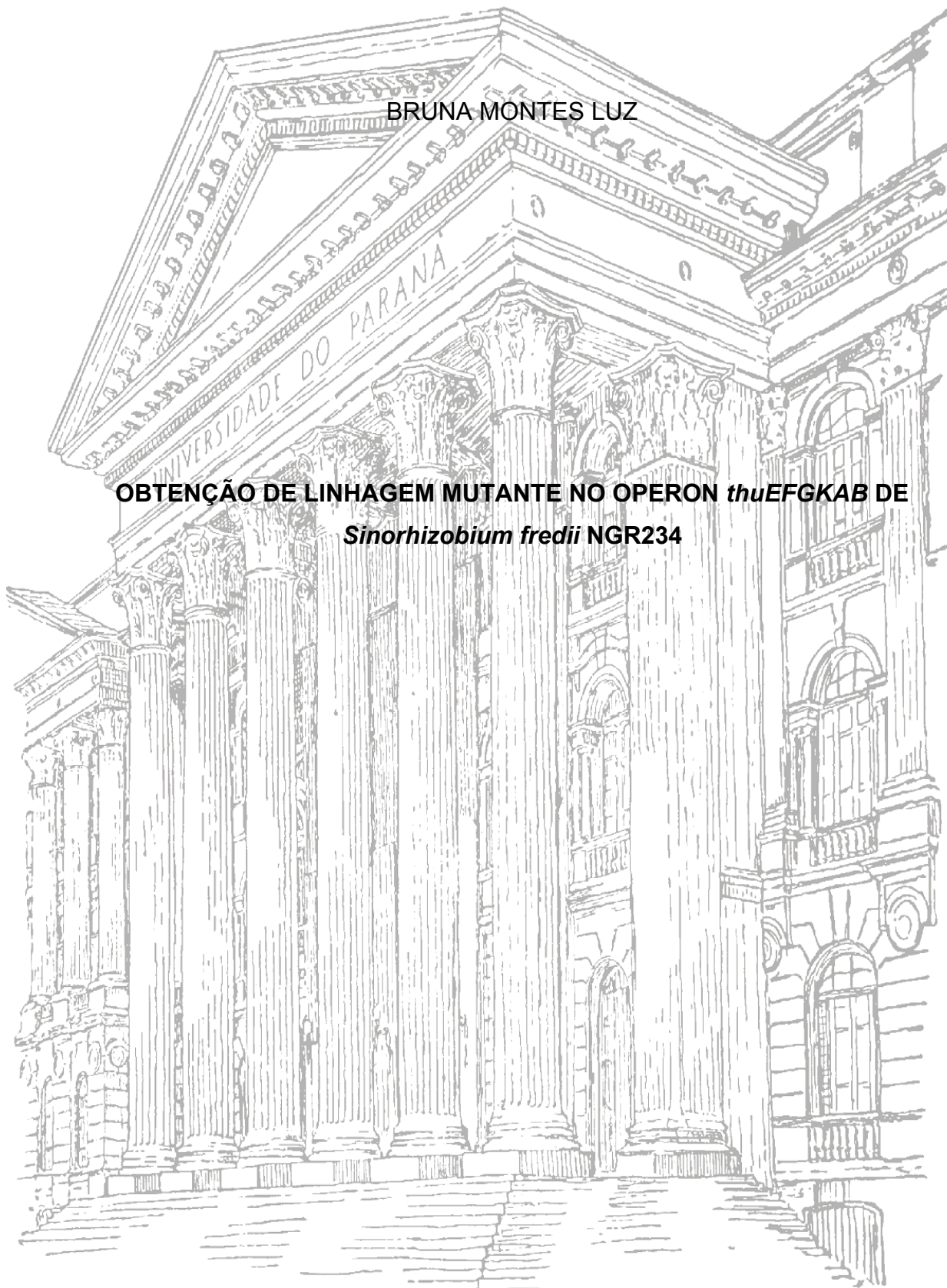


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA MONTES LUZ

**OBTENÇÃO DE LINHAGEM MUTANTE NO OPERON *thuEFGKAB* DE  
*Sinorhizobium fredii* NGR234**



CURITIBA

2016

BRUNA MONTES LUZ

**OBTENÇÃO DE LINHAGEM MUTANTE NO OPERON *thuEFGKAB* DE  
*Sinorhizobium fredii* NGR234**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Roseli Wassem

CURITIBA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço imensamente à professora Roseli Wassem, que esteve ao meu lado durante todo o processo, tanto nas partes difíceis quanto nas partes boas, e se fez totalmente disponível para me ajudar. O esforço valeu a pena e o aprendizado será para a vida toda.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, sempre presentes para compartilhar alegrias e angústias, dias bons e dias ruins, e comemorar as realizações de todos que participam da nossa rotina.

Aos meus amigos, que me apoiaram em dias de cansaço e sempre conseguem arrancar sorrisos quando eu mais preciso.

Aos meus pais, que sempre valorizaram minha educação e sempre me apoiaram para eu seguir fazendo o que amo. Eu amo vocês.

E principalmente ao meu noivo Alexandre, que está sempre ao meu lado e compreende os fins de semana no laboratório, as noites passadas escrevendo e o cansaço constante, além de sempre comemorar as pequenas vitórias ao meu lado.

