baixo ponto de fusão em tampão TAE. As bandas de interesse foram cortadas, colocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e incubadas a 65° C por 5 minutos para a fusão da agarose. Após fusão da agarose foram adicionados Tris.HCl pH 8,0, (10 mmol/L), EDTA (1 mmol/L), NaCl (200 mmol/L) e 1 volume de fenol pH 8,0. Esta mistura foi agitada intensamente e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi separada e o DNA precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol a -20° C por 30 minutos. Após esse período a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos e em seguida o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em água.

3.8 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação da gene *glnB* foi feita utilizando sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (ERLICH, 1992). Os “primers” utilizados foram oligonucleotídeos sintetizados quimicamente em um Gene Assembler da Pharmacia. Estes “primers” alinham com a extremidade 5' (incluindo códon de início ATG) e com a extremidade 3' (incluindo códon de término TGA) do gene *glnB* de *A. brasilense*

Para reação de amplificação foram utilizados tampão Gibco PCR (Tris.HCl pH 8,4 20 mmol/L e KCl 50 mmol/L), dNTPs 0,2 mmol/L, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 20 ng de DNA total de *Azospirillum brasilense* e 1U de Taq DNA polimerase (Gibco) em um volume final de reação de 50 µL. Foram testados vários parâmetros para os ciclos de amplificação. O melhor resultado de amplificação foi obtido com o seguinte programa em um termociclador da Perkin Elmer 2400: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 25 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 30° C e 1 minuto a 72° C; 20 ciclos de 30 segundos a 95° C, a 30° C e a 72° C; 1 ciclo de 30 segundos a 95° C, 1 minuto a 30° C e 10 minutos a 72° C.

Para a reação de amplificação do gene *glnB* clonado no vetor pET28a foram usadas as mesmas condições, apenas substituindo o DNA total de *A. brasilense* pelo DNA do plasmídeo. Nestas condições, o melhor resultado de amplificação foi obtido com o seguinte programa: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 40° C e 1 minutos a 72° C.

3.9 Clivagem do DNA amplificado por PCR com enzimas de restrição

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I utilizando como tampão de restrição 2xOPA (20 mmol/L Tris-acetato pH 7,5, 20 mmol/L acetato de magnésio, 100 mmol/L acetato de potássio). Em um sistema de reação de 50 µL foram utilizados o fragmento do DNA amplificado por PCR a partir do DNA genômico e 1µL das enzimas *Bam*HI e *Nde*I. A reação foi incubada a 37° C por 5 horas.

Após incubação o DNA foi extraído com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e então precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 20 µL de água estéril.

3.10 Preparação do vetor de expressão para clonagem do produto de PCR

3.10.1 Extração do plasmídeo

A extração de vetores da bactéria *E. coli* estirpe XL1-Blue foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Quinze mililitros de cultura, crescidas em meio LB contendo os antibióticos adequados foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensão em 1mL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8,0 e EDTA 10 mmol/L) e a célula lisada pela adição de 1 mL de uma solução de SDS 1% e NaOH 0,2 mol/L. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com a adição de 2 mL de acetato de

potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos no gelo. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e o DNA plasmidial precipitado com a adição de 0,6 volume de isopropanol. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com 2 mL de etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 200 μ L de água. Foram adicionados 2 μ L de RNase (10mg/mL) e a amostra foi incubada 37° C por 50 minutos. Foram feitas extrações seguidas com fenol:clorofôrmio:álcool isoamílico (25:24:1), e o DNA plasmidial foi precipitado com 500 μ L de etanol absoluto. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 200 μ L de água.

3.10.2 Clivagem do plasmídeo com enzimas de restrição.

A digestão de vetores foi feita segundo protocolo descrito pelo fabricante da enzima. O sistema continha 50 μ L de DNA, em tampão One-Phor-All (OPA) 2x da Pharmacia (tris-acetato pH 7,5, 20 mmol/L, acetato de magnésio 20 mmol/L, acetato de potássio 10mmol/L). As endonucleases utilizadas foram 5 U de *Bam*HI, *Nde*I, *Xba*I e *Hind*III. Para o sistema com a enzima *Hind*III foi utilizado tampão One-Phor-All 1x. A reação foi incubada durante 3 horas a 37° C. As enzimas foram inativas a 85° C por 20 minutos.

3.11 Ligação do vetor ao fragmento de DNA amplificado.

O fragmento de DNA amplificado e digerido com enzimas de restrição foi ligado aos vetores pET28a, pT7-7 ou pTZ19R numa proporção molar de 5:1 (fragmento:vetor), na presença de tampão T4 DNA ligase 1x - Gibco (50 mmol/L Tris.HCl pH 7,6, 10 mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT, 0,5 mmol/L ATP e 5% de PEG 8000) e 0,5 U da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 18° C durante a noite.

3.12 Transformação bacteriana por eletroporação

3.12.1 Preparo de bactérias eletrocompetentes para eletroporação

Duzentos e cinqüenta mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 2,5 mL de uma cultura saturada de *E. coli*. A cultura foi crescida a 37° C sob agitação até atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,5 e 1,0. Após o crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 15 a 20 minutos e em seguida transferida para tubos estéreis e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. As células foram então lavadas uma vez com 250 mL e outra com 125 mL de água estéril, sendo em seguida lavadas com 5 mL de glicerol 10% (v/v). Após centrifugação o sedimento de células foi ressuspensado em 0,5 mL de glicerol 10% e a suspensão aliquoteada em tubos eppendorf (40 µL) e armazenada a -70° C por até 6 meses.

3.12.2 Transformação bacteriana

Para transformação bacteriana 1 µL da mistura da ligação vetor/DNA inserto foi adicionado a 40 µL da suspensão de células eletrocompetentes e incubado no gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1mL de meio LB e incubadas a 37° C, sob agitação por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

3.13 Purificação e análise dos plasmídeos recombinantes

A extração dos plasmídeos foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) da mesma maneira como descrito no item 3.10.1.

Os plasmídeos foram analisados por eletroforese em gel de agarose após digestão com enzimas de restrição. Alternativamente, o plasmídeo foi utilizado como molde numa reação de PCR utilizando “primers” que flanqueiam o inserto como descrito no item 3.8.

3.14 Sequenciamento do DNA

A reação de sequenciamento é baseada no método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), onde dideoxynucleotídeos são utilizados como terminadores de cadeia.

Foi utilizado um Sequenciador Automático de DNA (Perkin-Elmer) modelo ABI 310 que utiliza quatro cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia, eletroforese em coluna capilar e detecção a laser.

3.14.1 Preparo do material para sequenciamento

Um mililitro e meio de cultura, crescida durante a noite em meio TB, foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. O sedimento de células foi ressuspensão em 100 μ L de GET (50 mmol/L glicose, 25 mmol/L Tris.HCl pH 8,0, 10 mmol/L EDTA pH 8,0). A lise foi efetuada com 200 μ L de SDS 1% e NaOH 0,2 mol/L adicionados lentamente. 200 μ L de solução de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L foram acrescentados. Após homogeneização a mistura foi mantida por 10 minutos no gelo e em seguida foram acrescentados 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e o DNA plasmidial foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 80%, centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos, seco a vácuo e ressuspensão em 100 μ L de água. RNase (100 μ g/mL) foi acrescentada e a mistura incubada a 37° C por 1 hora. Terminado o tempo, foram feitas 2 extrações com 100 μ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto por 30 minutos no gelo, centrifugado, e o precipitado lavado com etanol 80%, seco a vácuo e

ressuspensão em 8 μL de H_2O estéril. A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese em agarose 0,7%, a pureza e a concentração do DNA foi verificada pela determinação na absorvância a 260 e 280 nm.

