

CAROLINA WEIGERT GALVÃO

SEQUENCIAMENTO E SUB-CLONAGEM DO GENE
recX* DE *Herbaspirillum seropedicae

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel no curso de Biologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Curitiba
1999

Orientadora:

Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Ao meu pai Franklin, à minha mãe Maria
Inês e aos meus irmãos Fer e Rafa.

“Mesmo que nossos projetos não tenham
se realizado inteiramente, temos que ser
generosos com nossos avanços e saber
que o sonho sempre será maior que
nossas conquistas”

Gikovate

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a professora Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens por me encaminhar e me guiar com muita paciência e confiança nesta longa e desafiadora experiência científica.

Aos professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e a Dra. Leda S. Chubatsu pela oportunidade de trabalhar no grupo de Fixação de Nitrogênio, pela atenção e contribuição despendida em todas as etapas de trabalho.

Aos professores Dr. Fábio Pedrosa e Marshall Geoffrey Yates pela credibilidade, confiança e estímulo.

A prof. Dra. Liu Un Rigo pelo auxílio e atenção durante as etapas de seqüenciamento.

Aos companheiros e amigos de sala Darlene, Marcos, Raquel pela ajuda, bagunça e descontração, e em especial ao Humberto e a Josiane pela preocupação, carinho e muitas dicas.

Aos meus grandes amigos Luciano e Andréa pela força, companheirismo e cumplicidade em todos os momentos.

Aos meus amiguinhos queridos Valter, Jú Inaba, Mariana, Luíza, Lilian, Ana e Fernando e pelas risadas, ajuda e muito carinho.

À mamãe Rose Adele pelo carinho e super proteção.

Aos amigos Léo, Gisele, Maria Lúcia, Jú Ramos, Lauren, Adriana, Eduardo e em especial as amigas Elaine, Rose Wassen e Fabiane pela disponibilidade e conselhos "em todas as áreas".

À Rose Prado e a dona Jú pela alegria e bom humor contagiantes.

À minha família, em especial ao meu pai, pelo incentivo, torcida, amor e críticas construtivas.

Aos meus companheirinhos de graduação como um todo, e em especial ao Adriano, pela descontração e amizade nestes quatro anos de caminhada juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Ciência e Tecnologia (PRONEX) e a FUNPAR pelo apoio financeiro.

Gostaria de agradecer, de maneira geral, a todos os companheiros de Laboratório pelo conhecimento compartilhado e pelo carinho despendido em todo esse tempo de trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	IX
Lista de abreviaturas	X
Resumo	XI
1 Introdução	01
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	03
2 Materiais e Método	05
2.1 Bactérias e plasmídeos.....	05
2.2 Meios de cultura.....	06
2.3 Antibióticos.....	07
2.4 Preparo da solução de RNase.....	07
2.5 Preparo das soluções de clorofórmio:álcool isoamílico e de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico	07
2.6 Condições de cultivo dos microrganismos	07
2.7 Manutenção das estirpes bacterianas e preparo dos pré-inóculos	07
2.8 Minipreparação de plasmídeos	08
2.9 Tratamento com RNase e Pós-RNase	09
2.10 Eletroforese.....	09
2.11 Amplificação do DNA para Reação de Seqüenciamento	10
2.12 Preparo do DNA para seqüenciamento	10
2.13 Seqüenciamento	10
2.14 Transformação bacteriana por eletroporação	11
2.14.1 Preparo de células competentes.....	11
2.14.2 Eletroporação.....	11
2.15 Clivagem do DNA por enzimas de restrição	11
2.16 Ligação	12
2.17 Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP)	12
2.18 PCR.....	13
2.19 Preparo dos vetores para clonagem do produto de PCR.....	13
2.19.1 Escolha dos vetores.....	13
2.19.2 Extração dos vetores.....	13
2.20 Purificação de plasmídeos pelo método rápido (Rapid prep).....	14
2.21 Purificação de fragmentos de PCR utilizando o Kit Qiaquick.....	14

3	Resultados e Discussão	15
3.1	Seqüenciamento do gene <i>recX</i>	15
3.2	Expressão da proteína RecX	18
	3.2.1 Síntese dos primers	18
	3.2.2 Determinação das condições ideais de PCR	18
	3.2.3 Amplificação e clonagem do fragmento de 0,5kb no vetor pTZ19R....	20
	3.2.4 Preparação dos vetores de expressão.....	20
4	Conclusões	34
5	Perspectivas	34
6	Bibliografia	35

LISTA DE FIGURAS

01	Modelo de regulação do Sistema SOS	22
02	Mapa de restrição do plasmídeo pBMR5	23
03	Seqüência de nucleotídeos do gene e <i>recX</i> e de sua respectiva proteína resultante	24
04	Alinhamento de seqüências de aminoácidos de proteínas análogas ao <i>RecX</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	25
05	Identificação de possíveis regiões codificadoras de proteínas pelo método de preferência posicional de bases	26
06	Desenho esquemático do plasmídeo pTZ19R	27
07	Desenho esquemático do plasmídeo pT7-7	28
08	Desenho esquemático do plasmídeo pET28a	29
09	Perfil eletroforético das reações de PCR testadas com diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio	30
10	Perfil eletroforético dos prováveis clones após "Rapid Prep"	31
11	Perfil eletroforético dos prováveis clones (pTZ19R:: <i>recX</i>) restritos com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Kpn</i> I em gel de ágar 1%	32
12	Perfil eletroforético dos prováveis clones (pTZ19R:: <i>recX</i>) restritos com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Kpn</i> I em gel de agarose 1%	33

LISTA DE TABELAS

01	Estirpes de bactérias e plasmídeos	05
-----------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

μ g	micrograma
μ L	microlitro
Amp	ampicilina
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
D.O.	densidade óptica
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
g	Gramma
h	hora
kb	quilo pares de bases
Km	canamicina
L	litro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MMS	metanosulfonato de metila
nm	nanômetro
°C	temperatura em graus celsius
ori	Origem de replicação
pb	pares de bases
r	resistência à
rbs	Sítio de ligação do ribossoma; do inglês "ribosome binding site"
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
Sm	estreptomina
Tc	tetraciclina
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
PEG	Polietileno glicol
V	volts

RESUMO

O gene *recA* de *H. seropedicae*, contido em um fragmento de 4,5 kb *EcoRI*, no plasmídeo pBMR5, hibridizou com o gene *recA* de *E. coli* K12. Dois fragmentos, 3,6 kb *HindIII* e 0,7 kb *EcoRI/HindIII*, contidos no fragmento de 4,5 kb *EcoRI*, foram subclonados separadamente nos vetores pTZ18R e pTZ19R, originando os plasmídeos pBMR503 e pBMR19, respectivamente. O seqüenciamento total do DNA inserto do pBMR19 e o parcial do pBMR503 produziu uma seqüência contínua de bases, que, quando submetida a comparações no banco de dados, revelou homologia com a proteína RecX de diversos organismos. A seqüência do gene *recX* de *H. seropedicae* está depositada no Genbank sob o número de acesso AF084045. No intuito de expressar a proteína RecX, foram construídos primers, que, além de conterem bases complementares a região 5' e 3' do gene, apresentavam sítios de restrição adequados para posterior clonagem em vetor de expressão. O plasmídeo pBMR5 foi utilizado como DNA molde na reação de amplificação que originou fragmentos com tamanhos variados. Os fragmentos foram utilizados como DNA-inserto na ligação com o vetor pTZ19R. Após várias análises dos clones resultantes da ligação, dois plasmídeos, pCWG3 e pCWG10, por apresentarem insertos com o tamanho esperado, 0,5kb, foram isolados e serão submetidos ao seqüenciamento. Os resultados obtidos confirmam a presença do gene *recX*, organizado de forma contígua ao gene *recA*, e indicam a possível clonagem do gene *recX* de *H. seropedicae* no vetor pTZ19R.

1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética desenvolvida ao longo da evolução e originada pelas mutações tem na recombinação gênica um fenômeno capaz de amplificá-la. As mutações introduzem novas informações no genoma, através de lentas e sucessivas modificações do código genético. As recombinações, desde o evento relativamente simples de quebra e reunião, até mecanismos altamente especializados de mitose e meiose, envolvem a permuta de material genético para formar novas combinações gênicas. Através da recombinação a variabilidade genética de uma espécie aumenta e pode ser transmitida sem necessidade de novas mutações. A recombinação envolvendo a reação em que seqüências homólogas de DNA são trocadas entre dois cromossomos é denominada de recombinação homóloga (COX & LEHMAN, 1987). As moléculas resultantes dessa permuta são ditas recombinantes e contêm informações genéticas originalmente presentes em cada uma das moléculas parentais (COX & LEHMAN, 1987; SMITH, 1988).

O isolamento de estirpes de *Escherichia coli* deficientes em promover a recombinação (Rec⁻) deu origem a uma série de estudos biológicos, genéticos, físicos e fisiológicos das etapas do mecanismo de recombinação homóloga. Inicialmente foram descritos os loci *recA*, *recB* e *recC* (CLARK & MARGUILES, 1965; WILLETS *et al.*, 1969) e subseqüentemente os loci *recD* (AMUNDSEN *et al.*, 1986; BIEK e COHEN, 1986), *recE*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recK*, *recL*, *recN* (COX & LEHMAM, 1987; CLARK, 1991), *recO*, *recQ*, (WEST, 1988) e *recR* (UMEZU *et al.*, 1990). Recentemente, outro loci envolvido na recombinação, inicialmente denominado como *orf3* em *Mycobacterium smegmatis*, foi caracterizado como gene *recX* em diferentes bactérias (PAPAVINASASUNDARAM *et al.*, 1997).

A proteína RecA é ubíqua em eubactéria e pode ser considerada como uma das proteínas mais conservadas nestes microrganismos. KARLIN e colaboradores (1995) propuseram um sistema de classificação baseado na comparação de seqüências da proteína RecA de 62 espécies de bactérias isoladas de diferentes habitats.

Em *E. coli*, a proteína RecA desempenha um papel fundamental no processo de recombinação homóloga e no reparo SOS do DNA (WALKER, 1984). Durante a recombinação, ela atua como uma ATPase DNA-dependente e promove, graças a sua grande capacidade de complexação com o DNA, o pareamento das moléculas de DNA homólogas e a conseqüente troca de segmentos entre elas (COX &

LEHMAN, 1987). Na resposta SOS, em presença de DNA lesado ou de segmentos de DNA unifilamentar, os quais agem como sinal indutor, a proteína RecA é ativada e promove a autoclivagem da proteína repressora LexA e de proteínas repressoras do fago Lambda (LITTLE, 1984). Além disso, a proteína RecA atua indiretamente no processo de mutagênese do DNA (reparo propenso a erro) (DUTREIX *et al.*, 1989) regulando a indução da resposta SOS e a clivagem da proteína UmuD (NOHMI *et al.*, 1988). Estudos realizados em *Rhizobium meliloti* mostraram que a ausência do gene *recA* leva a aumento do tempo de formação dos nódulos e a uma diminuição de sua habilidade competitiva pelos nódulos em culturas axênicas de alfafa. Fato este que justifica o interesse voltado para a utilização de estirpes RecA⁻ como organismos geneticamente modificados (HERRERACERVERA *et al.*, 1997) (Figura 1).

Proteínas com função análoga a da proteína RecA de *E. coli* (RecA-like) foram descritas em diferentes espécies de microrganismos: *Rhizobium meliloti* (BETTER & HELINSKI, 1983); *Pseudomonas aeruginosa* (KOKJOHN & MILLER, 1985); *Agrobacterium tumefaciens* (MILES *et al.*, 1986), *Azospirillum brasilense* (CROES *et al.*, 1990) e, recentemente, em *Rhodopseudomonas viridis* (CHEN & MICHEL, 1998), entre outros.

Os genes *recB*, *recC* e *recD* codificam as três subunidades da proteína RecBCD envolvida na recombinação homóloga, no reparo do DNA, na degradação de DNA exógeno ou danificado e na manutenção da viabilidade celular (CAPALDO-KIMBALL, 1971; CLARK, 1973; MARSIC *et al.*, 1993). A proteína RecE é uma exonuclease (GILLEN *et al.*, 1981). HALL *et al.* (1993) identificaram a proteína RecT, cuja função é promover a renaturação de seqüências de DNA de fita simples. Essa proteína é codificada por uma região do gene *recE* (HALL *et al.*, 1993). A proteína RecF liga-se ao DNA de fita simples e/ou dupla e participa da recombinação e do reparo do DNA (BLANAR *et al.*, 1984; MADIRAJU & CLARK, 1992). RecJ é uma exonuclease 5' → 3' específica para DNA de fita simples (LOVETT e CLARK, 1984; LOVETT e KOLODNER, 1989). A proteína RecO promove a renaturação de segmentos de DNA de fita simples complementares (UMEZU *et al.*, 1993). RecQ é uma helicase (UMEZU *et al.*, 1990). UMEZU *et al.* (1993) sugeriram que o produto do gene *recR* participa juntamente com RecF e RecO de um mesmo passo durante a recombinação, e que essas três proteínas interagem com a proteína RecA. A proteína RecG é a única helicase juncional específica envolvida no reparo do DNA e na recombinação (MAHDI *et al.*, 1997). A RecN parece estar envolvida no reparo (BRENA-VALLE & SERMENT-GUERRERO, 1998), mas juntamente com o produto do gene *recK*, ainda constituem objeto de investigação.