## RESUMO

Bactérias fixadoras de nitrogênio são organismos amplamente estudados devido à sua importância na agricultura e capacidade de estabelecer simbiose com leguminosas. Elucidar a sua interação com o ambiente e seu uso de recursos é essencial para entender os fatores que contribuem ou atrapalham a interação planta-bactéria. *Sinorhizobium fredii* NGR234 é uma bactéria diazotrófica muito estudada devido a seu amplo espectro de hospedeiros. O presente trabalho teve como objetivo obter uma linhagem mutante no operon *thuEFGKAB* de NGR234, responsável pela utilização e metabolização de trealose. A trealose é um dissacarídeo que pode ser utilizado como fonte de carbono pela bactéria mas que também pode ser sintetizado a partir de outras fontes de carbono no seu interior, num mecanismo não bem compreendido. Foram utilizadas técnicas de biologia molecular para a obtenção de um clone contendo as regiões que flanqueiam o operon. Os fragmentos foram obtidos por PCR e foi feita uma clonagem molecular em pTZ57R dos dois fragmentos. Esses fragmentos foram posteriormente clivados com enzimas de restrição, ligados e amplificados por PCR. O fragmento ligado foi então clonado em um plasmídeo suicida, pSUP202, que pode ser inserido no genoma de NGR234. São necessários estudos adicionais para elucidar a função do operon na nodulação, envolvendo análise fenotípica através de testes de nodulação com a linhagem de NGR234 mutante.

Palavras-chave: *Sinorhizobium fredii* NGR234. Clonagem molecular. Trealose. Operon *thuEFGKAB*.

## ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria are broadly researched organisms due to their agricultural importance and ability to establish symbiosis with legumes. Studying their interaction with the environment and their use of resources is essential to the understanding of the factors that contribute to or disrupt the plant-bacteria interaction. *Sinorhizobium fredii* NGR234 is a well-studied diazotroph because of its broad host range. This work aims to obtain a mutant lineage in NGR234's operon *thuEFGKAB*, which plays an important role in the use and metabolism of trehalose. Trehalose is a disaccharide that can be used as a carbon source for the bacteria but that can also be synthesized from other carbon sources inside the bacteria, in a not well-described mechanism. Molecular Biology techniques were used to clone fragments flanking the operon. Two fragments were obtained by PCR and cloned in pTZ57R. These fragments were later cleaved, ligated to each other and amplified by PCR. This new fragment was then transferred into a suicide plasmid, pSUP202, which can be inserted into NGR234's genome. Further research is needed to clarify the operon's role in nodulation, involving phenotypic analysis through nodulation assays with the mutant strain.

Keywords: *Sinorhizobium fredii* NGR234. Molecular Cloning. Trealose. *thuEFGKAB* operon.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
2.1	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	7
2.2	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 .....	9
2.3	TRANSPORTADORES ABC .....	9
2.4	OPERON <i>thuEFGKAB</i> .....	11
2.5	TREALOSE.....	12
2.6	MOTIVAÇÃO .....	14
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
3.1	GERAL.....	15
3.2	ESPECÍFICOS.....	15
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	16
4.2	AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE .....	16
4.3	CLONAGEM MOLECULAR NO VETOR pTZ57R .....	17
4.3.1	PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES .....	18
4.3.2	TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO.....	19
4.4	SELEÇÃO POR ALFA COMPLEMENTAÇÃO .....	19
4.5	PCR DE COLÔNIA.....	20
4.6	MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO .....	20
4.7	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	21
4.8	OBTENÇÃO DE FRAGMENTO I-IV .....	21
4.9	CLONAGEM MOLECULAR EM pSUP202.....	22
4.10	SELEÇÃO POR SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICO .....	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
5.1	AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS I-II E III-IV.....	24
5.2	OBTENÇÃO DE CLONES I-II E III-IV.....	25
5.3	OBTENÇÃO DO FRAGMENTO I-IV.....	27
5.4	OBTENÇÃO DE CLONE I-IV.....	28
5.5	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	30
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A interação entre plantas e bactérias é um processo importante para diversas plantas, que se beneficiam da fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias diazotróficas para obter uma maior quantidade de nitrogênio disponível para seu uso. Essas bactérias podem sobreviver em vida livre e também em simbiose com certas plantas. As plantas capazes de ser invadidas por essas bactérias e estabelecer o processo de simbiose são limitadas, dependendo de sinais trocados pela planta e pelas bactérias.

*Sinorhizobium fredii* NGR234 é uma bactéria capaz de estabelecer simbiose com diversas espécies de leguminosas, sendo assim um organismo modelo para estudos de pesquisa básica do processo de interação entre plantas e bactérias. Por ser capaz de formar nódulos em leguminosas presentes na nossa alimentação, como o feijão, existe um interesse econômico para que a produtividade de tais plantas aumente. Para que isso seja possível, deve-se entender primeiramente tanto a biologia básica da planta quanto a da bactéria, bem como as mudanças que ocorrem quando ambas interagem.

A captação e utilização de fontes de carboidrato pela bactéria tanto em vida livre quanto em simbiose com plantas é essencial para a sobrevivência do organismo. A trealose é um dos carboidratos utilizados por NGR234, e os genes contidos no operon *thuEFGKAB* são responsáveis pela sua utilização como fonte de carbono. Sua função tanto em plantas e em bactérias ainda não é bem compreendida. O entendimento do papel desses genes na formação de nódulos em leguminosas é essencial para o entendimento mais completo do processo de nodulação. A elucidação da função do operon na nodulação pode ser obtida através da remoção dos genes do genoma de NGR234 e consequente análise fenotípica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