3.14.2 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento continha 1 μL do DNA (1-5 μg) purificado, 2,6 μL de tampão TACS (Perkin Elmer-Tris-Cl 106 mmol/L, MgCl_2 2,6 mol/L e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 26,6 mol/L), 6 μL de mistura para sequenciamento (Terminator Ready Rxn Mix-Perkin Elmer), 10 pmol do "primer" reverso e H_2O estéril para o volume final de 20 μL . A solução foi submetida a uma reação no termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo de 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 96° C por 30 segundos, 40° C por 30 segundos, 65° C por 6 minutos.

O produto da reação de sequenciamento foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL sendo então acrescentados 2,5 mol/L de acetato de amônio e 80 μL de etanol absoluto, e a mistura mantida no gelo por 15 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspensão em 15 μL de tampão TSR (Perkin Elmer). Esse material foi transferido para um tubo eppendorf de 200 μL e o DNA desnaturado (96° C por 3 minutos) e imediatamente transferido para o gelo, sendo então colocado no sequenciador automático de DNA Applied biosystems Modelo ABI 310.

3.14.3 Análise da sequência de DNA

A análise de comparação das seqüências obtidas após o sequenciamento foi feita utilizando o programa BLAST (GenBank/NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) ou Clustal (THOMPSON *et al.*, 1994).

3.15 Expressão da proteína GlnB em *E. coli*

Dez mililitros de meio LB foram inoculados com 0,1 mL de uma cultura crescida durante a noite. As células foram crescidas a 37° C sob agitação constante até atingirem uma D.O₆₀₀ de aproximadamente 0,2, 0,4 ou 1,0. Neste ponto foi adicionado IPTG nas concentrações final de 0,1 ou 0,5 mmol/L ou lactose 0,5% (p/v). As culturas foram incubadas sob agitação constante a 37° C por um período de 1 a 4 horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação (13.000 rpm por 1 minuto a 4° C). Para análise das proteínas o sedimento de células foi ressuspensão em 400 µL de tampão (50 mmol/L Tris.HCl pH 7,5, 100 mmol/L KCl) e as células lisadas por sonicação por 2 minutos em ciclos de 20 segundos seguidos de 15 segundos de intervalo no gelo utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma micropona. Após a lise, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos a 4° C. As frações solúveis e insolúveis foram separadas e analisadas através de separação eletroforética em géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) segundo LAEMMLI (1970).

3.16 Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Esse método é baseado na ligação do Coomassie Blue G-250 com proteína (BRADFORD, 1976). A reação se completa em cerca de 2 minutos e permanece estável durante 1 hora. O sistema de reação continha 1 mL do corante (solução de Bradford- comassie Brilliant Blue G250 (100mg/L), etanol 95% e ácido fosfórico 85%) e 100 μ L de amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância determinada a 595nm. A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência (padrão), preparada no mesmo tempo que as amostras. A sensibilidade deste método é de 1 a 10 μ g de proteína.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação do gene *glnB* *A. brasilense* por PCR a partir do seu DNA genômico.

Para a clonagem do gene *glnB* de *A. brasilense*, o DNA total deste microrganismo foi purificado e utilizado como molde numa reação de amplificação de DNA por PCR. Para isso, oligonucleotídeos foram sintetizados baseando-se na sequência do gene *glnB* depositada no banco de dados (acesso nº X51499). Esses oligonucleotídeos tiveram parte de sua sequência modificada para a introdução de sítios de restrição na posição 5' (Figura 4). O objetivo da introdução dos sítios de restrição foi facilitar a clonagem do produto de amplificação nos vetores de clonagem e expressão. A figura 5 mostra a sequência completa do gene *glnB* de *A. brasilense* de acordo com DE ZAMARACZY *et al* (1993), sendo indicada a região de alinhamento dos "primers" *AbglnB5'* e *AbglnB3'*.

Após amplificação, um produto de aproximadamente 350 pb foi obtido (Figura 6). O tamanho deste fragmento é comparável com o do gene *glnB* (369 pb) sugerindo amplificação do fragmento correto.

AbglnB5'

5' CTC GTA ^{NcoI} CCC ATG GGA ^{NdeI} CAT ATG AAG AAG ATC GAA 3'

AbglnB3'

5' TGG TCG ^{BamHI} GGA TCC CGG GAC GCG ATC AGA 3'

Figura 4: “Primers” construídos para as regiões 5' e 3' do gene *glnB* de *A. brasilense*, com seus respectivos sítios de restrições.

AbglnB5'

→

atg a a g a a g a t c g a a g c c a t c a t t a a g c c g t t c a a a c t c g a c g a a g t g a
 a g g a a g c c c t t c a c g a a g t c g g c a t c a a g g g c a t c a c c g t c a c c g a g g c
 c a a g g g c t t c g g c c g t c a g a a g g g g c a c a c c g a g c t g t a c c g c g g c g c g
 g a g t a t g t g g t c g a c t t c c t g c c g a a g g t g a a g a t c g a g g t g g t g a t g g a g
 g a c t c c c t g g t g g a g c g g g c g a t c g a g g c g a t c c a g c a g g c c g c c c a c a
 c c g g c c g c a t c g g c g a c g g c a a g a t c t t c g t c a c c c c c g t g g a a g a a g t t
 g t c c g c a t c c g g a c c g g c g a g a a g g g a g g c g a c g c g a t c t g a t c g c g t c
 c c g a g a a c c ← *AbglnB3'*

Figura 05: Alinhamento dos “primers” *AbglnB5'* e *AbglnB3'* com o gene *glnB* de *A. brasilense*, mostrando a região que foi amplificada por PCR. ATG corresponde ao códon de início e TGA o de término de tradução. As setas indicam o sentido de extensão a partir do anelamento dos “primers”

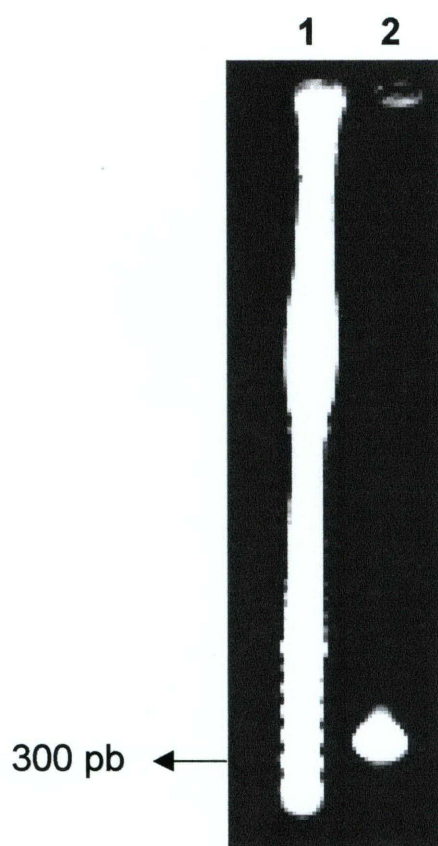


Figura 6: Eletroforese do produto de amplificação de DNA genômico de *A. brasilense* utilizando os “primers” específicos *AbgInB* 3’e 5’.