Em *P. aeruginosa*, a proteína RecX parece participar da regulação da proteína RecA (provavelmente pela interação entre elas) já que, quando o gene *recA* está sendo superexpresso, a presença da proteína RecX se mostra essencial para a sobrevivência bacteriana (SANO, 1993; DE MOT *et al.*, 1994). Já em *Mycobacterium smegmatis* e *M. tuberculosis*, PAPA VINASASUNDARAM *et al.* (1998) sugerem, a partir de ensaios de exposição à luz ultravioleta e de recombinação homóloga, que o gene *recX*, em situações de superexpressão do gene *recA*, não é necessário para a sobrevivência bacteriana. Enquanto ensaios de transformação com *M. smegmatis* mostraram que o gene *recX* é necessário quando o gene *recA* está sendo superexpresso. A presença do gene *recD* mostrou-se também imprescindível durante a transformação, já que mutantes *recD* foram incapazes de realizar transformação e a frequência de formação do “pilin” conjugativo apresentou-se reduzida em relação ao controle (*rec*⁺) em *Neisseria gonorrhoeae* MS11 (CHAUSSE *et al.*, 1999).

Seqüências homólogas ao gene *recX* foram identificadas em várias espécies de bactérias, e em três dos diversos casos (*Leggionella pneumophila*, *Thiobacillus ferrooxidans* e *M. smegmatis*) o gene também se encontra parcialmente sobreposto ao gene *recA*. Análises de RNA feitas por RT-PCR (reverse transcriptional/polimerase chain reaction) em *M. smegmatis* demonstraram que os genes *recA* e *recX* são cotranscritos como parte de um mesmo operon (PAPA VINASASUNDARAM *et al.*, 1997).

Dentre todos estes loci, o *recA* é considerado o mais importante, uma vez que mutações nesse gene chegam a reduzir o potencial de recombinação de *E. coli* em mais de mil vezes (COX & LEHMAN, 1987).

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

A importância conferida ao microrganismo *H. seropedicae* se deve ao seu potencial como bactéria fixadora de nitrogênio - diazotrófica – e como fornecedor de fitohormônios para várias poáceas de interesse econômico. Sua ocorrência foi documentada em raízes de arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar e em plantas prejudiciais que acompanham a cultura de cana, como também em folhas e caules de cana-de-açúcar e de arroz (BALDANI *et al.*, 1986, 1991).

H. seropedicae é classificado como membro do subgrupo β das Proteobactéria, com base na análise de seqüências de rRNA (YONG, 1992). O caráter endofítico obrigatório deste organismo foi recentemente evidenciado pela não sobrevivência do mesmo em solos mantidos sem cultivo e livres de raízes (BODDEY *et al.*, 1995).

As células de *H. seropedicae* são vibrióides, apresentam de um a três flagelos que lhes permitem a mobilidade. Na ausência de nitrogênio fixado e sob condições microaeróbicas, demonstram atividade de um complexo enzimático denominado nitrogenase, o qual catalisa a reação de redução do N₂ em amônia (BALDANI *et al.*, 1986). Em *H. seropedicae* há uma ampla faixa de tolerância ao pH (5,0-8,0), sendo aparentemente menos sensível ao oxigênio do que em outras espécies de bactérias, como por exemplo *Azospirillum brasilense* (BALDANI *et al.*, 1986; FU & BURRIS, 1989; KLASSEN, 1994).

A clonagem e seqüenciamento de um gene *nifA*-like de *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1991a e 1991b) deu início aos estudos de genética e manipulação gênica deste microrganismo no Laboratório de Fixação de Nitrogênio (Depto de Bioquímica - UFPR). Até o momento foram seqüenciados vários genes envolvidos na cascata da fixação de nitrogênio, como *nifHD* e parte do *nifK* (MACHADO *et al.*, 1996), *glnB* (BENELLI *et al.*, 1997), *glnAntrBC* (PERSUHN *et al.*, submetido), *nifENXorf1orf2* (KLASSEN *et al.*, 1999), *nifQmodABCfixXC* (KLASSEN *et al.*) e *nifB* (REGO, 1997), além do gene *nifA*. Com a intenção de se proceder novas análises genéticas de *H. seropedicae* iniciou-se o estudo do seu sistema de recombinação.

Após o isolamento e caracterização do gene *recA* de *H. seropedicae* (STEFFENS, 1994), buscando analisar genética e fisiologicamente outros genes envolvidos na recombinação gênica, este trabalho tem como objetivos:

- Seqüenciar o gene *recX* de *H. seropedicae*;
- Clonar o gene *recX* de *H. seropedicae* em vetor de expressão;
- Induzir, purificar e caracterizar da proteína RecX de *H. seropedicae*.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Bactérias e plasmídeos

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na TABELA 1.

TABELA 1 - Estirpes de bactérias e plasmídeos

Bactérias/ Plasmídeos	Genótipo / Fenótipo relevantes	Fonte
<i>E. coli</i>		
S17.1	RP4-2 Tc ^r : Mu Km ^r : Tn7 Tra ⁺ Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
71-18	Δ (lac-pro) F' lacI ^q Z M15 pro ⁺	Messing <i>et al.</i> , 1977
XL1Blue	Tc ^r recA1 endA1 gyrA96 hsdR17	Bullock <i>et al.</i> , 1987
DH10B	Nal ^r F ⁻ endA1 recA1	Grant <i>et al.</i> , 1990
Plasmídeos		
pTZ18R	Amp ^r lacZ f1 IG	Mead <i>et al.</i> , 1986
pTZ19R	Amp ^r lacZ f1 IG	Mead <i>et al.</i> , 1986
pLAFR3	Icos lacZ Tc Inc.P1 Tc ^r Mob+	Staskavicz <i>et al.</i> , 1987
pT7-7	Amp ^r (vetor de expressão/promotor T7)	Biolabs
pET28a	Km ^r (vetor de expressão/promotor T7 - gera uma proteína de fusão com cauda His-Tag)	Novagen
pBMR5	pLAFR3: : frag. <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> de 25,7 kb do DNA de <i>H. seropedicae</i>	Steffens <i>et al.</i> , 1993
pBMR503	pTZ18R: : frag. <i>HindIII</i> de 3,65 kb do pBMR5 (MMS ⁺)	Steffens, 1994
pBMR506	pTZ19R: : frag. <i>EcoRI</i> de 4,5 kb do pBMR5	Steffens, não publicado
pBMR18	pTZ18R: : frag. <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> de 0,7 kb	Steffens, não publicado
pBMR19	pTZ19R: : frag. <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> de 0,7 kb	Steffens, não publicado
pRAM3	pET28a::frag. <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> de 0,5 kb	Monteiro, 1998
pRAM4	pT7-7::frag. <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> de 0,5 kb	Monteiro, 1998
pCWG3	pTZ19R:: frag. <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> de 0,5 kb	Este trabalho
pCWG10	pTZ19R:: frag. <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> de 0,5 kb	Este trabalho

2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram: Luria-Both (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), Terrific-Broth (SAMBROOK *et al.*, 1989) e Mc Conkey (MILLER, 1982).

- O meio LB apresenta a seguinte composição em gramas por litro:

Extrato de levedura	5,0
NaCl	10,0
Triptona	10,0

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 12g/L ao meio líquido.

- O meio Terrific Broth apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	24,0 g/L
Glicerol	4,0 mL/L
Triptona	12,0 g/L
KH ₂ PO ₄	2,31g/L
K ₂ HPO ₄	12,54g/L

- O meio Mc Conkey apresenta a seguinte composição em gramas por 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

2.3 Antibióticos

As concentrações finais dos antibióticos utilizados nos meios de cultivo para *E. coli* foram: estreptomicina (Sm) 80 μ L/mL; tetraciclina (Tc) 10 μ L/mL; ácido nalidíxico (Nal) 10 μ L/mL; ampicilina (Amp) 250 μ L/mL e canamicina (Km) 50 μ L/mL.

A solução estoque de tetraciclina (10mg/mL) foi preparada em etanol 50%. As soluções estoque de estreptomicina (80mg/mL), ampicilina (250mg/mL) e canamicina (50mg/mL) foram preparadas em água Milliq e esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,45 μ m. A solução de ácido nalidíxico (10mg/mL) foi preparada em água Milliq, neutralizada com NaOH 1mol/L para completa solubilização e esterilizada por filtração. As soluções estoque dos antibióticos foram mantidas a 0°C.

2.4 Preparo da solução de RNase

A solução estoque de RNase (10mg/mL) foi preparada em Tris.HCl 10 mmol/L pH 7,5, contendo 15 mmol/L de NaCl e fervida durante 20 minutos para inativação de DNases e de outras nucleases contaminantes.

2.5 Preparo das soluções de clorofórmio:álcool isoamílico e de fenol: clorofórmio:álcool isoamílico

A solução de clorofórmio:álcool isoamílico foi preparada misturando 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico. A solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi preparada misturando 1 parte de fenol tamponado e 1 parte de clorofórmio:álcool isoamílico.

2.6 Condições de cultivo dos microrganismos

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB ou Terrific Broth a 37°C, sob agitação constante de 130 rpm, num período de até 18 horas. Em todas as culturas foi mantida a relação de 1/5 entre o volume do meio e o volume total do frasco empregado, visando assim garantir uma aeração ideal durante o crescimento dos microrganismos

2.7 Manutenção das estirpes bacterianas e preparo dos pré-inóculos

As estirpes bacterianas utilizadas foram mantidas à temperatura de -20°C em suspensão de glicerol 50%. Para o preparo dos pré-inóculos, alíquotas de 50-100 μ L destas suspensões foram transferidas para o meio líquido adequado e incubadas a 37°C durante 10-15 horas.

2.8 Minipreparação de plasmídeos

O isolamento de plasmídios de *E. coli* em pequena escala baseou-se no método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou utilizando-se o KIT Flexiprep, da Pharmacia Biotech, segundo especificações do fabricante. O procedimento de lise alcalina foi feito da seguinte forma: células de uma cultura recente de *E. coli* (D.O.₅₅₀ ≈ 1,5) foram coletadas em tubos plásticos de 1,5mL por centrifugação em microcentrífuga Sanyo (13.000 rpm), durante 1 minuto. O precipitado foi ressuspenso em 100µL de solução GET (50 mmol/L de Glucose, 25 mmol/L de Tris HCl pH 8; 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). As células foram lisadas pela adição de 200µL de NaOH 0,2mol/L contendo 1% de SDS e homogenizadas por inversão durante 5 minutos à temperatura ambiente. A neutralização da solução foi feita pela adição de 200µL de acetato de amônio (7,5 mol/L), em substituição aos 180µL de Kacf (3,0 mol/L de acetato de potássio e 1,8 mol/L de ácido fórmico) recomendado no protocolo original. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho de gelo por no mínimo 15 minutos. Nesta etapa há a precipitação de DNA cromossomal, proteínas e restos celulares. Após os 15 minutos, foram adicionados 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e o sistema foi submetido à breve agitação em agitador de tubos tipo "vortex". O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi coletado, após centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos), e transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA foi feita pela adição de 2 volumes de etanol 95%, em banho de gelo por no mínimo 30 minutos. Passado esse período, foi feita uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%. Em seguida o material foi centrifugado a 13000 rpm por 7 minutos. O etanol foi retirado por sucção e o material foi seco em bomba de vácuo. O precipitado foi ressuspenso em água MilliQ suficiente para solubilização (normalmente em 150µL para posterior tratamento com RNase).

2.9 Tratamento com RNase e Pós-RNase

À amostra de DNA plasmidial ressuspensa em 150 μ L de água Milliq, foram acrescentados 10 μ L de RNase (10mg/mL). A incubação foi feita a 37°C por 3 horas. Após esse período, foram adicionados 53,3 μ L de acetato de amônio (7,5mol/L) – visando promover a precipitação de proteínas - obtendo-se uma concentração final de 2,5mol/L. O tubo foi mantido em banho de gelo durante 10 minutos. A desproteização foi feita pela adição de 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e breve agitação seguida de centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi coletado e submetido a novo tratamento com fenol/clorofórmio. A precipitação do DNA foi feita pela adição de 3 volumes de etanol 95%. A fim de proporcionar uma maior eficiência na precipitação do DNA, os tubos foram mantidos em banho de gelo por no mínimo 30 minutos. Após este período, o sistema foi novamente centrifugado (13.000 rpm por 15 minutos). O sobrenadante foi retirado, ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 80%, e em seguida o material foi centrifugado (13000 rpm por 7 minutos). O excesso de etanol foi retirado por sucção e o DNA secado na bomba de vácuo. O precipitado foi ressuspensa em água Milliq suficiente para a sua solubilização (em média 20 μ L).