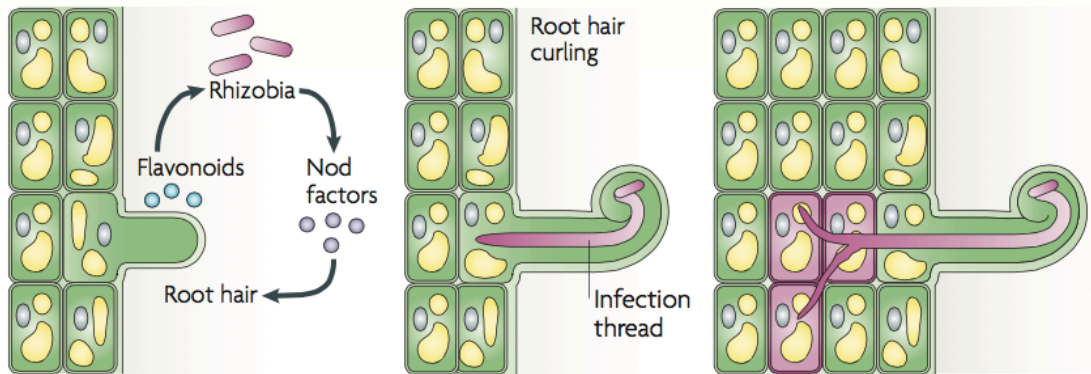
### 2.1 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Algumas bactérias são capazes de interagir com plantas em um processo que beneficia tanto a bactéria quanto a planta. A maioria das bactérias capazes de estabelecer essa simbiose são chamadas de rizóbios, por pertencerem aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*. Elas são bactérias Gram-negativas do solo capazes de interagir com espécies de plantas leguminosas e com a árvore *Parasponia andersonii* (GUALTIERI; BISSELING, 2000).

Para que essa interação seja estabelecida, vários sinais provenientes tanto da planta quanto das bactérias são necessários. O primeiro sinal reconhecido para que o processo de simbiose comece é a liberação de flavonoides, compostos aromáticos produzidos pela planta. Proteínas bacterianas chamadas de NodD são capazes de reconhecer esses flavonoides, ativando a expressão de genes envolvidos com a nodulação. Esses genes produzem fatores Nod, moléculas importantes no mecanismo de simbiose. A proximidade das bactérias com os pelos radiculares das plantas faz com que haja a deformação desses pelos, induzida pelos fatores Nod (JONES et al, 2007).

A formação do nódulo requer que as bactérias atuem mitoticamente algumas células da raiz, que formam o primórdio de nódulo. Além disso, as bactérias devem entrar na planta para infectar as células primordiais. O processo começa com a deformação dos pelos radiculares, onde a parede celular é hidrolisada, a membrana plasmática invagina-se e uma nova parede celular é formada no local da infecção. Desse modo, uma estrutura tubular chamada de cordão de infecção é formada para que a bactéria entre na planta (GUALTIERI; BISSELING, 2000). A FIGURA 1 mostra a invasão dos pelos radiculares por rizóbios.

FIGURA 1 – INVASÃO DE PELOS RADICULARES POR RIZÓBIOS E FORMAÇÃO DO CORDÃO DE INFECÇÃO



FONTE: Adaptada de DEAKIN & BROUGHTON (2009).

Assim que o cordão de infecção é formado, ele passa a colonizar várias células corticais, que continuam se multiplicando até formar o primórdio de nódulo. Dentro dessas células, tanto a bactéria quanto as células vegetais sofrem adaptações morfológicas e fisiológicas culminando numa estrutura chamada de simbiossomo. Os procariontos diferenciados no interior da célula são denominados bacteroides, capazes de realizar a fixação de nitrogênio, expressando a enzima nitrogenase. O nitrogênio fixado é, então, transportado para as células vegetais e pode ser utilizado pela planta (JONES *et al.*, 2007).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo realizado por organismos diazotróficos, capazes de converter nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser utilizada por plantas. É um processo de significativa importância na agricultura mundial, pois a disponibilidade de nitrogênio utilizável pelas plantas é um fator limitante na produtividade da cultura agrícola. Além disso, tem grande impacto ambiental. Fertilizantes químicos, amplamente utilizados, são considerados a maior interferência humana no ciclo do nitrogênio, pois o seu uso aumenta as emissões de óxidos de nitrogênio, a acidificação do solo e a eutrofização da água. Por outro lado, o nitrogênio fixado é menos vulnerável à lixiviação e a volatilização, por ser utilizado *in situ*, contribuindo com a sustentabilidade da agricultura (DIXON; KAHN, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio pode ser realizada apenas por procariontos. Em alguns casos, esses organismos são capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas. Nesse caso, um novo órgão é formado, chamado de nódulo, onde a bactéria fica alojada intracelularmente. Dentro das células, as bactérias produzem a enzima nitrogenase, capaz de converter dinitrogênio em amônia.

## 2.2 *Sinorhizobium fredii* NGR234

*Sinorhizobium fredii* NGR234 é uma alfaproteobactéria Gram-negativa presente no solo, capaz de realizar fixação biológica de nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas. A estirpe NGR234 de *S. fredii* é amplamente estudada por possuir a maior variedade de hospedeiros conhecida entre os microssimbiontes (KRYSCIAK *et al.*, 2014). Ela é capaz de infectar e formar nódulos em mais de 112 gêneros de leguminosas (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999). Por essa grande promiscuidade, se tornou um organismo modelo em estudos de nodulação.