Linha 1 – Marcador de massa molecular 100 pb ladder (Pharmacia).; linha 2 – 5 μ L da reação de PCR.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5%, utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio.

4.2 Construção de plasmídeos recombinantes contendo o gene *glnB* de *A. brasilense*.

O fragmento obtido na reação de PCR foi digerido com *NdeI* e *BamHI*, ligado no vetor pET-28a (Apêndice 2) e o produto de ligação transformado em *E. coli* XL1-Blue. Após seleção das bactérias transformantes, plasmídeos foram isolados e analisados para presença do inserto. Para tanto foram utilizadas reações de PCR a fim de amplificar a região inserida no vetor. Os “primers” utilizados foram T7 promoter e T7 terminator (Pharmacia) que anelam com as regiões do vetor que flanqueiam o sítio de policlonagem. A figura 7 mostra que com o plasmídeo recombinante houve a amplificação de um fragmento de aproximadamente 550 pb indicando que o produto de PCR, *glnB*, foi introduzido no vetor pET-28a. O controle utilizando o vetor pET-28a amplificou a região de policlonagem, correspondendo a cerca de 200 pb. O plasmídeo recombinante foi denominado pLMA-MLV1. Na figura 8 é possível visualizar um esquema da clonagem do inserto no vetor pET-28a. O plasmídeo pLMA-MLV1 foi utilizado para expressão da proteína GlnB ligado a uma sequência contendo histidina (Histag)

Para facilitar o sequenciamento o inserto do pLMA-MLV1 foi subclonado no vetor pTZ19R (Apêndice 1) como um fragmento *XbaI-HindIII* produzindo o plasmídeo pLMA-2.

O mesmo fragmento obtido na reação de PCR, também foi clonado no vetor pT7-7 (Apêndice 3) como um fragmento *NdeI* e *BamHI*. Esta construção foi denominada pLMA-4. A figura 9 mostra o perfil de restrição após digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Como é possível notar o plasmídeo pLMA-4 possui um inserto de aproximadamente 350 pb indicando que o produto de PCR foi introduzido no vetor pT7-7. Este fragmento está ausente no vetor pT7-7 cortado com as mesmas enzimas de restrição. O vetor pLMA-4 foi utilizado para expressão da proteína PII na sua forma nativa.

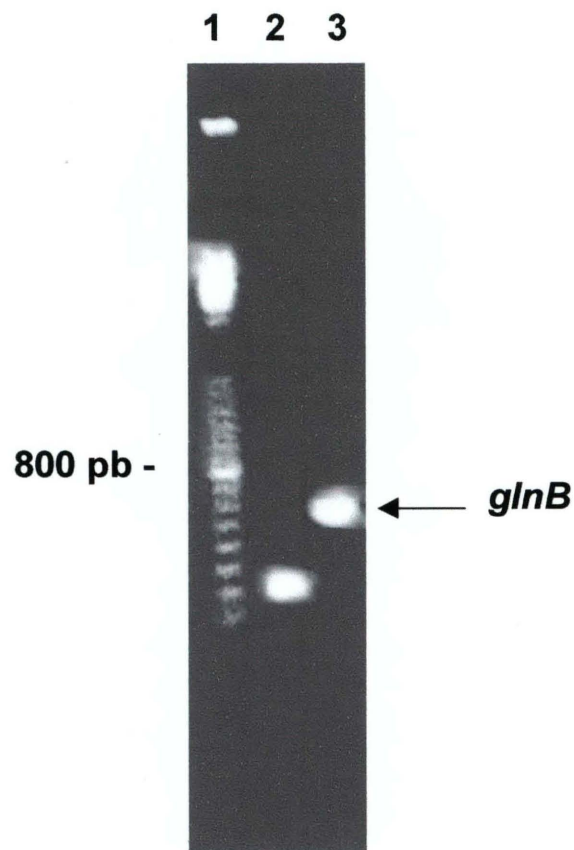


Figura 7: Reação de amplificação do plasmídeo pLMA-MLV1 por PCR da região de policlonagem do clone e do controle pET-28a, a partir de “Primers” 3’ e 5’ do vetor pET-28a.

Linha 1 – Marcador de massa molecular 100 bp Ladder (Pharmacia); linha 2 – produto de amplificação do vetor pET-28a; linha 3 – produto de amplificação do plasmídeo pLMA-MLV1.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio.