2.10 Eletroforese

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

Os géis de agarose foram preparados fundindo agarose dissolvida em solução tampão Tris base 89 mmol/L contendo ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 2 mmol/L pH 8,0 (TBE). O gel fundido foi transferido para placas suporte (5,7→8,3cm) contendo pente para eletroforese analítica ou preparativa. A concentração de agarose variou de 0,7 a 1,0%, de acordo com o tamanho dos fragmentos a serem separados. O tampão de preparação do gel foi utilizado também na corrida eletroforética. As amostras foram misturadas com corante FSUDS (azul de bromofenol 0,2%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em T₁₀E₁), na proporção de uma parte de corante para quatro partes de amostra (SAMBROOK *et al.*, 1989) e aplicadas nos poços formados após a retirada do pente.

As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas a 20 volts por 3-4 horas ou 8-10 volts durante 12-16 horas. Para a visualização das bandas de DNA, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) durante 20-40 minutos e o excesso de corante foi retirado com água destilada. A visualização das bandas de DNA foi feita em transiluminador ultravioleta. O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer Grafic UP860CE) ou por fotografia em filme KODAK ISO/ASA 400.

2.11 Amplificação do DNA para reação de seqüenciamento

Ao DNA de fita dupla purificado (0,5-1,0 μ g) (2.8) foram adicionados 2,62 μ L de tampão TACS (Tris 106 mmol/L, MgCl₂ 2,6 mmol/L e (NH₄)₂SO₄); 1,0 μ L de oligonucleotídeo (10 pmol) e 6,0 μ l de mistura para seqüenciamento Terminator Ready Rxn Mix (Perkin-Elmer). Esta solução então foi submetida a uma reação de amplificação (PCR de seqüenciamento), que consistia dos seguintes passos: um ciclo de 95°C-5 min e trinta ciclos: 96°C-30 seg, 40°C-30 seg e 65°C-6 min.

2.12 Preparo do DNA para o seqüenciamento

O produto da reação de amplificação de DNA para seqüenciamento (2.11) foi transferido para um tubo de 1,5mL e a ele foram adicionados 6,67 μ L de acetato de amônia, na concentração final de 2,5mol/L, e 80 μ L de etanol 95%. A fim de proporcionar uma maior eficiência da precipitação, os tubos foram mantidos em banho de gelo por no mínimo 15 minutos. Após este período, foi feita a centrifugação (13.000 rpm durante 15 minutos). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 80% e em seguida o material foi centrifugado (13000rpm por 5 minutos). O etanol foi retirado por sucção e o material foi seco em bomba de vácuo. O precipitado foi ressuspenso em 15 μ L de tampão TSR (Template Supression Reagent – Perkin Elmer Inc.). A amostra foi então transferida para um tubo de 900 μ L, desnaturada por 2 minutos a uma temperatura de 96°C e submetida à eletroforese em seqüenciador automático.

2.13 Seqüenciamento

As amostras de DNA foram seqüenciadas pelo método de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). O seqüenciamento foi feito utilizando quatro cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia e detecção a Laser, em Seqüenciador Automático de DNA Modelo AFS310 da Perkin-Elmer Inc, após corrida eletroforética em coluna capilar. As seqüência obtidas foram transferidas eletronicamente ao microcomputador e analisadas nos programas DNAsis, Clustal V, Genbank, Auto Assembler e Staden.

2.14 Transformação bacteriana por eletroporação

2.14.1 Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia de células de *E. coli* foi inoculada em 50mL de meio LB, contidos em um frasco de 500mL. Este pré-inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 130 rpm até a saturação da cultura. Após o crescimento, quinhentos microlitros do pré-inóculo foram utilizados como inóculo em 500mL de meio LB, contidos em frasco de 2000mL. Este inóculo foi incubado a 37°C sob agitação até atingir a D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Em seguida, esta cultura foi transferida para tubos plásticos de 50mL e centrifugada a 5.000 rpm na temperatura de 4°C por 5 minutos em rotor Hitachi nº 30. As células foram lavadas três vezes, as duas primeiras utilizando-se 250mL de água Milliq e a última utilizando-se 150mL de glicerol 10%. Ao retirar o sobrenadante, o sedimento de células foi ressuspensão no glicerol restante no tubo e fracionadas em amostras de 20 µL. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

2.14.2 Eletroporação

Alíquotas de 20µL de células eletrocompetentes foram descongeladas lentamente em banho de gelo e utilizadas durante o processo de eletroporação. A cada tubo foi acrescentado 1µL de DNA plasmidial e o conjunto foi levemente homogenizado. O volume célula/ DNA de cada tubo foi transferido para uma câmara de eletroporação devidamente identificada. A câmara de eletroporação foi ajustada na câmara de segurança e submetida à corrente elétrica sob as seguintes condições: 4 kV, 400Ω e 300µF. A seguir, as células foram transferidas para frascos de 25mL contendo 1mL de meio LB e incubadas a 37°C a 130rpm, por 1 hora. Após incubação, alíquotas de 50-100µl de células de *E. coli* foram plaqueadas em meio LA ou Mc Conkey. Ao meio de cultura, foram acrescentados os antibióticos apropriados para a seleção tanto das células bacterianas como dos plasmídeos inseridos nas mesmas. As placas foram incubadas a 37°C durante 16-24horas. As colônias de *E. coli* crescidas nas placas, foram coletadas e analisadas para a presença dos plasmídeos (2.8).

2.15 Clivagem do DNA por enzimas de restrição

Amostras de DNA foram usualmente clivadas com 1-2 unidades de enzima de restrição em um volume final de reação de 10-20µL, por 2-3 h a 37°C e utilizando o tampão mais adequado para a atividade da enzima conforme indicado pelo fabricante. Basicamente, as enzimas de restrição e os tampões utilizados foram adquiridos da Pharmacia LKB, GIBCO BRL ou USB - Amershan.

2.16 Ligação

Os fragmentos de DNA a serem ligados apresentavam pontas coesivas, já que o vetor e o inserto haviam sido previamente digeridos com a mesma enzima de restrição (2.17). A mistura de ligação foi feita na proporção de 1:5 (vetor:inserto) em um volume final variável (10-30 μ L). Essa mistura acrescida de tampão para a enzima ligase (50 mmol/L Tris.HCl pH 7,6; 10 mmol/L de MgCl₂; 1 mmol/L de DTT; 0,5 mmol/L de ATP e 5% de PEG) foi aquecida durante 10 minutos a 65°C e resfriada rapidamente em gelo. A seguir, foi adicionada a enzima T4-DNA ligase (0,5 a 1U) e a mistura completa foi, então, incubada a 16-22°C por 24-48 h. Para verificar o sucesso da ligação, uma alíquota do sistema foi transformado por eletroporação em células de *E. coli* competentes (2.14).

2.17 Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting Point-LMP)

A concentração do gel utilizada na corrida eletroforética variou entre 0,7 e 1,0%. Após uma corrida de 12 a 16 h, o gel foi corado com brometo de etídio e, sob o transiluminador, a banda desejada foi localizada, cortada e transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5mL. Ao tubo, foram adicionados 0,25mol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de Tris.HCl pH 8,0. Posteriormente, o gel foi fundido a 65°C por 5 minutos. A extração do DNA presente no gel foi feita através da adição de 1 volume de fenol e agitação (no vórtex) durante 1 minuto. O sistema foi mantido em repouso por 10 minutos e logo após centrifugado 5 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi coletada e ao fenol restante foram acrescentados 300 μ L de T₁₀E₁. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante foi reunido ao anterior, já coletado. A fase aquosa foi submetida a outras extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, a fim de retirar toda a agarose presente. A precipitação do DNA foi feita pela adição de 2,5 volumes de etanol 95% e acetato de amônio 2,5mmol/L, em banho de gelo durante 15-30 min. Passado esse período, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 80%. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 8 min. O etanol foi retirado por sucção e o DNA foi seco em bomba de vácuo. O precipitado foi ressuspense em 10 μ L de água destilada.

2.18 PCR

O gene que codifica para a proteína RecX foi amplificado utilizando-se o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (ERLICH & ARNHEIM, 1992). Os oligonucleotídeos utilizados foram polinucleotídeos sintetizados quimicamente utilizando-se fosforamidite em Gene Assembler (Pharmacia). O plasmídeo pBMR5 foi utilizado como DNA-molde e os dois oligonucleotídeos utilizados foram: o *recX1* e o *recX2*. O sistema de reação consistiu de 0,5µg de DNA; 2µL de dNTP (5 mmol/L); 1µL dos oligonucleotídeos *recX1* e *recX2* (10pmol cada); 5µL de tampão de PCR 10 vezes concentrado (200 mmol/L de Tris HCl pH 8,4 e 500 mmol/L de KCl), 1,5µL de MgCl₂ (50 mmol/L); 36,5µL de água (q.s.p. 100µL) e 2,0µL de enzima Taq polimerase (purificada no próprio Laboratório de Fixação de Nitrogênio por Chubatsu, L. S.). A reação de PCR foi realizada utilizando um programa de "Touch Down", o qual consiste de um ciclo de 95°C por 5 min e vinte e três ciclos de 95°C - 30seg, 50°C - 1min, 72°C - 3 min. A cada ciclo há o decaimento de 1°C na temperatura de anelamento, logo esta varia de 50°C a 17°C.

2.19 Preparo dos vetores para clonagem do produto de PCR

2.19.1 Escolha dos vetores

Os vetores escolhidos foram o pTZ19R, pET28a e o pT7-7. A clonagem inicial do fragmento de PCR foi feita no vetor pTZ19R, já que este apresenta um sítio de policlonagem com sítios de restrição adequados para o objetivo, além de apresentar um tamanho reduzido e um alto número de cópias por célula. Para a expressão da proteína, o fragmento de PCR contendo o gene *recX* deverá ser clonado nos vetores pT7-7 e pET28a. O plasmídeo pT7.7 apresenta uma seqüência promotora do fago T7, assim como o plasmídeo pET28a. Além disso, este último contém uma seqüência de nucleotídeos que codifica para um polipeptídeo de 24 aminoácidos contendo 6 resíduos de histidina, a seqüência His-Tag, que pode ser fundida à seqüência genética de interesse. A expressão desta construção produz uma proteína de fusão com um His-Tag ligado ao N-terminal da proteína de interesse, no caso a proteína RecX.

2.19.2 Extração dos vetores

A extração dos vetores pTZ19R, pT7-7 e pET28a foi feita pelo método de lise alcalina, descrita no item 2.8.

2.20 Purificação de plasmídeos pelo método rápido (Rapid prep)

O procedimento utilizado para verificação rápida da presença de plasmídeos foi feito da seguinte forma: células de uma cultura recente de *E. coli* (D.O.₅₅₀ ≈ 1,5) foram coletadas em tubos plásticos de 1,5mL por centrifugação em microcentrífuga Sanyo (13.000 rpm), durante 1 minuto. O precipitado foi ressuspenso em 40μL de corante FSUDS (azul de bromofenol 0,2%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em T₁₀E₁) e 15μL de fenol:clorofórmio no vórtex. O DNA foi separado dos restos celulares após 5 minutos de centrifugação em microcentrífuga Sanyo (13.000 rpm). Dez microlitros do sobrenadante foram aplicados em gel de agarose 0,7%, para análise eletroforética.

2.21 Purificação de fragmentos de PCR utilizando o Kit Qiaquick

A purificação dos fragmentos de PCR foi feita segundo protocolo do fabricante (Qiagen).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seqüenciamento do gene *recX*

O gene *recA* de *H. seropedicae* foi isolado após complementação genética da estirpe mutante *E. coli* HB101 (*recA*⁻), pelo plasmídeo recombinante pBMR5. O fragmento de 3,6 kb *Hind*III, do plasmídeo pBMR5, hibridizou com a sonda contendo o gene *recA* de *E. coli* K12, confirmando a presença neste plasmídeo de um gene estruturalmente semelhante ao gene *recA* em *H. seropedicae* (STEFFENS, 1994). Com o objetivo inicial de localizar e seqüenciar o gene *recX* de *H. seropedicae* e sabendo-se que este gene encontra-se contíguo ao gene *recA* em todos os microorganismos onde foi identificado (PAPAVINASASUNDARAM *et al.*, 1997), o fragmento de 0,7kb *Eco*RI/*Hind*III presente, segundo o mapa de restrição a montante do fragmento de 3,6 kb *Hind*III, foi subclonado no vetor pTZ19R dando origem ao plasmídeo pBMR19 (Figura 2) (STEFFENS, não publicado).

Visando o seqüenciamento do fragmento *Eco*RI/*Hind*III, foi estabelecido o protocolo mais adequado para preparação dos plasmídeos. Para isto, foram testadas diversas variantes, dentre elas: o meio requerido para cultivo das bactérias, a concentração de RNase, assim como a solução utilizada para resuspensão das células. Pode-se verificar que a utilização do meio Terrific Broth proporcionou o aumento do crescimento bacteriano no mesmo período de tempo e conseqüentemente a quantidade de DNA purificado; que a ressuspensão das células em água+RNase, no lugar da solução de GET, não surtiu efeito considerável. Verificou-se ainda que a concentração de RNase mais adequada foi a de 1mg/mL. Com base nos resultados obtidos, a metodologia empregada na minipreparação de plasmídeos para seqüenciamento foi aquela descrita no ítem 2.8 dos Materiais e Método. A otimização da técnica de purificação e um maior domínio da mesma, possibilitaram a obtenção de plasmídeos com graus de pureza e de concentração adequados para o seqüenciamento.