NGR234 possui um genoma de 6,9 milhões de pares de bases, divididos em três replicons. O cromossomo possui genes que codificam para a maioria das funções necessárias para o crescimento celular, enquanto o megaplasmídeo pNGR234b possui poucos genes essenciais, e o plasmídeo simbiótico pNGR234a não possui nenhum gene necessário para o crescimento (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Entretanto, a ausência de pNGR234a faz com que a bactéria não seja mais capaz de nodular nenhum de seus hospedeiros (MORRISON *et al.*, 1983), mostrando quão essencial o papel de pNGR234a é na nodulação.

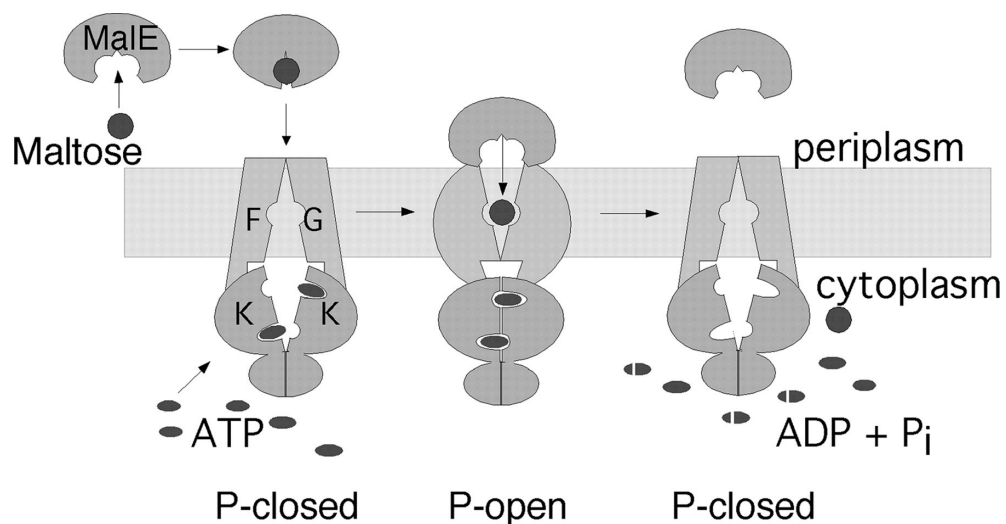
O megaplasmídeo pNGR234b possui genes que codificam para vários transportadores, importantes para que a bactéria seja capaz de sobreviver e crescer em diferentes condições ambientais e nutricionais. A maioria desses transportadores são do tipo ABC (ATP-binding cassette) e 50% de todos os transportadores de NGR234 estão contidos em pNGR234b (SCHMEISSER *et al.*, 2009).

## 2.3 TRANSPORTADORES ABC

Transportadores são importantes para a sobrevivência dos organismos vivos por mediar a captação de nutrientes e metabólitos, permitindo que as células tenham permeabilidade seletiva. Os transportadores ABC são transportadores ativos primários, dependentes da hidrólise de ATP, que realizam o transporte de substâncias contra o seu gradiente de concentração. Eles medeiam a captação de nutrientes em procariotos. Os substratos transportados são altamente diversos, podendo ser monossacarídeos, oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, ferro-sideróforos, metais, cátions de poliamina, opinas e vitaminas. A maioria dos transportadores ABC dependem da presença de uma

proteína que se liga ao substrato, localizada no espaço periplasmático entre a membrana interna e externa de bactérias Gram-negativas. Essa proteína, quando acoplada ao substrato, interage com o transportador e estimula sua atividade de ATPase. O transportador é composto por duas subunidades F e G localizadas na membrana, e duas subunidades iguais que se ligam ao ATP, denominadas de K, no interior da célula. Como se pode observar na FIGURA 2, quando a proteína que se liga ao substrato interage com o transportador, ele muda de conformação e há hidrólise de ATP, permitindo o transporte do substrato (DAVIDSON *et al.*, 2008).

FIGURA 2 – MODELO DE TRANSPORTADOR ABC DE MALTOSE



FONTE: DAVIDSON *et al.* (2008).

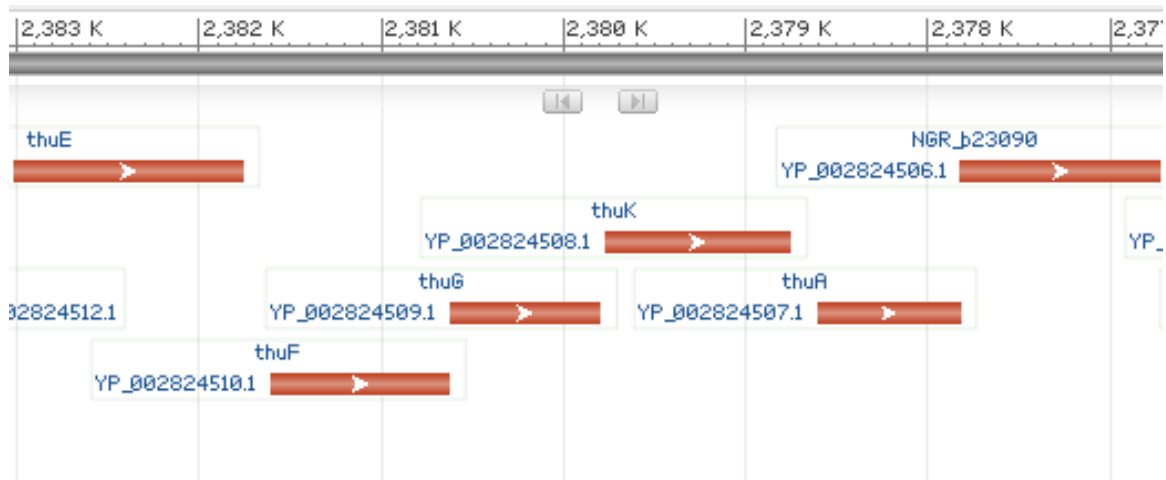
NGR234 é capaz de crescer com apenas uma fonte de carbono e energia, sendo ela trealose, maltose, sacarose, glucose, arabinose, outros dissacarídeos, ou ainda ácidos orgânicos (GLENN; DILWORTH, 1981). Para que esses açúcares sejam utilizados, é necessário que eles sejam transportados para o citoplasma. Um dos transportadores presentes em NGR234 é similar àquele encontrado em *Sinorhizobium meliloti*, descrito por JENSEN, PETERS e BHUVANESWARI (2002), e é responsável pelo transporte principalmente de trealose e maltose para dentro da célula. O operon *thuEFGK* de *S. meliloti* contém os genes que codificam para as proteínas que formam esse sistema de transporte ABC. Esse sistema é induzível por trealose, o que sugere que ela seja o seu substrato principal (JENSEN; PETERS; BHUVANESWARI, 2002).