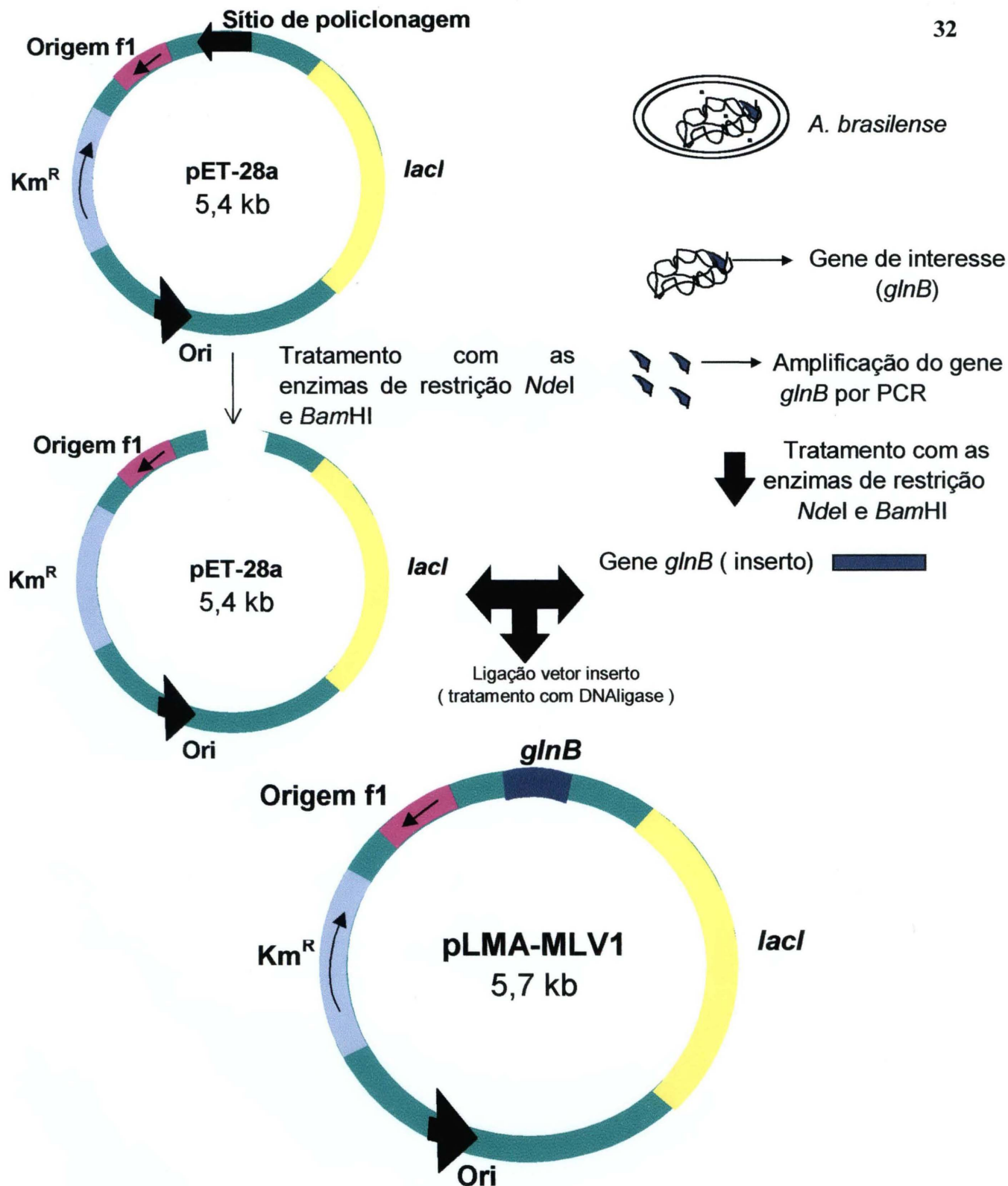


Figura 8: Esquema do plasmídeo pLMA-MLV1

O plasmídeo pLMA-MLV1 corresponde ao vetor pET-28a (apêndice 1) contendo um fragmento de aproximadamente 350 pb correspondente ao gene *glnB* de *A. brasilense*. Esse fragmento está clonado entre os sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* do vetor.



Figura 9: Perfil de reação de restrição do plasmídeo pLMA-4 e do controle pT7-7 cortados com as enzimas *NdeI* *Bam*HI

Linha 1 – Marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Pharmacia); linha 2 – padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pT7-7 com as enzimas *NdeI* e *Bam*HI; linha 3 – padrão eletroforético da reação de restrição do plasmídeo pLMA-4 com as enzimas *NdeI* e *Bam*HI.

Eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio.

4.3 Sequenciamento do gene *glnB* de *A. brasilense* a partir do produto de PCR clonado nos vetores de expressão e sua comparação com banco de dados.

O inserto do plasmídeo pLMA-2 (vetor pTZ19R) foi sequenciado e a sequência obtida foi comparada com o banco de dados GENBANK (Figura 10). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se “primer” Reverso que anela especificamente ao vetor pTZ19R (Apêndice 1). A sequência obtida foi idêntica aquela depositada no banco de dados, confirmando que o produto clonado no vetor pTZ19R corresponde ao gene *glnB* de *A. brasilense*.

O inserto dos plasmídeos pLMA-MLV1 e pLMA-4 também foi sequenciado utilizando para tanto, oligonucleotídeos para cada vetor de expressão. Os plasmídeos recombinantes não apresentaram modificações quanto ao gene *glnB* clonado.

```

Query: 1  tcagatcgcgctcgccctcccttctcgccggtccggatgcggaacaacttcttccacgggggt 60
          |
Sbjct:704 tcagatcgcgctcgccctcccttctcgccggtccggatgcggaacaacttcttccacgggggt 645

Query: 61  gacgaagatcttgccgctgccgatgcgccgggtgtggcgccctgctggatcgccctgat 120
          |
Sbjct:644 gacgaagatcttgccgctgccgatgcgccgggtgtggcgccctgctggatcgccctgat 585

Query:121  cgcccgtccaccaggagtcctccatcaccacctcgatcttcaccttcggcaggaagtc 180
          |
Sbjct:584 cgcccgtccaccaggagtcctccatcaccacctcgatcttcaccttcggcaggaagtc 525

Query:181  gaccacatactccgcgccggtacagctcgggtgtgcccttctgacggccgaagccctt 240
          |
Sbjct:524 gaccacatactccgcgccggtacagctcgggtgtgcccttctgacggccgaagccctt 465

Query:241  ggcctcggtgacggtgatgcccttgatgccgacttcgtgaagggttccttcacttcgtc 299
          |
Sbjct:464 ggcctcggtgacggtgatgcccttgatgccgacttcgtgaagggttccttcacttcgtc 405

```

```
Query:300 gagtttgaacggcttaatgatggcttcgatcttcttcat 339
          |||
Sbjct:404 gagtttgaacggcttaatgatggcttcgatcttcttcat 366
```

Figura 10: Resultado da comparação da seqüência obtida do produto de PCR com banco de dados a nível de nucleotídeos, utilizando o programa BLAST Search (GenBank/NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

“Query”, refere-se a seqüência submetida ao banco de dados e “Sbjct”, refere-se a seqüência depositada no banco de dados (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996).

A seqüência apresentada corresponde a fita complementar.

Representados em azul estão os códons de início (cat, na fita complementar) e término (tca, na fita complementar) de tradução.

4.4 Superexpressão da proteína PII-His.

O plasmídeo pLMA-MLV1 contendo o gene *glnB* de *A. brasilense* clonado no vetor pET-28a foi utilizado para superexpressar a proteína GlnB (PII) ligada a sua porção N-terminal um oligopeptídeo que inclui seis resíduos de histidina. Esta proteína será indicada neste trabalho como PII-His. A presença dos resíduos de histidina facilita a purificação da proteína de fusão pela utilização de cromatografia de afinidade numa coluna contendo metal de transição.

A expressão da proteína PII-His a partir do vetor pET-28a ocorre via promotor do fago T7. Desse forma, para que ocorra a expressão, é necessário que a bactéria hospedeira produza a RNA polimerase do fago T7. A linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* na presença de um indutor, como IPTG ou lactose, é capaz de expressar esta enzima. Assim na presença de indutor a T7 RNA polimerase é sintetizada e transcreve com alta eficiência a partir do promotor T7 presente no vetor pET-28a e situação semelhante também ocorre para o vetor pT7-7.

Inicialmente vários ensaios foram realizados para determinar as condições ótimas de indução para a proteína PII-His. Entre os parâmetros analisados estão indutor, IPTG ou lactose, concentração do indutor e tempo de indução. A figura 11 mostra que *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* contendo o plasmídeo pLMA-MLV1 superexpressa um proteína de aproximadamente 15 kDa, que não está presente no extrato celular dos transformantes contendo somente o vetor pET-28a. Esta proteína superexpressa corresponde a proteína de fusão PII-His (14,5 kDa) e apresenta-se predominantemente na fração solúvel do extrato de células. Estes resultados mostram que o clone obtido é capaz de superexpressar a proteína PII fundida a cauda de histidinas.