Após esta etapa, a dificuldade passou a ser a determinação das temperaturas ideais utilizadas nas fases de complexação do DNA com a enzima DNA polimerase e extensão do DNA durante os ciclos da reação de amplificação para seqüenciamento. Após várias tentativas, o programa utilizado foi aquele descrito no ítem 2.11 dos materiais e método. O seqüenciamento foi feito utilizando os oligonucleotídeos complementares ao vetor utilizado (universal, reverso e T7). Não houve a necessidade de se obter deleções, já que o fragmento em questão não

apresentava uma grande seqüência de nucleotídeos. O seqüenciamento utilizando cada um dos oligonucleotídeos foi repetido, em média, 4 vezes e os eletroforetogramas resultantes foram analisados e comparados entre si, até haver a confirmação da posição correta de cada nucleotídeo. O alinhamento das seqüências foi realizado através do programa Auto Assembler (Perkin Elmer Inc.), onde foi possível reunir todas as seqüências obtidas e verificar a presença de regiões de sobreposição que indicavam uma continuidade entre elas, ou seja, a existência de uma sobreposição. A determinação da posição dos sítios *EcoRI* e *HindIII*, permitiu a correta delimitação da seqüência correspondente ao fragmento clonado.

A seqüência de nucleotídeos obtida para o fragmento de 0,7 kb foi submetida ao banco de dados, onde foi encontrada homologia com a região C-terminal da proteína RecX de diferentes bactérias.

Baseando-se no mapa de restrição do plasmídeo pBMR5 e sabendo-se o sentido de transcrição do gene, *HindIII*→*EcoRI*, pode-se inferir que o início do gene *recX* estava contido no fragmento de 3,6kb *HindIII*, já mencionado (Figura 2). O plasmídeo pBMR503, foi então purificado e submetido ao seqüenciamento utilizando os oligonucleotídeos T7 e universal. A seqüência obtida com o oligonucleotídeo T7, quando submetida ao banco de dados, não apresentou homologia com nenhuma proteína de interesse, já a seqüência obtida com o oligonucleotídeo universal apresentou homologia com a região N-terminal da proteína RecX.

As seqüências obtidas dos fragmentos de 0,7kb *HindIII/EcoRI* e 3,6kb *HindIII* foram conectadas pelo sítio *HindIII* e novamente submetidas ao banco de dados onde foi encontrada homologia com a proteína *recX* de *P. fluorescens* (identidade 40%, similaridade 53%), *P. aeruginosa* (identidade 37%, similaridade 54%), *V. cholerae* (identidade 34%, similaridade 54%), *P. putida* (identidade 33%, similaridade 49%) e *E. coli* (identidade 31%, similaridade 45%). As regiões de consenso entre a seqüência de aminoácidos da proteína RecX de *H. seropedicae* e de outros organismos foi visualizada também, após alinhamento das mesmas no programa ClustalV (Figura 4).

A análise da seqüência de nucleotídeos obtida permitiu a identificação do códon de iniciação (ATG), códon de terminação (TGA) e das seqüências palindrômicas (ATTGCCCC.GGGGCAAT) juntamente com o oligodesoxi T sinalizando o término da transcrição (Figura 3). Além disso, foi possível verificar a posição a jusante e não sobreposta do gene *recX* em relação ao gene *recA*. Característica essa bastante comum dentre as bactérias já descritas, como espécies de *Pseudomonas*, *M. tuberculosis* e *M. leprae* (PAPAVINASASUNDARAM *et al.*, 1997).

A provável região codificadora do produto do gene *recX* contém 465 nucleotídeos (154 aminoácidos) com o códon de início de tradução presente 3pb a jusante de um provável sítio de ligação ao ribossomo (...GAAC...). A baixa especificidade na seqüência de ligação ao ribossomo também está presente no gene *recX* de *M. smegmatis* (PAPAVINASASUNDARAM *et al.*, 1997), sugerindo um baixo índice de expressão deste gene dentro da célula. Além disso, a partir da verificação de que não há a presença de nenhuma região promotora a montante do sítio de ligação ao ribossomo, pode-se supor que os genes *recA* e *recX* são cotranscritos e estão sob controle de um mesmo promotor, presente a montante ao gene *recA*. A seqüência completa do gene *recX* de *H. seropedicae* está depositada no banco de dados, Genbank, sob o número de acesso AF084045.

A proteína RecX de *H. seropedicae* apresenta um número similar de aminoácidos, um total de 154 aminoácidos (aa), se comparada com a mesma em outras espécies bacterianas, como *P. aeruginosa* (153aa), *P. fluorescens* (155aa), *P. putida* (142aa). Esta proximidade no número de aminoácidos constituintes poderia ser um indicativo da alta conservação desta proteína, assim como a encontrada na proteína RecA (Karlin *et al.*, 1995), exceto pelo fato de que em *M. smegmatis*, a proteína RecX é constituída por 198aa, um número bastante acima do encontrado nas demais.

O sinal de terminação da transcrição identificado parece pertencer a classe independente da proteína ρ . Esta classificação pôde ser feita baseando-se em duas características apresentadas pelo terminador de transcrição. A primeira é a presença de uma região com seqüências autocomplementares, palindrômicas, que permite a formação do grampo (estrutura em cruz formada pelas duas fitas de DNA). A segunda característica é a presença de uma seqüência de timidilatos na fita complementar que provavelmente é transcrita em uridilatos na extremidade do RNA. A formação do grampo (rompe parte do híbrido DNA-RNA), juntamente com as ligações oligoribo U - oligodesoxi A (combinações de bases instáveis), levam ao rompimento do complexo de transcrição.

Outra análise feita a partir da seqüência de DNA correspondente ao gene *recX*, foi aquela pelo método de preferência de códons (programa Analyseq), utilizando uma tabela de uso preferencial de códons obtida dos produtos de tradução dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae* (ANEXO1). Como resultado dessa análise, foi obtido o gráfico representado na Figura 5. Os picos presentes na fase 1 de leitura, que praticamente se mantêm todo acima da linha dos 50%, até o códon de parada, corresponde a região codificadora do gene *recX*.

3.2 Expressão da proteína RecX

3.2.1 Síntese dos oligonucleotídeos

A seqüência de nucleotídeos obtida do gene *recX* e das regiões a montante e a jusante a ele foi submetida a análise no programa Strider, para a avaliação dos sítios de restrição presentes e das suas respectivas localizações. Além disso, a seqüência de bases permitiu que fossem escolhidas as melhores regiões para o alinhamento dos oligonucleotídeos.

Baseando-se nos sítios de restrição presentes no sítio de policlonagem dos vetores pTZ19R, pT7-7 e pET28a (Figuras 6, 7 e 8), e naqueles ausentes no gene *recX*, foram escolhidas as seqüências de bases reconhecidas pelas enzimas *NdeI* e *KpnI*, para serem incluídas na seqüência do oligonucleotídeo 5'→3', além das bases complementares ao início do gene *recX*. O oligonucleotídeo 3'→5', da mesma forma, além de conter as bases complementares ao fim do gene *recX*, apresentava um sítio de restrição reconhecido pela enzima *BamHI*. Os oligonucleotídeos 5'→3' e 3'→5' foram denominados *recX1* e *recX2*, respectivamente. A seqüência de bases de ambos os oligonucleotídeos encontra-se a seguir, sendo que apresentam-se destacados em azul, o sítio de restrição para a enzima *KpnI*; em rosa, o sítio de restrição para a enzima *NdeI*; em amarelo, o sítio de ligação do ribossomo e em verde, o sítio de restrição para a enzima *BamHI*:

recX1 5'TTGGTACCAAGGAGATATACATATGCCAGACCG3'

recX2 5'CAAGGGATCCTCAGCTCGGATCGTC3'

3.2.2 Determinação das condições ideais de PCR

Tendo conhecimento do número de bases correspondentes ao gene *recX* (465 pb) e do número de bases acrescentadas pelos oligonucleotídeos (32 pb), devido a inserção dos sítios de restrição, foi possível estimar que o tamanho do fragmento amplificado seria de aproximadamente 0,5 kb.

Inicialmente, para o estabelecimento de um sistema ideal de amplificação, várias variantes foram testadas, dentre elas: a concentração de cloreto de magnésio, as temperaturas e os tempos dos ciclos do PCR, o DNA utilizado como molde ("template") e finalmente a concentração desse template.

Utilizando o plasmídeo pBMR506 como template e o programa (descrito no item 2.18), as concentrações de cloreto de magnésio (MgCl) escolhidas para os

testes variaram entre 0,2 e 0,75 mmol/L. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas a corrida eletroforética, em gel de agarose 1% (Figura 9). Desta forma foi possível verificar que utilizando-se 0,2 mmol/L de MgCl (linha 2), não há amplificação, que utilizando-se 0,25 mmol/L de MgCl (linha3), o fragmento amplificado apresenta um tamanho inferior ao esperado, e que nas demais concentrações de MgCl (linhas 4 a 7), as amplificações ocorrem de maneira inespecífica, já que há o aparecimento de diversas bandas. Frente a esses resultados a concentração de MgCl que passou a ser usado foi a padrão, indicada pelo fabricante - 0,75 mmol/L (3 μ L em 100 μ L de sistema).

Apesar da inespecificidade da amplificação, as amostras correspondentes as linhas 4 a 7 foram agrupadas e submetidas a corrida eletroforética em gel de baixo ponto de fusão (2.17). As duas bandas que apresentavam o tamanho mais aproximado do esperado foram isoladas, purificadas e utilizadas como template numa nova reação de PCR. Após corrida eletroforética, ambas as amostras apresentaram uma banda na altura de 0,5 kb. Estes fragmentos foram então submetidos a clivagem com as enzimas *NdeI* e *BamHI* para posterior clonagem no vetor pET28a, previamente cortado com as mesmas enzimas. Após a restrição, as enzimas foram inativadas a 65°C por 15 minutos, o sistema foi desproteínizado por tratamento com fenol e o DNA foi precipitado com etanol 95%. O vetor pET28a e o inserto de 0,5 kb foram ligados (2.16) e transformados por eletroporação (2.14) nas estirpes S17.1 e 7118 de *E. coli*. As células, após eletroporação, foram plaqueadas em meio Mc Conckey e Ampicilina (250 μ g/mL). Após incubação de 24h a 30°C, não houve o crescimento de colônias.

Com o objetivo de obter-se uma reação de amplificação mais específica, o Touch Down foi substituído por temperaturas fixas de anelamento e extensão. Nestas condições nenhum fragmento foi amplificado. Assim sendo, o programa de Touch Down continuou a ser usado, mas frente a outros templates, dentre eles o DNA cromossomal de *H. seropedicae*, o plasmídeo pBMR5 e o próprio pBMR506, só que agora cortado com a enzima *EcoRI*.

As reações feitas utilizando o DNA cromossomal de *H. seropedicae* e o plasmídeo pBMR506 cortado com *EcoRI* amplificaram fragmentos maiores do que o esperado, logo não foi feita nenhuma tentativa de clonagem dos mesmos.

Apesar das amplificações onde utilizava-se o plasmídeo pBMR5 como DNA molde ocorrer de maneira inespecífica (tamanhos variados de fragmentos eram detectados), este foi o plasmídeo escolhido para as reações de PCR.

3.2.3 Amplificação e clonagem no vetor pTZ19R

Uma das amostras, resultante da amplificação do plasmídeo pBMR5, foi submetida a purificação com o KIT para PCR Qiaquick (2.21). Após a purificação, os diversos fragmentos, obtidos a partir da reação de amplificação, foram submetidos a restrição com as enzimas *KpnI* e *BamHI* (sítios estes, inseridos nos primers), para posterior clonagem no vetor pTZ19R, previamente cortado com as mesmas enzimas. A escolha deste vetor foi feita já que a clonagem nos vetores pT7.7 e pET28a envolve a clivagem com uma enzima de baixa eficiência como a *NdeI*, fator esse que restringe a quantidade de clones obtidos, diminuindo a possibilidade do gene *recX* encontrar-se em um deles. Após a ligação do vetor e do inserto, a mistura de ligação foi transformada por eletroporação (2.14.2) em *E. coli* DH10B. As células, após eletroporação, foram plaqueadas em meio Mc Conckey contendo Ampicilina²⁵⁰ (marca do plasmídeo). Após incubação de 24h a 37°C, houve o crescimento de muitas colônias, dentre elas, brancas e vermelhas. A princípio foram escolhidas 50 colônias brancas (denotando inatividade da enzima β -galactosidase), para análise de seus plasmídeos por rapid prep (2.20). Baseando-se no perfil eletroforético dos plasmídeos em gel de agar 1% (Figura 10), os clones que apresentavam a mesma migração foram agrupados. Um exemplar de cada grupo foi inoculado em meio LB contendo Amp²⁵⁰, o seu plasmídeo isolado após miniprep (2.8) e restrito com as enzimas *KpnI* e *BamHI*. O tamanho dos fragmentos resultantes da clivagem foi analisado após corrida eletroforética em gel de ágar 1% (Figura 11). Aquelas amostras que apresentaram um fragmento de aproximadamente 0,5 kb, além do de 2,9 kb correspondente ao vetor pTZ19R foram analisadas. As amostras de número 2, 3, 10, 12 e 42 foram aplicadas num gel de agarose 1% para a visualização mais exata do peso molecular dos fragmentos clonados (Figura 12). Os sub-clones 3 e 10, denominados pCWG3 e pCWG10, respectivamente, foram os que apresentaram o inserto com migração mais próxima de 0,5 kb. Logo, estes foram selecionados inicialmente para o sequenciamento, a fim de se verificar a total identidade da seqüência de nucleotídeos do inserto com a do gene *recX* de *H. seropedicae*.