## 2.4 OPERON *thuEFGKAB*

NGR234 possui genes homólogos aos *thuEFGK* de *S. meliloti*, que aparentam também estar organizados em um operon, indicando que eles têm estruturas e funções semelhantes àsquelas de *S. meliloti*, devido à grande similaridade e identidade de suas sequências (NCBI, 2016). Esses genes têm a mesma nomenclatura de *S. meliloti* em NGR234. Segundo informações disponíveis no NCBI, o gene *thuE* codifica para a proteína que se liga ao substrato (trealose ou maltose), enquanto *thuG* e *thuF* codificam para permeases e *thuK* para a subunidade que se liga a ATP.

Os genes *thuA* e *thuB* de *S. meliloti*, descritos por JENSEN et al (2005) também fazem parte do mesmo operon, formando o operon *thuEFGKAB*. Em *S. meliloti*, esses genes codificam para proteínas necessárias para o catabolismo de trealose. Quando esses genes foram inativados, *S. meliloti* foi incapaz de crescer em meio com trealose. Como *thuEFGK*, os genes *thuAB* também são induzíveis por trealose (JENSEN et al, 2005). Em NGR234, os genes *thuA* e *NGR\_b23090* (chamado de *thuB* a partir daqui por sua semelhança ao gene de *S. meliloti*) também parecem ser parte do mesmo operon que *thuEFGK*, e têm alta similaridade e identidade a *thuAB* de *S. meliloti*. Próximo a esse operon, está localizado o gene *thuR*, um regulador de transcrição da família LacI, que pode ser responsável por regular a expressão do operon. A FIGURA 3 mostra a organização dos genes no pNGR234b.

FIGURA 3 – GENES *thuE*, *thuF*, *thuG*, *thuK*, *thuA* e *NGR\_b23090* (*thuB*) ILUSTRADOS DE ACORDO COM SUAS POSIÇÕES EM pNGR234b.



FONTE: NCBI (2016)

## 2.5 TREALOSE

A trealose é um dissacarídeo não redutor amplamente distribuído na natureza, encontrado em uma grande variedade de organismos, tanto procariotos quanto eucariotos, como bactérias, plantas e mamíferos. Em procariotos, pode ser utilizada como fonte de carbono, ser um componente estrutural e ter função osmoprotetora. Sua função mais bem explorada e estudada é a sua capacidade de proteção contra o stress (ARGÜELLES, 2000).

Na nodulação de *Glycine max* por *Rhizobium japonicum*, Reibach e Streeter (1983) foram capazes de concluir que a sacarose é o carboidrato predominante inicialmente no nódulo após a fixação de CO<sub>2</sub> pela planta e subsequente transporte até o nódulo, mas, que, horas depois, a quantidade de trealose torna-se maior do que a de sacarose. A sacarose, portanto, é um dos principais compostos que entram no bacteroide ou que são rapidamente sintetizados no bacteroide. Como o aumento da proporção de trealose é concomitante com a diminuição da proporção de sacarose, conclui-se que a trealose é sintetizada no bacteroide a partir da sacarose.

Em nódulos de diversas espécies de rizóbios, a trealose é armazenada durante seu desenvolvimento, e é o carboidrato presente em maiores quantidades em bacteroides, independentemente da fonte de carbono e de nitrogênio fornecida (STREETER, 1985).

Além da capacidade de sintetizar trealose a partir de outros carboidratos, NGR234 também é capaz de metabolizar esse dissacarídeo e utilizá-lo como fonte de carbono. Em plantas e fungos, valinomicina A é inibidor da trealase, enzima que faz a metabolização desse carboidrato. Entretanto, essa substância não inibe a utilização da trealose como fonte de carbono por NGR234 em vida livre (BOBOYE, 2004).

No passado, achava-se que a trealose não tinha um papel importante no metabolismo das plantas, por estar presente em baixas quantidades, principalmente em angiospermas (LUNN *et al.*, 2014). Seu precursor, trealose-6-fosfato (T6P), por outro lado, parece ter um papel central no controle do metabolismo de carboidrato em plantas (PONNU *et al.*, 2011). Há evidências de que a habilidade de *Arabidopsis thaliana* de utilizar sacarose aumenta quando há maior concentração de T6P (SCHLUEPMANN *et al.*, 2004). Além disso, há uma forte relação entre a concentração de sacarose e a de T6P. Então, a concentração de T6P indiretamente reflete as concentrações de sacarose e é aceita como um indicador do status de sacarose em plantas. Entretanto, ainda não se sabe exatamente a função desse dissacarídeo em plantas (LUNN *et al.*, 2006).