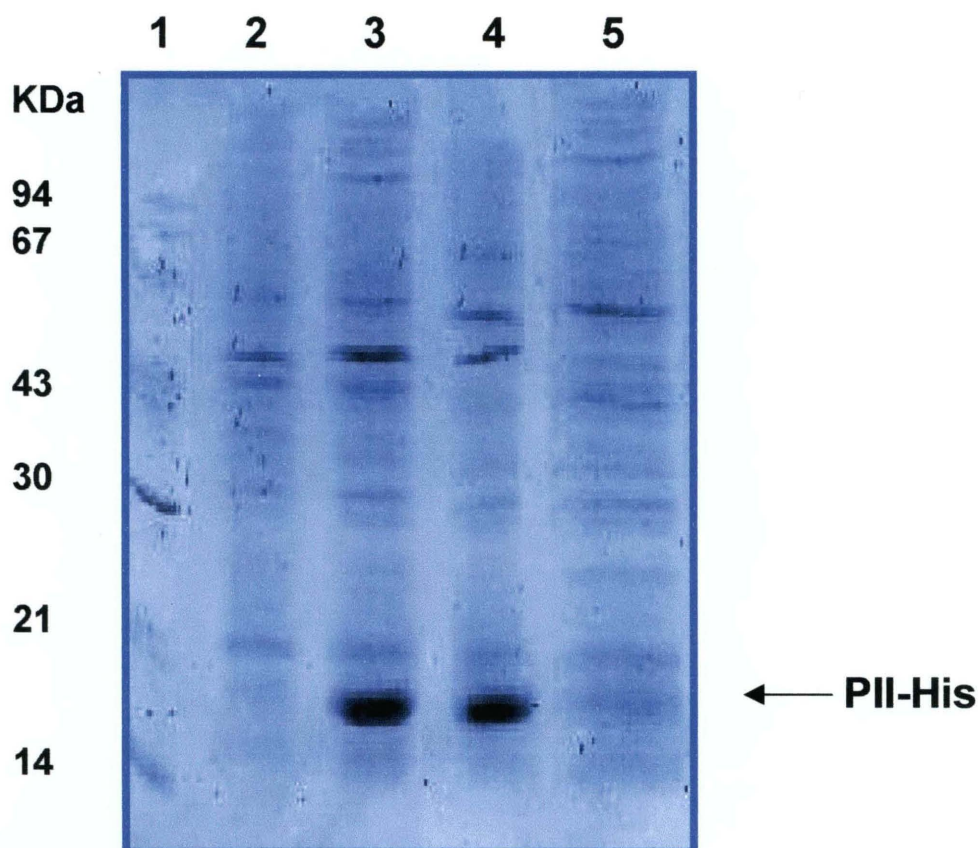


FIGURA 11: Padrão eletroforético da proteína PII-His de *A. brasilense* a partir do vetor pET-28a em gel de poliacrilamida desnaturante.

Linha 1 – Marcadores de massa molecular em kDa; linha 2 – extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pET-28a e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L; linha 3 – extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLMA-MLV1 e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L; linha 4 – igual a linha 3 porém a fração solúvel do extrato celular; linha 5 – igual a linha 3 porém fração insolúvel do extrato celular.

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida na presença de SDS. A seta indica a proteína superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

4.5 Superexpressão da proteína PII nativa.

O gene *glnB* foi clonado no vetor pT7-7 gerando o plasmídeo pLMA-4 com a finalidade de expressar a proteína PII na sua forma nativa ou seja, sem a presença do oligopeptídeo contendo histidina. Este vetor, assim como o vetor pET-28a, também expressa proteína a partir do promotor do fago T7.

Para análise da expressão da proteína PII, estirpes de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* e RB9065 (DE3) (*glnD*⁻ e *glnB*⁻) foram transformadas com os plasmídeos pLMA-4 e pT7-7 e induzidas em diferentes condições. As estirpes de *E. coli* RB9065 (DE3) foram utilizadas com a finalidade de expressar somente o gene *glnB* de *A. brasilense* clonado no vetor de expressão. Considerando que esta estirpe é *glnD*⁻ e *glnB*⁻, a proteína superexpressa não poderá ser modificada via GlnD ou formar heterotrímeros com GlnB de *E. coli*. Entre os parâmetros analisados para indução de GlnB estão indutor (IPTG ou lactose), concentração do indutor e tempo de indução (Figura 12 e 13). Amostras das frações solúveis e insolúveis do extrato celular foram analisadas. A proteína PII encontrava-se principalmente na fração solúvel do extrato celular e apresentou um perfil de migração esperado, com uma taxa de migração de aproximadamente 13 Kda, correspondente ao tamanho da proteína PII nativa (12,5 kDa).

Nossos resultados mostram que o plasmídeo pLMA-MLV1 e pLMA-4 são capazes de expressar a proteína PII de *A. brasilense* em *E. coli*. Comparativamente a presença do oligonucleotídeo contendo a sequência HisTag torna a proteína PII-His maior que a proteína PII. A diferença de massa molecular pode ser visualizada na figura 14.

A clonagem do gene *glnB* de *A. brasilense* permitiu a expressão da proteína PII em *E. coli*. O nível de expressão obtido foi adequado comparando a outras proteínas utilizando os mesmos vetores (MONTEIRO *et al.*, 1999). Outro aspecto importante é que em ambas formas, nativa ou como proteína de fusão, PII foi superexpressa numa forma solúvel, o que facilitará a sua purificação e caracterização.

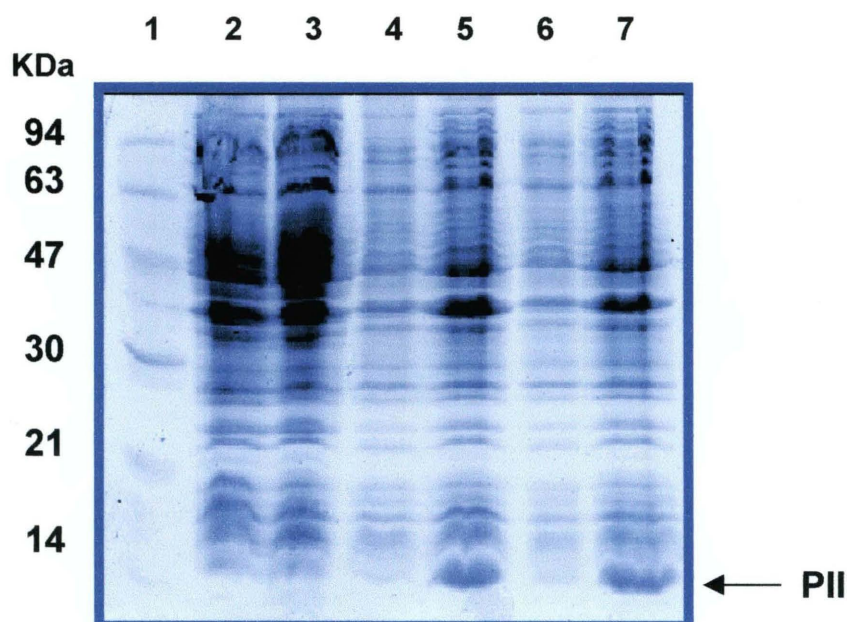


Figura 12: Padrão eletroforético da proteína PII de *A. brasilense* a partir do vetor pT7-7 em gel de poliacrilamida desnaturante.

Linha 1 – Marcadores de massa molecular em kDa; linha 2 – extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com vetor pT7-7 e induzidas por 1 hora com IPTG 0,5 mmol/L; linha 3 — extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLMA-4 e induzidas por 1 hora com IPTG 0,5 mmol/L; linha 4 — igual a linha 2, porém induzido por 4 horas com IPTG; linha 5 — igual a linha 3, porém induzido por 4 horas com IPTG; linha 6 — Bactérias transformadas com plasmídeo pT7-7 e induzidas por 4 horas com lactose 0,5%; linha 7 — Bactérias transformadas com plasmídeo pLMA-4 e induzidas por 4 horas com lactose.