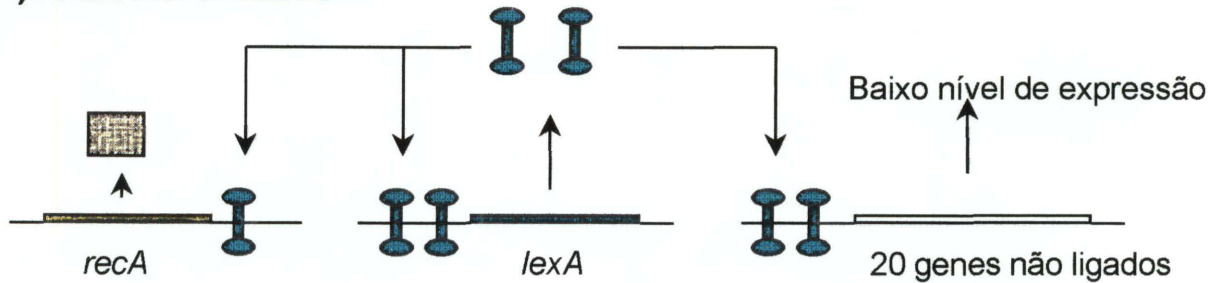
3.2.3 Preparação dos vetores de expressão

Os vetores pT7-7 e pET28a foram isolados da estirpe *E. coli* XL1Blue através do método da lise alcalina (2.8). As restrições com as enzimas *NdeI* e *BamHI* foram feitas isoladamente, para que pudesse ser confirmado, após corrida eletroforética das amostras, se ambas as enzimas haviam clivado o vetor. Como a digestão

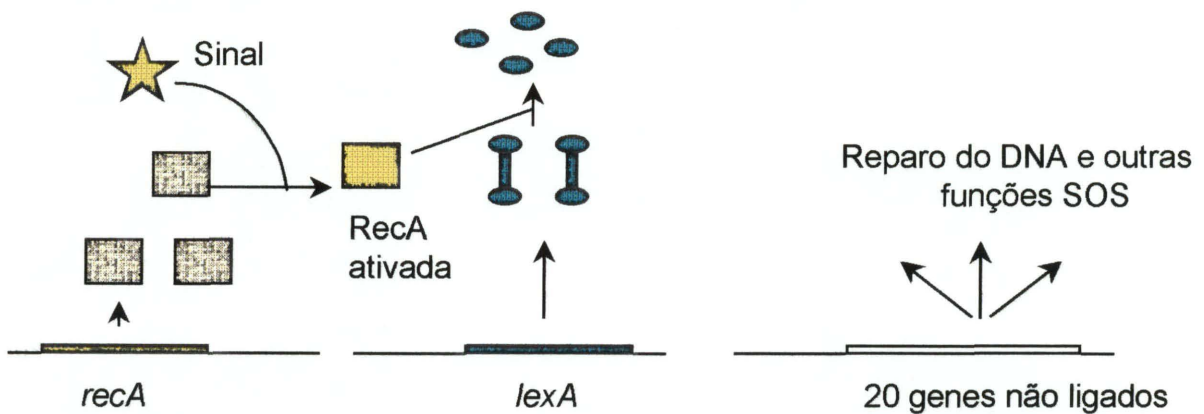
apresentou-se de forma sempre parcial, independente do tamanho do sistema de restrição, da quantidade de enzima adicionada ou do tempo de incubação, optou-se por extrair os vetores pT7-7 e pET28a, dos plasmídeos pRAM4 e pRAM3, respectivamente. Esta nova estratégia exigiu a separação de um fragmento de 0,5 kb clonado nos vetores de interesse. Para isto, após a clivagem dos plasmídeos com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, as amostras foram aplicadas em um gel de baixo ponto de fusão e a banda correspondente a do vetor pT7-7 e pET28a foi isolada e purificada (2. 17) para posterior ligação com o DNA inserto contendo o gene *recX* de *H. seropedicae*

Figura 1 Modelo de Regulação do Sistema SOS.

(A) Célula não induzida

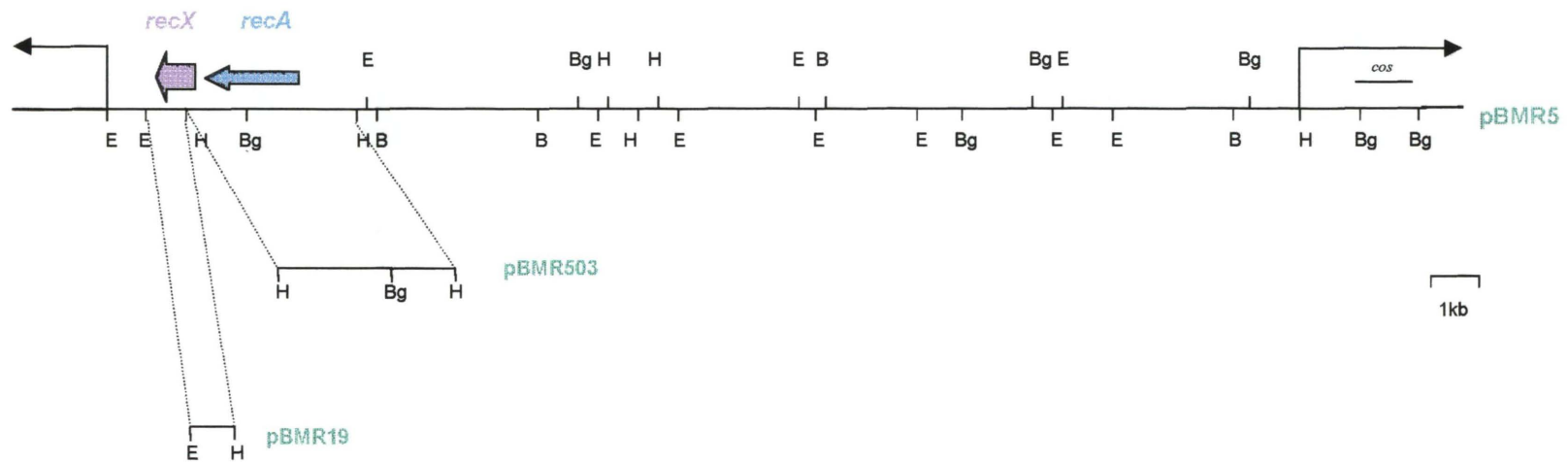


(B) Célula induzida



Modelo proposto por LITTLE e MOUNT (1982) para regulação do Sistema SOS em *E. coli*. (A) Em estado não induzido as células expressam as proteínas RecA e LexA em níveis basais. (B) No estado induzido, a RecA é ativada, ocorre a clivagem de LexA e a desrepressão dos genes do sistema SOS. Frente a queda no nível do sinal, há o retorno ao estado não induzido (A).

Figura 2 Mapa de restrição do pBMR5



O fragmento *HindIII* de 3,6 kb do plasmídeo pBMR5 foi subclonado no vetor pTZ18R dando origem ao plasmídeo pBMR503.

O fragmento *EcoRI* / *HindIII* de 0,7kb do plasmídeo pBMR5 foi subclonado no vetor pTZ19R dando origem ao plasmídeo pBMR19.

As enzimas de restrição indicadas são: E – *EcoRI*, H - *HindIII*, B – *BamHI*, Bgl – *BglII*.

Figura 3 Sequência de nucleotídeos do gene *recX* de *Herbaspirillum seropedicae* e de sua respectiva proteína resultante.

1	GTT CTG GCG GGC GAT GGG GTG CTG TCG TAG TCG CCA TAT CTT GTT	45
46	TGT TCC GCG TTG CGG GCA GGC AGG GTA TGG GTA CCG AAC TGC GCT	90
91	TGT TTT GCC GCA TTA CTG CAT CAT TGC ATC ACC GCT TCA TTG CAT	135
136	CAT CGT CTC ACT GCA TCA CCC TTT CAT TGC ATC CTT GCC TCA CCG	180
181	TTG CGA TGC CCT GAA TGG TTT TTA CTG CAT CAG CTT CCC GTG TAT	225
226	TCA TCT GCT CCT TCG TCC GTG TAA TCG AAC GTC ATG CCC AGA CCG	270
		Met Pro Arg Pro 4
271	CCG ATC AGC CTG AAA GCA CGG GCG CTC AAA TAT CTC TCT TCA CGT	315
5	Pro Ile Ser Leu Lys Ala Arg Ala Leu Lys Tyr Leu Ser Ser Arg	19
316	GAG CAT AGT CGT CTG GAA CTT GCG CGT AAG CTT GCC CCT TAC GCG	360
20	Glu His Ser Arg Leu Glu Leu Ala Arg Lys Leu Ala Pro Tyr Ala	34
361	CAA GAG GGC GAC GAC ATC GAA GCG CTG CTC CAG TGG CTG GAG CAG	405
35	Gln Glu Gly Asp Asp Ile Glu Ala Leu Leu Gln Trp Leu Glu Gln	49
406	TCC CGC TTC CTC TCC CAG GAA CGT TTT TCC GAA TCG CTG GTG CAT	450
50	Ser Arg Phe Leu Ser Gln Glu Arg Phe Ser Glu Ser Leu Val His	64
451	CGC CGC GCT GCG CGC TAT GGC AAC CAG CGC ATC CTC TCC GAA TTG	495
65	Arg Arg Ala Ala Arg Tyr Gly Asn Gln Arg Ile Leu Ser Glu Leu	79
496	CAT GGC CAC GGC ATC GAA GGC GAG GCC ATC GCC GAC CTG AAG GCG	540
80	His Gly His Gly Ile Glu Gly Glu Ala Ile Ala Asp Leu Lys Ala	94
541	GAT CTG GCC GCT TGG CGA AGC GAG CGG GCC GCC CAG GTG CTG CGC	585
95	Asp Leu Ala Ala Trp Arg Ser Glu Arg Ala Ala Gln Val Leu Arg	109
586	CGT AAA TTC ACT GCC CCG CCG GCC GAC GCC GAG ACC CGC GCA AAG	630
110	Arg Lys Phe Thr Ala Pro Pro Ala Asp Ala Glu Thr Arg Ala Lys	124
631	CAG ATG CGC TTC CTG CAG CAG CGC GGC TTT TCC CAT CGC AGC ATC	675
125	Gln Met Arg Phe Leu Gln Gln Arg Gly Phe Ser His Arg Ser Ile	139
676	CGG GAG GCC TTC CAG ACC GCC TGG CTG GAC GAA GAC GAT CCG AGC	720
140	Arg Glu Ala Phe Gln Thr Ala Trp Leu Asp Glu Asp Asp Pro Ser	154
721	TGA CCG CGC CTT GTA TCA CTG TCG GCG TCA TTG CCC CGA GGT AAT	765
155	*	
766	TGC TGG GGC AAT TCG GCA GGC CGT TTT T	793

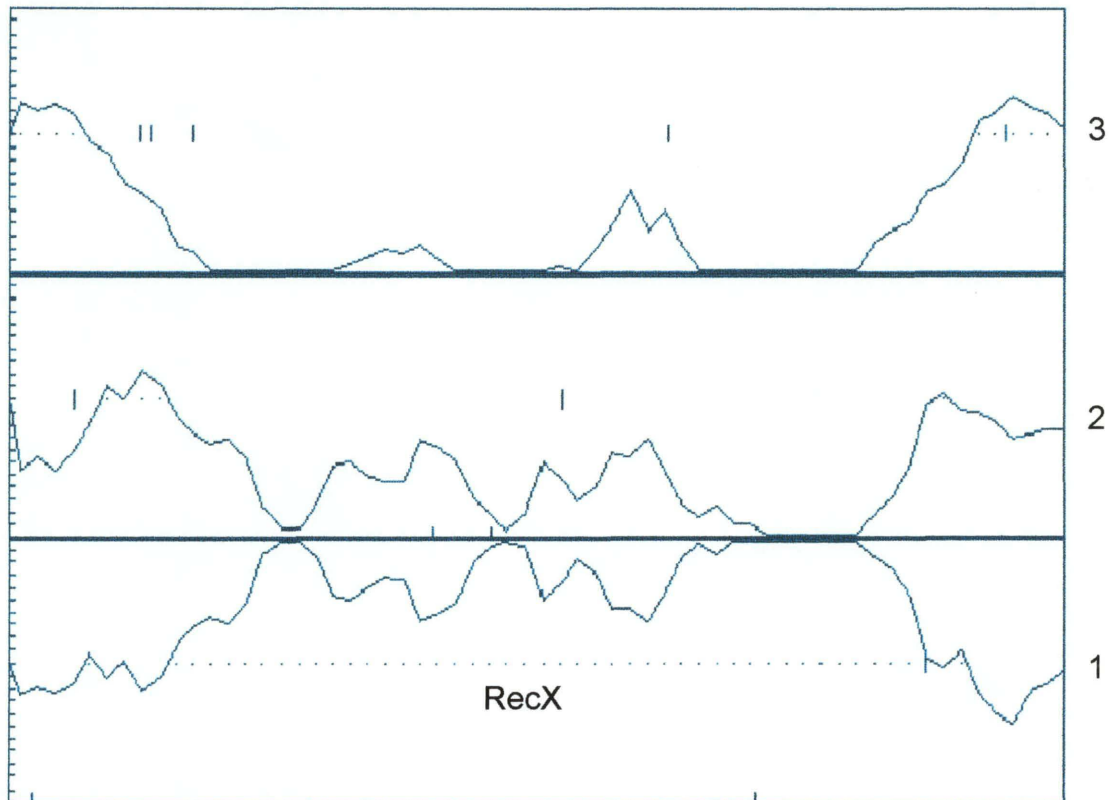
O códon de início de tradução está destacado em vermelho e o códon de parada está indicado (*). O sítio provável para ligação do ribossomo está destacado em azul. Uma sequência terminadora de transcrição está indicada por típicas repetições invertidas de nucleotídeos (verde).