Também não se acredita que a trealose tenha função protetora contra estresse hídrico, osmótico ou térmico, por sua baixa concentração encontrada em tecido vegetal. Todavia, em simbiose com rizóbios, a maior produção de trealose nos nódulos pode conferir à planta resistência ao estresse. Plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com *Rhizobium etli* com superexpressão de trealose-6-fosfato sintase (TPS), enzima essencial para a produção de trealose, mostraram formação de mais nódulos, com maior atividade de nitrogenase e maior biomassa do que plantas inoculadas com *R. etli* selvagem. Em situação de estresse hídrico, as plantas inoculadas com *R. etli* superexpressando TPS também mostraram uma resistência muito maior à falta de irrigação. Quando a irrigação foi retomada, 97% das plantas inoculadas com *R. etli* com superexpressão de TPS foram capazes de se recuperar, enquanto apenas 7% daquelas inoculadas com a linhagem selvagem sobreviveram (SUÁREZ *et al.*, 2008).

A trealose, portanto, participa de vários mecanismos que ainda não foram bem elucidados, tanto na planta quanto em rizóbios. Em simbiose, sua função pode ser diferente daquela mostrada apenas em plantas e rizóbios de vida livre.

## 2.6 MOTIVAÇÃO

Em projetos anteriores desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, os genes do operon *thuEFGKAB* foram detectados como potencialmente envolvidos com a nodulação. Em um dos projetos, foi realizada análise de transcrição global, através de RNA-seq, comparando a estirpe selvagem com uma mutante no gene *syrM2*, que codifica para um regulador transcricional importante para o processo de nodulação. Os resultados obtidos mostraram que a expressão do operon é dependente da presença desse regulador (EVARISTO, J. A. M. – não publicado). Posteriormente, e utilizando a mesma abordagem, foram comparados os perfis de expressão dos genes de NGR234 selvagem, inoculado em três diferentes plantas hospedeiras. Neste caso, foi observado que a expressão do operon *thuEFGKAB* é maior na planta hospedeira *Tephrosia vogelii* do que em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* (STABACH, 2016). Além disso, sabe-se que a trealose é um dos carboidratos mais abundantes nos nódulos, mas sua função não é bem compreendida.

Juntos, os resultados apontam para a participação destes genes, e consequentemente do metabolismo de trealose, no processo de nodulação. Projetos futuros terão que analisar de que forma este é regulado e porque a trealose é importante neste processo. Para tanto, a existência de uma linhagem mutante nestes genes será uma importante ferramenta de estudo. Em função disso, o objetivo do presente trabalho é produzir tal linhagem.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Contribuir para a elucidação da função e regulação dos genes localizados no operon *thuEFGKAB* através da obtenção de uma linhagem mutante de *Sinorhizobium fredii* NGR234 com uma deleção do operon.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Obter clones em pTZ57R de dois fragmentos que flanqueiam a região a ser deletada
- Ligar os fragmentos entre si para produzir uma cópia do operon com uma deleção da sua região central
- Clonar os fragmentos ligados em um vetor suicida para posterior uso na obtenção de linhagem mutante

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

As técnicas de biologia molecular, como ligação, eletroforese, restrição, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram feitas de acordo com Sambrook e Russel (2001) e utilizando tampões indicados pelos fabricantes. A concentração dos géis de agarose usados na eletroforese foi de 0,8%.

### 4.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE

Para realizar a deleção do operon *thuEFGKAB*, os fragmentos que flanqueiam a região do operon foram amplificados por PCR. Os *primers* utilizados foram inicialmente desenhados com ajuda dos softwares Primer3 (KOREESAR et al, 2007; UNTERGASSER et al, 2012) e NetPrimer (PREMIER BIOSOFT, 2016). A TABELA 1 mostra as suas sequências, com os sítios para enzimas de restrição sublinhados e suas respectivas temperaturas de anelamento.

TABELA 1 – SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS.

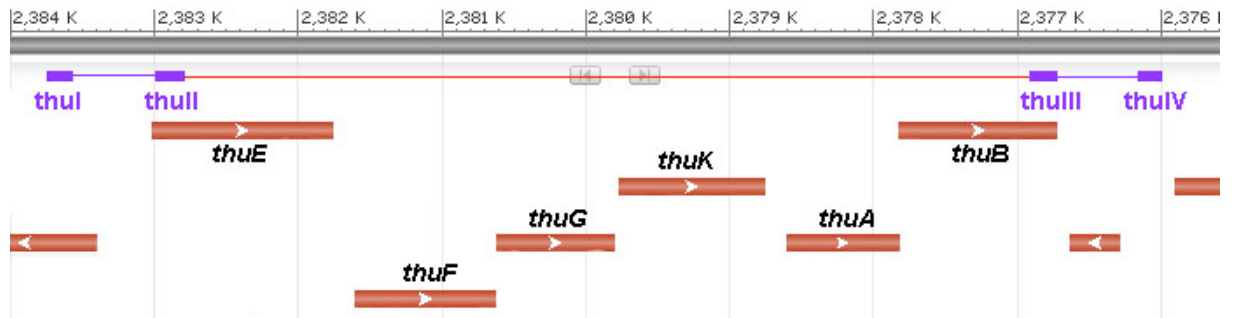
Primers	Temperatura de Anelamento (°C)	Sítio de restrição
thul 5'-ACCAGAC <u>G</u> GATCCCATTGA-3'	56	<i>Bam</i> HI
thull 5'-GCGCAG <u>A</u> ATTCCAAGGTCT-3'	56	<i>Eco</i> RI
thulll 5'-CGACAT <u>G</u> AATTCCGGTCCAG-3'	54	<i>Eco</i> RI
thuIV 5'-CAACAGCAATTCTAG <u>A</u> CGTTACG-3'	54	<i>Xba</i> I

FONTE: O autor (2016).