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida na presença de SDS. A seta indica a proteína superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

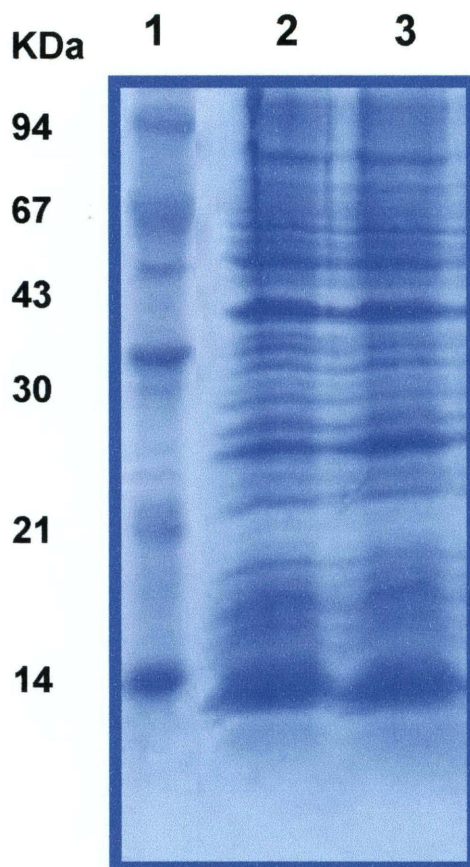


Figura 13: Padrão eletroforético da proteína PII nativa de *A. brasilense* a partir do vetor pT7-7 na estirpe de *E. coli*, *glnB*⁻ e *glnD*⁻, RB9065 (DE3) em gel de poliacrilamida desnaturante.

Linha 1 – Marcadores de massa molecular em kDa; linha 2 – extrato celular da fração solúvel de bactérias RB9065 (DE3) transformadas com plasmídeo pLMA-4 e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L a partir de uma D.O₆₀₀ igual a 0,2; linha 3 — extrato celular da fração solúvel de bactérias RB9065 (DE3) transformadas com o plasmídeo pLMA-4 e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L a partir de uma D.O₆₀₀ igual a 0,4.

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida na presença de SDS. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

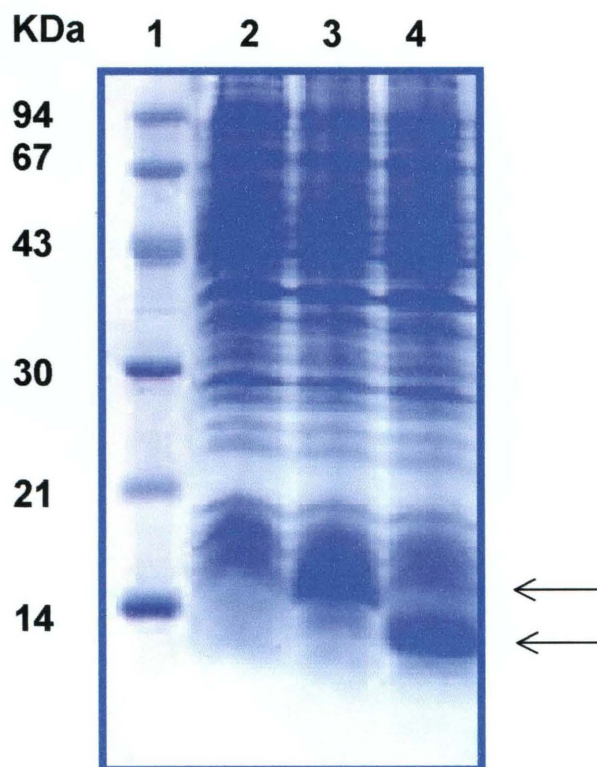


Figura14: Comparação do padrão eletroforético das proteínas PII nativa e PII-His de *A. brasilense* a partir dos vetores pET28a e pT7-7, respectivamente

Linha 1 – Marcadores de massa molecular em kDa; linha 2 –extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o vetor pT7-7; linha 3 —extratos celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLMA-MLV1; linha 4 —extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLMA-4.

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida na presença de SDS As setas indicam a proteína superexpressa. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

5. CONCLUSÕES

- O gene *glnB* de *A. brasilense* foi amplificado por PCR a partir do genoma do microrganismo e subclonado em vetores de expressão.
- Plasmídeo pLMA-4 expressa uma proteína com taxa de migração de aproximadamente 13 kDa como determinado por SDS-PAGE, que corresponde a massa molecular calculada do monômero da proteína PII de *A. brasilense*.
- Plasmídeo pLMA-MLV1 expressa uma proteína com taxa de migração de 15 kDa determinado por SDS-PAGE, que corresponde a massa molecular calculada do monômero da proteína PII de *A. brasilense* ligado à sequência HisTag (PII His-Tag).
- Ambas as formas da proteína PII de *A. brasilense* foram superexpressas e encontradas na fração solúvel dos extratos protéicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res., v. 25, p. 3389-3402.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. (1996) Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. J Bacteriol., v. 178, p.4830-4838.
- ATIKINSON M. R.; NINFA, A. J. (1998) Role of GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherivhia coli*. Mol Microbiol., v. 29, p. 431-447.
- ATIKINSON M. R.; NINFA, A. J (1999) Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., v. 32, p.301-313.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. Intl. J. Sys. Bact., v.36, p.86-93.
- BENELLI, E.M. (1997) Análise funcional e estrutural da proteína PII, controladora da fixação de nitrogênio em *Herbapirillum seropedicae*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Brazil, 200p.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem., v.72, p.248-254

BROWN, M.S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E.R. (1971) Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII -regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA, v. 68, p. 2949-2953.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. (1985) Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v. 164, p. 816-822.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Molecular characterization of new diazotroph genotypes from *Musa* spp. and *Ananas* spp. In: 12TH INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION. (1999 : Foz Do Iguaçu). Book of Abstracts... Foz do Iguaçu, Paraná, Br, 1999. p. 118.

DEAN, D.R.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. (1993) Nitrogenase metallocluster: structure, organization, and synthesis. J. Bacteriol., v. 175, p. 6737-6744.

DEKHIL, B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L., I. (1997) Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobilis* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis*

subsp. *paroensis* to new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas paroensis* nov. Syst. Appl. Microbiol., v. 20, p. 72-77.

DE MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. (1994) Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., v.243, p. 796-798.

DE ZAMAROCZY, M. (1998) structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. Mol. Microbol., v. 29, p. 449-463.

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. (1989) Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes form nitrogenase (*nifHDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp 7. Mol. Gen. Genet., v. 220, p. 88-94.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. (1993) Functional Organization of the *glnB-glnA* Cluster of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., v. 175, p. 2507-2515.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, (1996) C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII protein in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., Washington, v. 178, p. 4143-4149.

DÖBEREINER, J. (1991) The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. The Prokaryotes. 2.ed. vol III., p.2236-3353, Springer-Verlag.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. (1976) Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In NEWTON, W. E. & NYMAN, C. J. eds. Proc. of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation. v.2. Pullman, Washington Univ. Press. p.518-38.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. (1987) Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers/Springer-Verlag.