Figura 4 Alinhamento de seqüências de aminoácidos de proteínas análogas ao RecX de *Herbaspirillum seropedicae*.

<i>P. aeruginosa</i>	MAIVLDTPVAVRRAAMDLLARREHGRAELSRKLRQRGASAELIDPALDRL
<i>P. fluorescens</i>	MTVVLDTLVAVRRTAMDLLARREHGRVELTRKLRQGAPEMIETALDRL
<i>H. seropedicae</i>	MP---RPPISLKARALKYLSREHSRLELGRKLAPYAQEGDDIEALLQWL
	* * . * . * * . * * * * . . * . * . . *
<i>P. aeruginosa</i>	AEEGLLDESRYLESFIASRARSGHGPLRIREELAQRGLPRADIERALGAC
<i>P. fluorescens</i>	TEEGLLSEARYLESFVSYRARSYGPARIREELSQRGLQRADIDLALREC
<i>H. seropedicae</i>	EQSRFLSQERFSESLVHRRAR-YGNQRILSELHGHGIEGEAIA-DLKAD
	. . * . * . * * . . * * * * * * . * . * * *
<i>P. aeruginosa</i>	EVDWSAQ-LREVWRRKFA-RLPQDAREKAQQARVLAYRGYSMESIMRLLN
<i>P. fluorescens</i>	GISWQSQ-LEDTWRRKFAGHLPIDARERAKQGRFLSYRGFSMDMISRLLS
<i>H. seropedicae</i>	LAAWRSERAAQVLRKFTAP-PADAE TRAKQMRFLQQRGF SHRSIREAFQ
	* . . . * * * . * * * . * . * * * * * * * * * . * . .
<i>P. aeruginosa</i>	GRS-DD----
<i>P. fluorescens</i>	GRDMDD----
<i>H. seropedicae</i>	TAWLDEDDPS
	* .

As seqüências de aminoácidos das proteínas traduzidas foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalV (Higgins e Sharp, 1989). Aminoácidos idênticos estão indicados por asteriscos e substituições conservadas por pontos.

Figura 5 Identificação de possíveis regiões codificadoras de proteínas pelo método de preferência posicional de bases.

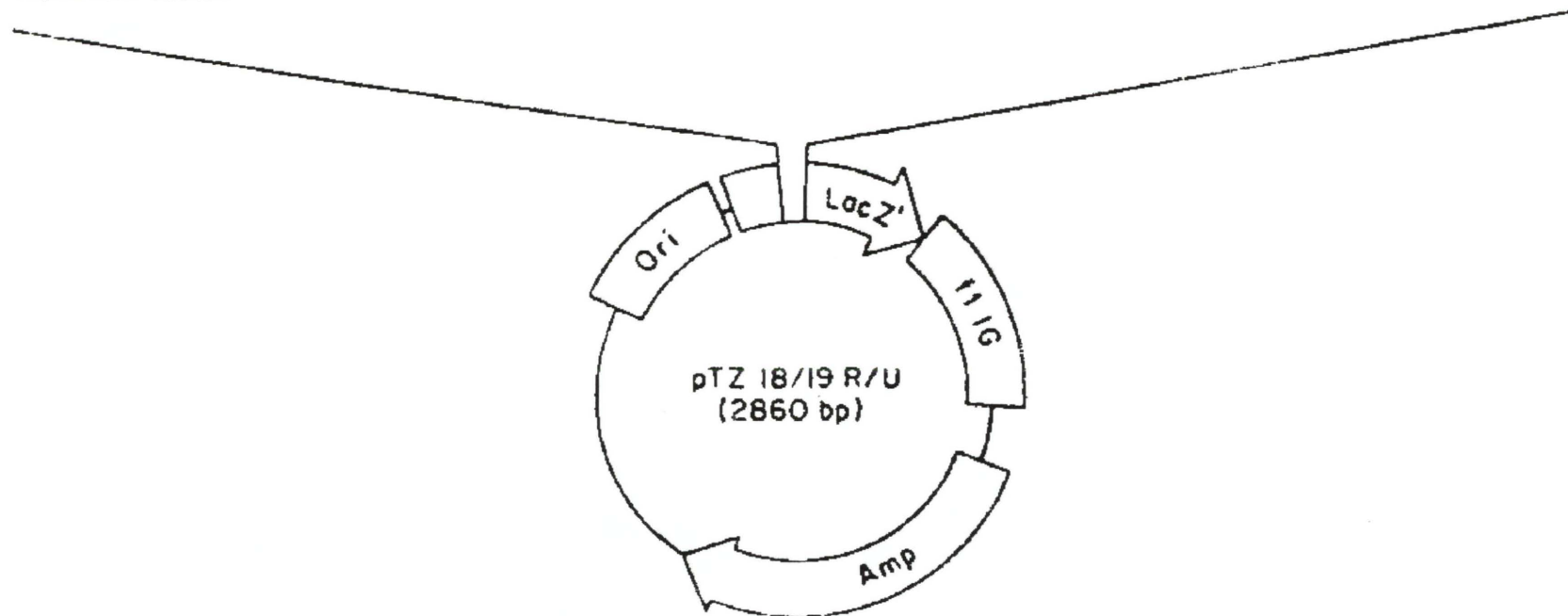


Os números 1, 2 e 3 representam as 3 fases de leitura possíveis. Onde os picos ultrapassam continuamente ao nível de 50% de probabilidade (linha tracejada), há a delimitação de regiões significativas (codificadoras de proteínas) e suas fases de leitura da proteína. Nesse nível também é assinalado por meio de barras verticais, a presença de códons de terminação. Na abscissa de cada fase de leitura, o programa assinala o códon de iniciação com pequenas barras verticais.

27 Figura 6 Desenho esquemático do plasmídeo pTZ19R.

```

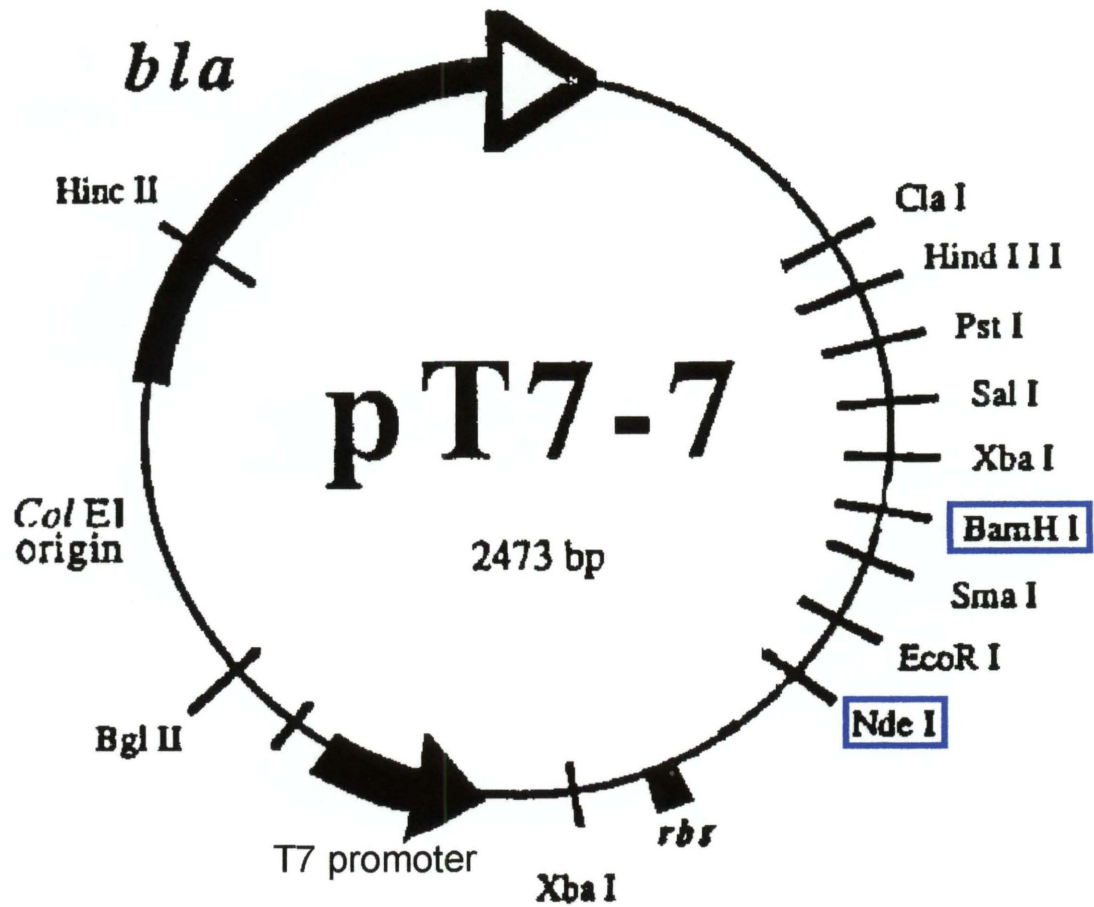
                                T7 PROMOTER  I  Hd  Sp  Ps  Sl  Xb  Ba  Sa  Kp  Sc  Ec  ← UNIVERSAL
                                                                SEQUENCING PRIMER
PTZ19U AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATAAGCACTCACTATAGGGAAAGCTTGCATCCCTGGCAGGTCCACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGCTCTTTAC
PTZ19R TTGTCGATACTGGTACTAATGGCGTTCCAGATTATCCCTGAGTGATATCCCTTTCGAAGCTACGGACCTCCAGCTGAGATCTCCTAGGGGCCCATGGCTCGAAGCTTAAGTCAGCCGGCAGCAAAATG
AACAGCTATGACCATG →
REVERSE
SEQUENCING PRIMER
    
```



Os sítios de restrição para as enzimas destacadas por um retângulo azul, foram aqueles utilizados para a clonagem de fragmentos neste vetor (MEAD *et al.*, 1986).

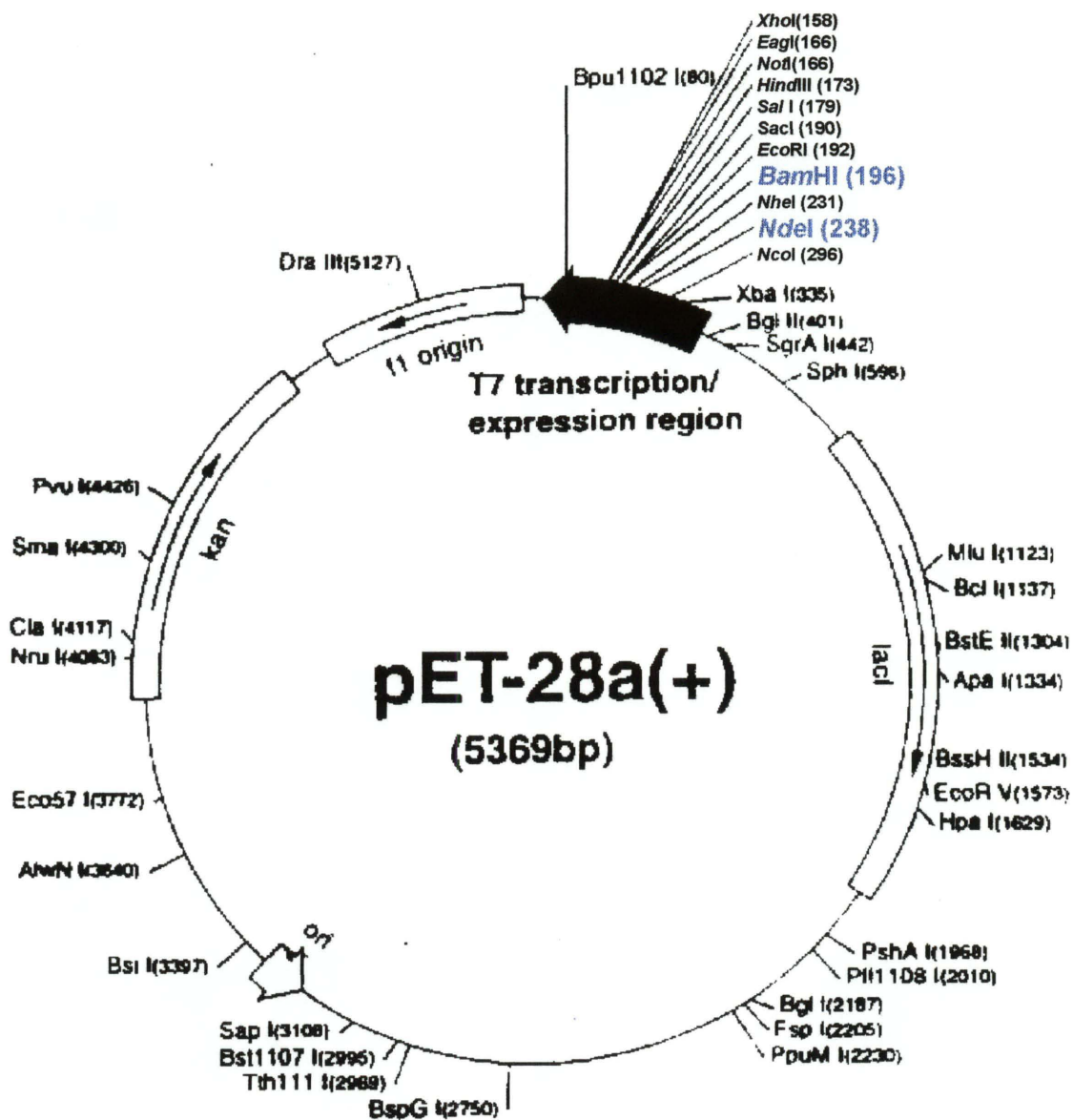
As enzimas de restrição indicadas são: Hd - *HindIII*, Sp - *SphI*, Ps - *PstI*, Sl - *Sall*, Xb - *XbaI*, Ba - *BamHI*, Sm - *SmaI*, Kp - *KpnI*, Sc - *Scal* e Ec - *EcoRI*.