A FIGURA 4 mostra, em roxo, a posição dos *primers*, fora de escala, e, em vermelho, a região que será deletada no mutante. Os *primers* thul e thull foram utilizados na mesma reação de PCR para amplificar um fragmento chamado de thul-II. Do mesmo modo, os *primers* thulll e thuIV foram utilizados na mesma reação de PCR para amplificar um fragmento chamado de thulll-IV. Para a amplificação, foi utilizado o DNA genômico de NGR234 e a enzima *Taq* DNA Polymerase, na temperatura de anelamento de 52°C. Os aditivos betaína 1M e DMSO 5% foram

adicionados para melhorar a qualidade da amplificação. Na amplificação de I-II foi utilizada a betaína e de III-IV, o DMSO.

FIGURA 4 - POSIÇÃO DOS PRIMERS (EM ROXO) E DA REGIÃO DELETADA (LINHA VERMELHA), FORA DE ESCALA.



FONTE: Adaptado de NCBI (2016)

Após a PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar que os fragmentos foram amplificados com sucesso. O fragmento I-II tem tamanho esperado de 570 pares de base e o fragmento III-IV de 588 pares de base.

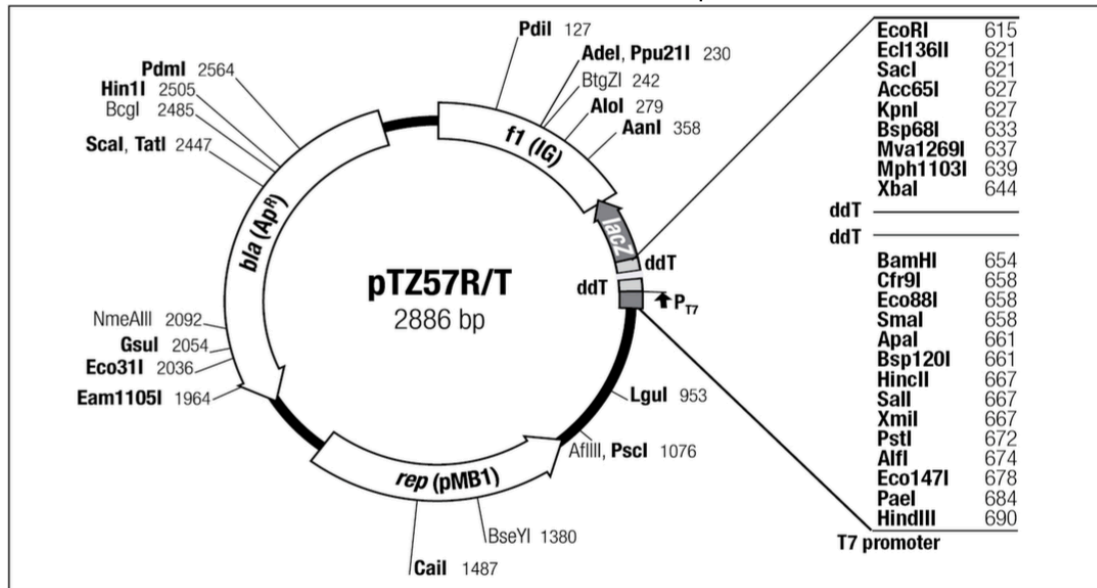
O produto de PCR foi purificado com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), para a remoção dos dNTPs, da polimerase e dos primers.

#### 4.3 CLONAGEM MOLECULAR NO VETOR pTZ57R

Os fragmentos thuI-II e thuIII-IV foram clonados separadamente no vetor pTZ57R, sem necessidade de restrição. O plasmídeo pTZ57R possui um sítio de policlonagem, região que possui sequências reconhecidas para várias enzimas de restrição. Ele também possui a região *lacZ'*, uma origem de replicação e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Além disso, sua forma linearizada e timinas adicionadas às suas extremidades 5' facilitam a clonagem de produtos de PCR, que geralmente possuem adeninas nas extremidades 3'. A FIGURA 5 mostra o mapa do vetor utilizado.

Ambos os fragmentos foram ligados, separadamente, ao vetor, com a enzima T4 DNA ligase. Posteriormente, foram preparadas células termocompetentes para a transformação do plasmídeo por choque térmico.

FIGURA 5 – MAPA DO VETOR pTZ57R.



FONTE: THERMO FISCHER SCIENTIFIC (2015).