EADY, R. R. (1986) Enzymology in free-living diazotrophs. In BROUGHTON, W. J.; PUHLER, S. (eds.) Nitrogen Fixation. v.4., Clarendon Press. p. 1-49.

ECKERT, B.; BALLER-WEBER, O.; KIRCHOF, G.; HALBRITTER, A. ; STOFFEL, A.; HARTMANN, (1999) *Azospirillum doebereineriae* sp. Nov., a diazotrophic bacterium associated with *Miscanthus sinensis* 'Giganteus'. GenBank Número de acesso AJ238567.

ERLICH, H. A. (ed.) (1992). PCR Technology: Principles and applications for DNA amplifications – W. H. Freeman and Co., 246p.

FADEL-PICHETH, SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, O. F. (1999) Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. FEMS Microbiol. Lett., v. 179, p. 281-288.

- FANI, R.; BANDI, C.; BAZZICULUPO, M.; CECCHERINI, M. T.; FANCELI, S.; GALLORI, E., GERACE, L.; GRIFONI, A.; MICLAUS N.; DAMIANI, G. (1995) Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. FEMS Microbiol. Lett., v. 129, p. 195-200
- FISCHER, H-M. (1994) Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microbiol. Rev., v. 58, p. 352-386.
- GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.; BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. (1989) Identification of DNA regions homologous to nitrogen *nifE*, *nifUS*, and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* SP7. J. General Microbiol., v. 135, p. 1047-1059.
- GALIMAND, M.; VIEILLE, C.; PERROUD, B.; ONYECCHOA, I.; ELMERICH, C. (1988) Advances in genetics of *Azospirillum brasilense* Sp7: use of Tn5 mutagenesis for gene mapping and identification. In KLINGMULLER, W. (ed.) Azospirillum IV Genetics, Physiology, Ecology., Springer - Verlag. p.1-9.
- HARTMANN, A., FU, H. E BURRIS, R.H. (1986) Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. J. Bacteriol., v. 165 p. 864-70.
- HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. (1985) Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., v. 201, p. 492-498.

- HE, L.; SOUPENE, E., NINFA, A.; KUSTU, S. (1998) Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen limitation under nitrogen-limiting conditions. J. Bacteriol., v. 180, p. 6661-6667
- HOLGUIN, G.; PATTEN, C.; GLINK, B. R. (1999) Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol. Fertil. Soils, v. 29, p. 10-23.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; BERGY, D. (1993) Bergey's manual of determinative bacteriology 9^a ed. Lippincott, Williams & Williams, p. 39-57.
- HOLTEL, A.; MERRICK, M. (1988) Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. Mol. Gen. Genet., Berlin, v. 215, p. 134-138.
- HOTEL, A.; MERRICK, M. J. (1989) The *klebsiella pneumoniae* PII protein (*glnB* gene product) is not absolutely required for the nitrogen regulation and is not involved in NifL-mediated *nif* gene regulation. Mol. Gen. Genet., v. 217, p. 474-480.
- JACK, R.; DE ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M.; (1999) The signal transduction protein GlnK is required for NifL- dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. v. 181, p. 1156-1162.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. (1995) The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. J Biol Chem, v. 270, p. 17797-17807.
- KEENER, J.; KUSTU, S. (1988) Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles

of the conserved amino-terminal domain of NTRC. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 85, p. 4976-4980.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. Nature, v. 227, p. 680-685.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. (1991) Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol. Microbiol., v. 5, p. 2735-2744.

LIANG, Y.Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. (1993) Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense*. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. Mol. Gen. Genet., v. 240, p. 188-196.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. (1995) The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. Can. J. Microbiol., v.41, p.674-684.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (2000) Brock biology of microorganisms, Prentice-Hall.

MAGASANIK, B. (1989) Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. Biochimie, v. 71, p. 1005-1012

- MANIATS, T.; FRITSCH, E. F. e SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory. 545p.
- MEAD, D. A.; SZCZENA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. (1986) Single strand DNA "blue" T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Prot. Eng., v.1, p. 67-74.
- MERRICK, M. J. (1983) Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. EMBO J., v. 2, p. 39-44.
- MERRICK, M. J. (1988) Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In BOTHE, H.; DE BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. (eds.). Nitrogen Fixation Hundred Years After, Proc. 7th Intl. Cong. on Nitrogen Fixation. Koln (Cologne), Fischer. p.293-302.
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. (1995) Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev., v. 59, p. 604-622.
- MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, H.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. (1982) Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Mol.Gen.Genet., v.185, p.75-81
- MILCAMP, A.; DOMMELEN, A V.; STIGTER, J.; VANDERLEYDEN, (1996) Jos. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate

assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. Can. J. Microbiol., v. 42, p. 467-478.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. (1999) Use of lactose to induce expression of soluble NifA domains in *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol., v. 46, p. 1087-1090.

MORGENSTERN, E., OKON, Y. (1987) The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*. Arid Soil Res. Rehabilitation, v. 1, p. 115-127.

NINFA A. J.; ATKINSON M. R. (2000) PII signal transduction proteins. Trends in Microbiol., v. 8, p. 172-179.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News., v. 63, p. 366-370.

PASSAGLIA, L. M. P.; NUNES, C. P.; ZAHA, A.; SCHRANK, I. S. (1991) The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises gene H, gene D, gene K, and 353 bp orf and gene Y. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 24, p. 649-675.

- PATRIQUIN, D. G.; DÖBERREINER, J.; JAIN, D. K. (1983) Sites and processes of assimilation between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol., v. 29, p. 900-915.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M. G. (1984) Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. FEMS Microbiol. Lett., v. 55, p. 95-101.
- PLAZINSKI, J.; DART, P. J.; ROLFE, B. G. (1983) Plasmid visualization and *nif* gene localization in nitrogenfixing *Azospirillum* strains. J. Bacteriol., v. 155, p. 1429-1433.
- POSTGATE, J. R. (1982) The fundamentals of nitrogen fixation., Cambridge Univ. Press. 252p.
- PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DE BRUIJN, F. J. (1991) Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. Mol. Gen. Genet., n. 231, p. 124-138.
- SON, H. S.; RHEE, S. G. (1987) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. J. Biol. Chem., v. 262, p. 8690-8695.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R.;

ELMERICH, C. (1982) Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. Biochimie, v. 64, p. 495-502.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. Proc Natl Acad Sci USA, v. 82, p. 1979-1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977) Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, v. 74, p. 5463-5467.