Figura 7 Desenho esquemático do plasmídeo pT7-7.



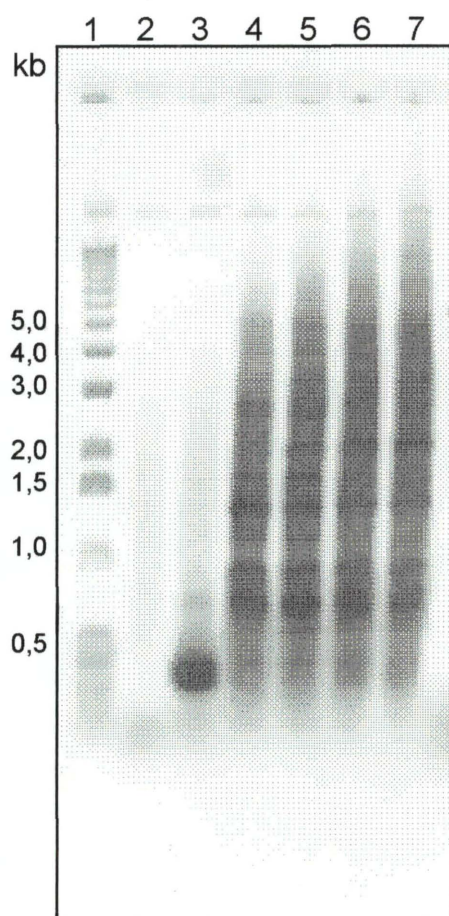
Os sítios de restrição para as enzimas destacadas por um retângulo azul, serão aqueles utilizados para a clonagem do gene *recX* (Biolabs).

Figura 8 Desenho esquemático do plasmídeo pET28a.



Os sítios de restrição para as enzimas destacadas em azul, serão aqueles utilizados para a clonagem do gene *recX* (Novagem).

Figura 9 Perfil eletroforético das reações de PCR testadas com diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio.



As amostras resultantes da reação de PCR utilizando diferentes concentrações de cloreto de magnésio foram aplicadas em gel de agarose 1%.

Colunas:

01 - 1 kb ladder

02 - Amostra PCR - 0,2 mmol/L de MgCl

03 - Amostra PCR - 0,25 mmol/L de MgCl

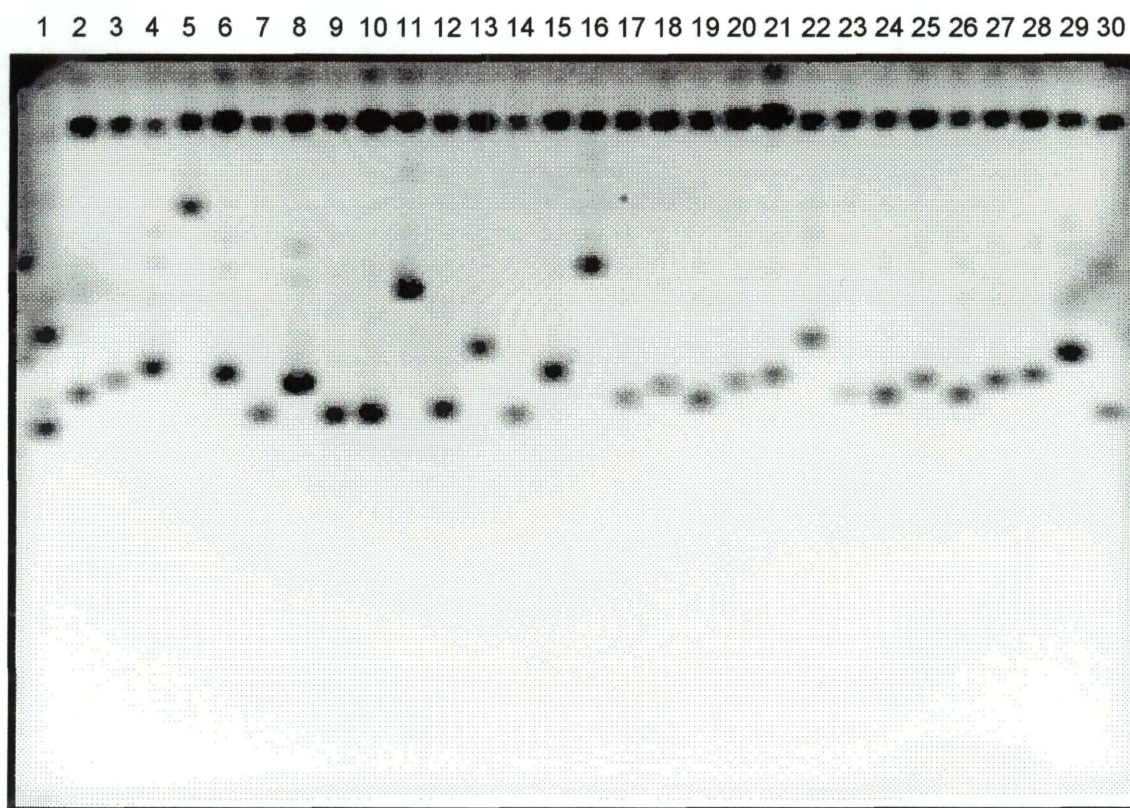
04 - Amostra PCR - 0,38 mmol/L de MgCl

05 - Amostra PCR - 0,5 mmol/L de MgCl

06 - Amostra PCR - 0,63 mmol/L de MgCl

07 - Amostra PCR - 0,75 mmol/L de MgCl

Figura 10 Perfil eletroforético dos prováveis clones após "Rapid Prep".

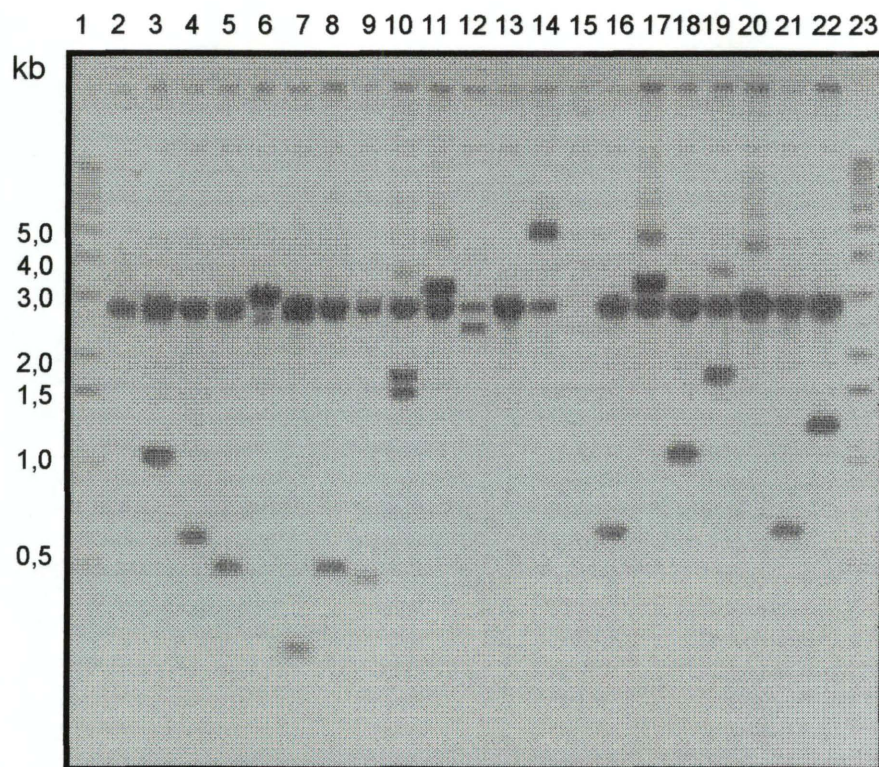


As células de *E. coli* DH10B foram crescidas em meio LB + Amp²⁵⁰. O perfil eletroforético dos plasmídeos recombinantes foi determinado em gel de ágar 1% após o isolamento pelo método de lise alcalina (2.8)

Colunas:

- | | |
|-------------------------------|----------------------|
| 01 - pTZ19R (controle) | 16 - clone 14 |
| 02 - clone 1 | 17 - clone 15 |
| 03 - clone 2 | 18 - clone 16 |
| 04 - clone 3 | 19 - clone 17 |
| 05 - clone 4 | 20 - clone 18 |
| 06 - clone 5 | 21 - clone 19 |
| 07 - clone 6 | 22 - clone 20 |
| 08 - clone 7 | 23 - clone 21 |
| 09 - clone 8 | 24 - clone 22 |
| 10 - clone 9 | 25 - clone 23 |
| 11 - clone 10 | 26 - clone 24 |
| 12 - clone 11 | 27 - clone 25 |
| 13 - clone 12 | 28 - clone 26 |
| 14 - pTZ19R | 29 - clone 27 |
| 15 - clone 13 | 30 - pTZ19R |

Figura 11 Perfil eletroforético dos prováveis clones (pTZ19R::*recX*) restritos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I em gel de ágar 1%.

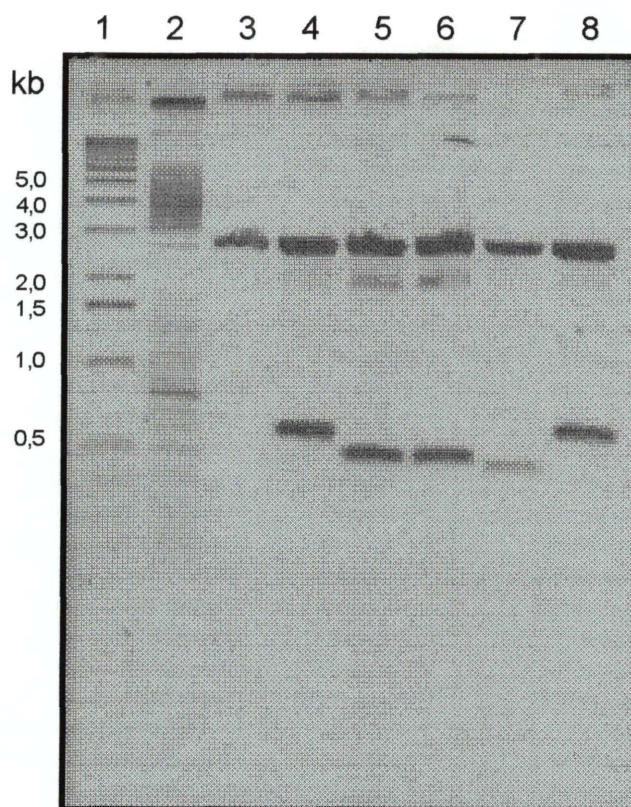


As células de *E. coli* DH10B foram crescidas em meio LB + Amp²⁵⁰. O perfil eletroforético dos plasmídeos recombinantes foi determinado em gel de ágar 1% após o isolamento pelo método de lise alcalina (2.8) e clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I.

Colunas:

- | | |
|-------------------------------|------------------------|
| 01 - 1 kb ladder | 16 - clone 35 |
| 02 - pTZ19R (controle) | 17 - clone 36 |
| 03 - clone 1 | 18 - clone 37 |
| 04 - clone 2 | 19 - clone 40 |
| 05 - clone 3 | 20 - clone 41 |
| 06 - clone 4 | 21 - clone 42 |
| 07 - clone 6 | 22 - clone 46 |
| 08 - clone 10 | 23 - 1kb ladder |
| 09 - clone 12 | |
| 10 - clone 28 | |
| 11 - clone 29 | |
| 12 - clone 30 | |
| 13 - clone 31 | |
| 14 - clone 33 | |
| 15 - clone 34 | |

Figura 12 Perfil eletroforético dos prováveis clones (pTZ19R::*recX*) restritos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I em gel de agarose 1%.