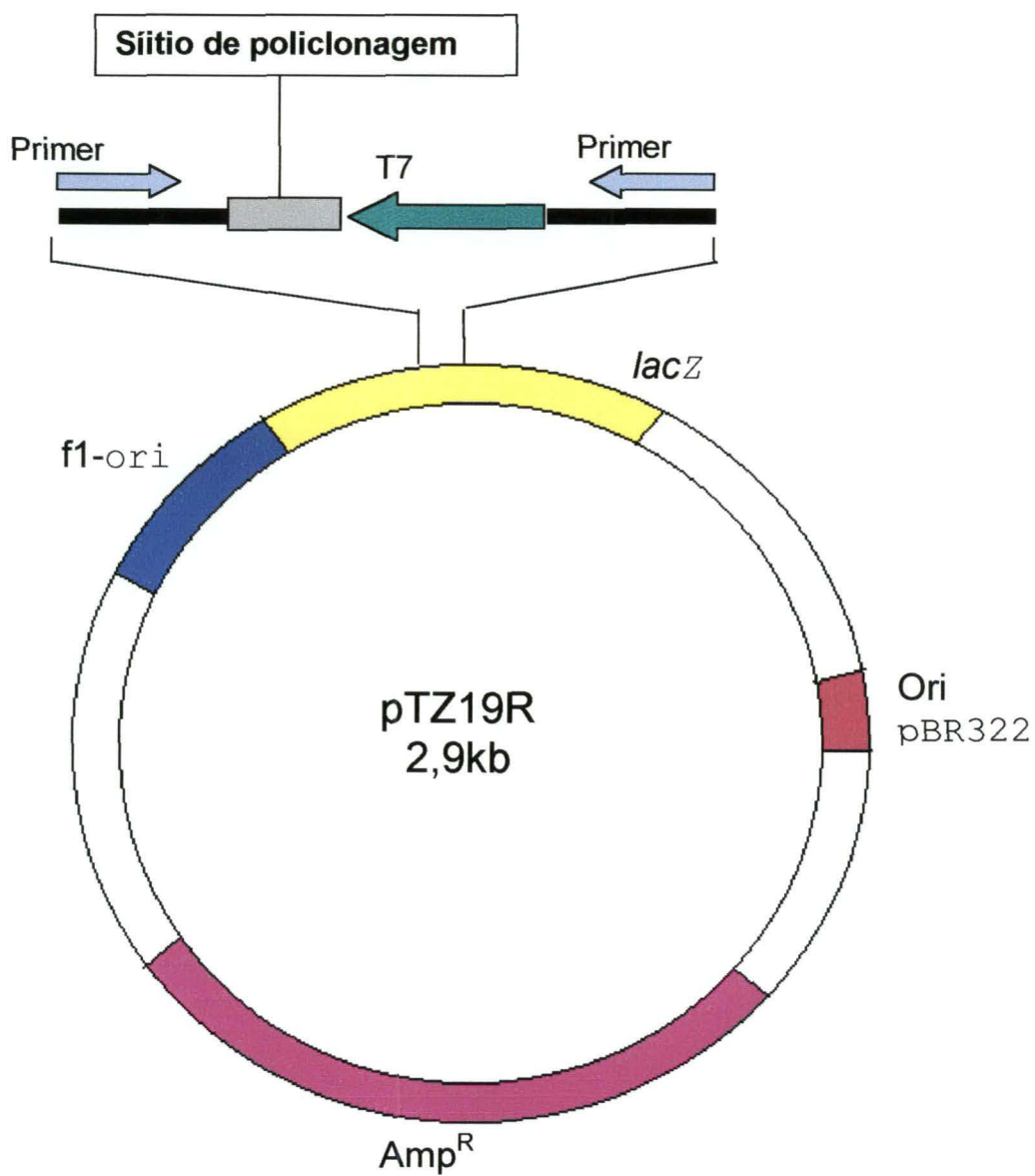
SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; DE ARAUJO, E. F.; SANTOS, D. S. (1987) Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the *nif* structural genes. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 20, p. 321-30.

SINGH, M.; TRIPATHI, A K.; KLINGMÜLLER, W. (1989) Identification of a regulatory *nifA* type gene and physiological mapping of cloned new *nif* regions of *Azospirillum brasilense*. Mol. Gen. Genet., v. 219, p. 235-240.

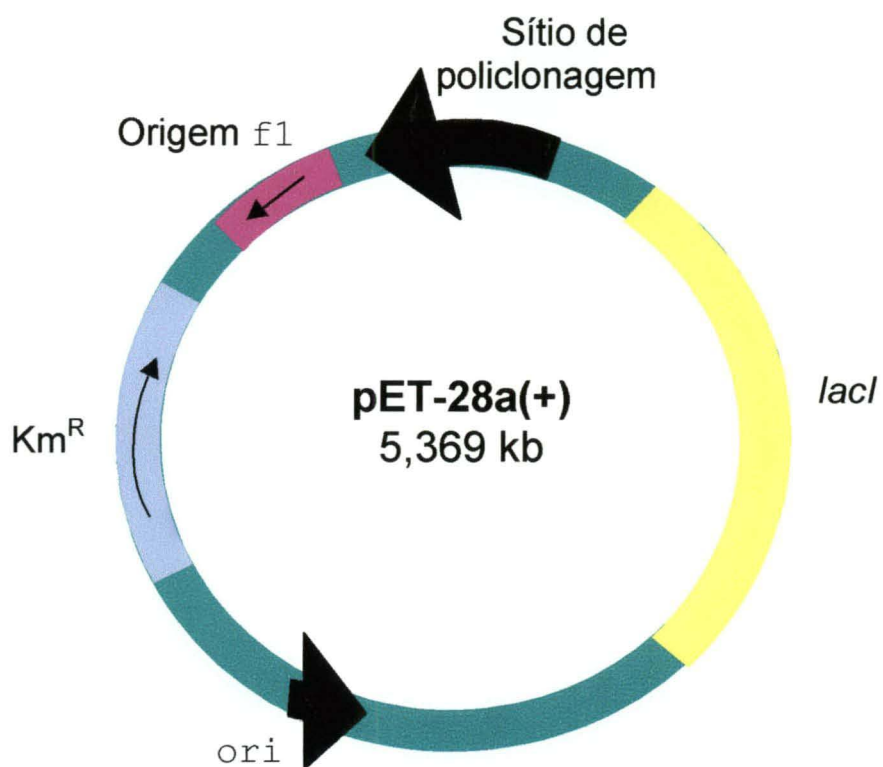
STIGTER, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; (1993) *Azorhizobium caulinodans* nitrogen fixation (*nif/fix*) gene regulation: mutagenesis of the *nifA* -24/-12 promoter element, characterization of a *ntrA* (*rpoN*) gene, and derivation of a model. MPMI, v. 6, p. 238-252.

- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. v. 22, p. 4673-4680.
- TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (1995) Microbiology na introduction. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. p. 664-673.
- VAN HEESWIJK, W.C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H.V. (1996) An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., v. 21, p. 133-146.
- WEIS S, V.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. (1992) Phosphorylation of nitrogen-regulator I (NRI) of *Escherichia coli* induces the strong cooperative binding to DNA essential for the activation of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 89, p. 5088-5092.
- WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A.K.; BUSTAMANE, C.; KUSTU, S. (1997) Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhance-binding protein. Science., v. 275, p. 1658-1661.
- YATES, M. G.(1992) The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. Biological nitrogen fixation. p. 685-735.

ZHANG Y.; BURRIS R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. (1997) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbilo. Letters., v. 152, p. 195-204.



APÊNDICE 1 - Esquema do vetor pTZ19R (MEAD *et al.*, 1986)



_____ **promotor T7** _____ **Operador *lac***
 AGATCTCGATCCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCG
 _____ **rbs** _____
GATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT
 _____ **His Tag** _____
ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGC
 _____ **T7 Tag** _____ **BamHI** _____
GCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATC
 _____ **NdeI** _____
CGAATTGCAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG

APÊNDICE 2 - Vetor de expressão pET28a (Novagen).