As células de *E. coli* DH10B foram crescidas em meio LB Amp²⁵⁰. O perfil eletroforético dos plasmídeos recombinantes foi determinado em gel de agarose 1% após o isolamento pelo método de lise alcalina (2.8) e clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I.

Colunas:

- 01** - 1 kb ladder
- 02** - 100pb ladder
- 03** - pTZ19R (controle)
- 04** - clone 2
- 05** - clone 3 (pCWG3)
- 06** - clone 10 (pCWG10)
- 07** - clone 12
- 08** - clone 42

4 CONCLUSÕES

- Há um gene tipo *recX* em *Herbaspirillum seropedicae*;
- Em *H. seropedicae*, o gene *recX* encontra-se adjacente e não sobreposto ao gene *recA*;
- Não há aparentemente a presença de nenhuma região promotora a montante do gene *recX*;
- A proteína RecX de *H. seropedicae* apresentou homologia com a proteína RecX de diferentes organismos;
- Um possível clone contendo o gene *recX* em pTZ19R está sendo analisado.

5 PERSPECTIVAS

Após sequenciar o gene *recX*, e analisá-lo quanto a sua estrutura e homologia, pretende-se:

- confirmar a clonagem do gene *recX* de *H. seropedicae* no vetor pTZ19R, através de reações de seqüenciamento;
- clonar o gene *recX* nos vetores de expressão, pT7-7 e pET28a, para posterior indução, purificação e caracterização da proteína RecX.

6 BIBLIOGRAFIA

- AMUNDSEN, S. K.; TAYLOR, A. F.; CHAUDHURY, A. M.; SMITH, G. R. *recD*: The gene for essential third subunit of exonuclease V. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 83, p. 5558-5562, 1986.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Intl. J. Sys. Bact.**, Washington, D.C., v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI J. I.; OLIVARES F.; DÖBEREINER J. Identification and Ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1991.
- BENELLI, E. M. Análise Funcional e estrutural da proteína controladora dos sistemas Ntr e Nif, a proteína PII de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1997, 187p. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, U.F.P.R.
- BERGER, S. L.; KIMMEL, A. R. (eds.) **Methods in Enzymology, guide to molecular cloning techniques**. London, Academic Press, v. 152, 1987, 812p.
- BETTER, M., HELINSKI, D.R. Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 155, p. 311-316, 1983.
- BIEK, D. P.; COHEN, S. N. Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 167, p. 594-603, 1986.
- BLANAR, M. A.; SANDLER, S. J.; ARMENGOD, M. E.; REAM, L. W.; CLARK, A. J. Molecular analysis of the *recF* gene of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 81, p. 4622-4626, 1984.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p. 195-209, 1995.
- BRENA-VALLE, M.; SERMENT-GUERRERO, J. SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. **Mutagenesis**, v. 13 (6), p. 637-641, 1998.
- BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M. XL1-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. **Biotechniques**, v. 5, p. 376-379, 1987.

- CAPALDO-KIMBAL, F.; BARBOUR, S. D. Involvement of recombination genes in growth and viability of *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 106, p. 204-212, 1971.
- CHAUSSEE, M. S.; WILSON, J.; HILL, S. A. Characterization of the *recD* gene of *Neisseria gonorrhoeae* MS11 and the effect of *recD* inactivation on pilin variation and DNA transformation. **Microbiol.**, Washington, D.C., v. 145 (2), p. 389-400, 1999.
- CHEN, I.; MICHEL, H.; Cloning, sequencing, and characterization of the *recA* gene from *Rhodospseudomonas viridis* and Construction of *recA* strain. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 180, p. 3227-3232, 1998.
- CLARK, A. J. *rec* genes and homologous recombination proteins in *Escherichia coli*. **Biochimie**, Paris, v. 73, p. 523-532, 1991.
- CLARK, A. J. Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* and other bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 7, p.67-86, 1973.
- CLARK, A. J.; MARGULIES, A. D. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 53, p. 451-459, 1965.
- COX, M. M.; LEHMAN, I.R. Enzymes of general recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 56, p. 229-262, 1987.
- CROES, C., VANDERLEYDEN, J. MICHELES, K. Construction of *na Azospirillum brasilense* Sp7 *recA* mutant. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 223, p.152-155, 1990.
- DE MOT, R.; SCHOOF, G.; VANDERLEYDEN, J. A putative regulatory gene downstream of *recA* is conserved in Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 1313-1314, 1994.
- DUTREIX, M., MOREAU, P.L.; BAILONE, A., GALIBERT, F.; BATTISTA, J.R.; WALKER, G.C.; DEVORET, R. New *recA* mutations that dissociate the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role for RecA protein in UV mutagenesis. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 171, 2415-2423, 1989.
- ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. **Annu. Ver. Genet.**, v. 26, p. 479-506, 1992.
- FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 171, 3168-3175, 1989.
- GILLEN, J. R.; WILLIS, D. K.; CLARK, A. J. Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 145, p. 521-532, 1981.

- GRANT, S. G.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R., HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 87(12), p. 4645-4649, 1990.
- HALL, S.D.; KANE, M. F.; KOLODNER, R. D. Identification and characterization of *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the *recE* region that promotes renaturation of homologous single-strand DNA. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 175, p. 277-287, 1993.
- HERRERACERVERA, J. A.; RODRIGUEZALONSO, F.I.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. Evaluation of *recA*-based containment system in *Rhizobium meliloti* GR4. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22 (1), p. 49-56, 1997.
- HIGGINS, D. G.; SHARP, P. M. Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on microcomputer. **Gene**, v. 73, p. 237-244, 1988.
- KARLIN, S.; WEINSTOCK, G. M.; BRENDDEL, V. Bacterial classifications from RecA protein sequence comparison. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 177, p. 6881-6893, 1995.
- KLASSEN, G. Contribuição à fisiologia da fixação de nitrogênio em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1994, 114p. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, U.F.P.R.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Nitrogen fixation genes contiguous to the *nifHDK* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. In: 12th International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguaçu, 1999.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 165-170, 1999.
- KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In Brown, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, Oxford: IRL Press, 1991, p.185-208.
- KOKJOHN T.A.; MILLER, R.V. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v.163, p. 568-572, 1985.
- LITTLE, J. W. Autodigestion of LexA and phage λ repressors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 81, p. 1375-1379, 1984.
- LITTLE, J. W.; MOUNT, D. W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. **Cell**, Cambridge, v. 29, p. 11-22, 1982.

- LOVETT, S. T.; CLARK, A. V. Genetic analysis of *recJ* gene of *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 157, p. 190-196, 1984.
- LOVETT, S. T.; KOLODNER, R. D. Identification and purification of a single strand DNA specific exonuclease encoded by *recJ* gene of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 86, p. 2627-2631, 1989.
- MACHADO, I. M.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M. and PEDROSA, F. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29 (12), p. 1599-1602, 1996.
- MADIRAJU, M. V. V. S.; CLARK, A. J. Evidence for ATP binding by *Escherichia coli* RecF protein. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 174, p. 7705-7710, 1992.
- MAHDI, A. A.; McGLYNN, P.; LEVETT, S. D.; LLOYD, R. G. DNA binding and helicase domains of *Escherichia coli* recombination protein RecG. **Nucleic Acid. Res.**, 25(19), p. 3875-3880, 1997.
- MARSIC, N.; ROJE, S.; STOJILJKOVIC, I.; SALAJ-SMIC, E.; TRGOVCEVIC, Z. In vivo studies on interaction of RecBCD enzyme and λ Gam protein. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 175, p. 4738-4743, 1993.
- MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single-stranded DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Engineering**, Oxford, v. 1, p. 67-74, 1986.
- MESSING, J.; GRONERENBORN, B.; MULLER-HILL, B.; HOFSCHEIDER, P. H. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *HindIII* fragment of *lac* regulatory region in M13 replicative form "in vitro". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 74, p. 3642-3646, 1977.
- MILES, C.A.; MOUNTAIN, A.; SASTRY, G.R. Cloning and characterization of the *recA* gene of *Agrobacterium tumefaciens*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 204, p. 161-165, 1986.
- MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992, 456p.
- MONTEIRO, R. A. Expressão e Caracterização dos domínios Central+C-Terminal da Proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1998, 126p. **Tese** (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, U.F.P.R.

- NOHMI, T.; BATTISTA, J. R.; DODSON, L.A.; WALKER, G. C. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: Mechanistic relationship between transcriptional depression and postranslational activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 85, p. 1816-1820, 1988.
- PAPAVINASASUNDARAM, K. G.; COLSTON, M. J.; DAVIS, E. O. Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 30(3), p. 525-534, 1998.
- PAPAVINASASUNDARAM, K. G.; MOVAHEDZADEH, F.; KEER, J. T.; STOKER, N. G.; COLSTON, M. J.; DAVIS, E. O. Micobacterial *recA* is cotranscribed with a potencial regulatory gene called *recX*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 24, p. 141-153, 1997.
- REGO, F. G. M. Seqüenciamento do *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização da sua região promotora. Curitiba, 1997, 143p. **Tese** (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, U.F.P.R.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed., New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANO, Y. Role of *recA*-related gene adjacent to the *recA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 175, p. 2451-2454, 1993.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER. A broad host range mobilization system for "in vivo" genetic engeneering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Tecnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.
- SMITH, G.R. Homologous recombination in procaryotes. **Microbiol. Ver.**, Washington, D.C., v. 52, p. 1-28, 1988.
- SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 425-429, 1991a.
- SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1511-1522 1991b.

- STEFFENS, M. B. R. Clonagem, Isolamento e Caracterização do gene *recA* de *Herbaspirillum seropedicae* Estirpe Z78. Curitiba, 1994, 221p. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, U.F.P.R.
- STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; PEDROSA, F. O. Cloning of *recA*-like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 39, p. 1096-1102, 1993.
- UMEZU, K.; CHI, N. W.; KOLODNER, R. D. Biochemical interaction of *Escherichia coli* RecF, RecO and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 90, p. 3875-3879, 1993.
- UMEZU, K.; CHI, N. W.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, H. *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, D.C., v. 87, p. 5363-5367, 1990.
- WALKER, G.C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiol. Ver.**, Washington, D.C., v. 48, p. 60-93, 1984.
- WEST, S. C. Protein-DNA interactions in genetic recombination. **Trends Genet.**, Cambridge, p. 8 -13, 1988.
- WILLETS, N. S.; CLARK, A. J. ;LOW, B. Genetic location of certain mutation conferring recombination deficiency in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, D.C., v. 97, p. 244-249, 1969.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.), **Biological Nitrogen Fixation**, New York, Chapman and Hall, p. 43-86, 1992.

ANEXO 1 - Comparação do uso de códons de *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense* e *Escherichia coli* (Souza, 1990)

Resíduo e códon	% de uso			Resíduo e códon	% de uso		
	Hs	Ab	Ec		Hs	Ab	Ec
Phe TTT	17	3	44	Tyr TAT	29	10	41
Phe TTC	83	97	56	Tyr TAC	71	90	59
Leu TTA	2	0	6	*	0	25	88
Leu TTG	22	1	8	*	0	0	4
Leu CTT	2	2	9	His CAT	47	9	39
Leu CTC	17	26	7	His CAC	53	91	61
Leu CTA	3	0	2	Gln CAA	32	3	27
Leu CTG	55	71	69	Gln CAG	68	97	73
Ile ATT	25	3	37	Asn AAT	35	9	24
Ile ATG	69	97	62	Asn AAC	65	91	76
Ile ATA	6	0	1	Lys AAA	21	2	77
Met ATG	100	100	100	Lys AAG	79	98	23
Val GTT	4	6	38	Asp GAT	42	4	51
Val GTC	37	54	13	Asp GAC	58	96	49
Val GTA	14	0	23	Glu GAA	55	28	73
Val GTG	46	40	27	Glu GAG	45	72	27
Ser TCT	0	2	27	Cys TGT	40	0	42
Ser TCC	25	31	26	Cys TGT	60	100	58
Ser TCA	6	0	8	*	100	75	8
Ser TCG	33	47	11	Trp TGG	100	100	0
Pro CCT	6	0	9	Arg CGT	26	6	58
Pro CCC	36	16	6	Arg CGC	51	81	35
Pro CCA	9	0	20	Arg CGA	0	0	2
Pro CCG	48	84	65	Arg CGG	21	11	3
Thr ACT	13	2	24	Ser AGT	17	0	6
Thr ACC	69	76	51	Ser AGC	19	20	22
Thr ACA	3	2	6	Arg AGA	2	0	1
Thr ACG	16	20	20	Arg AGG	0	2	<1
Ala GCT	5	5	28	Gly GGT	18	15	48
Ala GCC	67	70	19	Gly GGC	66	82	41
Ala GCA	5	0	23	Gly GGA	6	0	5
Ala GCG	23	25	30	Gly GGG	10	3	7