#### 4.3.1 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Para o preparo de células termocompetentes, foram utilizadas células de *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen), com genótipo  $F^- \text{endA1 deoR}^+ \text{recA1 galE15 galK16 nupG rpsL } \Delta(\text{lac})\text{X74 } \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 araD139 } \Delta(\text{ara,leu})\text{7697 mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \text{Str}^R \lambda^-$ . Essas células foram inoculadas em 3 mL de meio LB (Luria Bertani), composto de 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 10 g/L de triptona. Foram mantidas em estufa incubadora com plataforma de agitação por aproximadamente 16 horas a 37°C. Então, 500 µl desse inóculo foram transferidos para um frasco Erlenmeyer com 80 mL de meio LB e esse foi incubado a 37°C, em agitação constante, até atingir  $\text{DO}_{600}$  entre 0,2 e 0,4. Em seguida, a cultura foi distribuída em dois tubos de centrifuga estéreis e mantida em banho de gelo por 15 minutos antes do início do procedimento. Após o banho de gelo, os tubos com a cultura foram centrifugados a 2500 g a 4°C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em 15 mL de solução de  $\text{MgCl}_2$  100 mM estéril e gelada. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante foi descartado novamente. O pellet foi ressuspense em 25 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  100 mM, também estéril e gelada, e os tubos foram mantidos por 30 minutos em banho de gelo. Uma nova centrifugação foi realizada e as células foram ressuspensas em 800 µl de solução de

CaCl<sub>2</sub> 100 mM e 20% de glicerol, e distribuídas em alíquotas de 100 µl em tubos Eppendorf de 1,5 mL estéreis e gelados. Os tubos foram armazenados a -80°C.

#### 4.3.2 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Uma alíquota de 100 µl de células termocompetentes foi descongelada em banho de gelo. Então, 3 µl do DNA da ligação foi adicionado e o tubo foi mantido em banho de gelo por 30 minutos. Após o banho de gelo, o tubo foi submetido a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e incubado por 15 minutos no gelo. Em seguida, 1 mL de meio LB foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C com constante agitação por 40 minutos. Foram preparadas placas com 20 mL de meio LA, com a mesma composição do meio LB mais 1,5% de ágar, com 250 µg/mL do antibiótico ampicilina, 100mM X-gal e 30 µg/mL IPTG, para a seleção por alfa complementação. Aproximadamente 300 µl das células transformadas foram plaqueadas e as placas foram mantidas a 37°C por 16 horas.

#### 4.4 SELEÇÃO POR ALFA COMPLEMENTAÇÃO

As células de *E. coli* utilizadas possuem uma deleção no seu gene *lacZ*, e não expressam o α-peptídeo do tetrâmero da β-galactosidase. A β-galactosidase funcional cliva a lactose em glicose e galactose. Como essas células não possuem o α-peptídeo, elas não são capazes de clivar a lactose. O plasmídeo pTZ57R, entretanto, possui o alelo *lacZ'*, que expressa o α-peptídeo que a *E. coli* não é capaz de expressar. Conseqüentemente, quando essa célula possui o plasmídeo, a β-galactosidase pode ser expressa completamente e é funcional. O operon *lac* é normalmente reprimido na célula. Sua expressão é induzida na presença de alolactose.

*In vitro*, a indução do operon *lac* e de *lacZ'* é feita por IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), uma substância análoga à alolactose. No lugar da lactose, utiliza-se o X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo). O X-gal, quando clivado pela β-galactosidase, dá origem a um produto de coloração azul. Então, quando a célula transformada possui o plasmídeo, sem inserto, ela dá origem a colônias azuis. Em plasmídeos com inserto, *lacZ'* é interrompido e a β-galactosidase não é expressa. Células transformadas que contêm o plasmídeo com inserto dão

origem a colônias brancas, pois não ocorre a clivagem de X-gal. Nas placas com IPTG, X-gal e ampicilina, não devem crescer colônias sem plasmídeo, já que há seleção pelo antibiótico. Células que possuem os plasmídeos têm resistência à ampicilina e são capazes de crescer na presença do antibiótico (BROWN, 1999).

As colônias brancas que cresceram, então, foram identificadas e enumeradas na placa, para posterior confirmação de presença do inserto correto.

#### 4.5 PCR DE COLÔNIA

As colônias identificadas foram submetidas à PCR de colônia, utilizando as células selecionadas como molde. Aquelas que, teoricamente, continham o inserto I-II foram submetidas à PCR de colônia com os *primers* thul e thull, e as que continham o inserto III-IV, com os *primers* thulll e thulv. Após a PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose para confirmar a presença de inserto.

Aquelas colônias que possuíam o inserto correto foram transferidas para frascos com meio LB e 250 µg/mL de ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação por aproximadamente 16 horas.

#### 4.6 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO

O DNA plasmidial foi extraído das colônias crescidas em LB pelo método de lise alcalina por Miniprep (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Alíquotas de 1,5 mL de cultura crescida por 16 horas foram centrifugadas a 12000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão no vórtex em 150 µl de GET (glucose 50 mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Foi adicionada, então, solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M) e misturada por inversão. Após 30 segundos foi adicionado 150 µl de KacF (acetato de potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8). Os tubos foram centrifugados por 8 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foi adicionado 50 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Nos tubos novos, foi adicionado 2,5 vezes do volume de etanol 100%, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1 mL de etanol 70% e foi novamente centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco.

Quando o pellet estava seco, foi adicionado 20 µl de água deionizada Milli-Q para ressuspendê-lo.

Após a extração do DNA plasmidial, foi feita uma restrição com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para comprovar a presença do inserto de tamanho esperado, já confirmada anteriormente por PCR de colônia. Os fragmentos obtidos foram observados por eletroforese. Os clones obtidos foram chamados de pTZthul-II e pTZthulll-IV.

#### 4.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

As amostras obtidas por Miniprep foram tratadas com RNase e incubadas por 2 horas. Para a purificação, a um volume de 100 µl de amostra foi adicionado 30 µl de clorofórmio e os tubos foram centrifugados por 5 minutos. Aproximadamente 80 µl do sobrenadante foram coletados em um tubo novo. Ao tubo com clorofórmio foram adicionados 80 µl de água estéril e foi realizada uma nova centrifugação de 5 minutos. O segundo sobrenadante foi coletado e acrescentado aos tubos novos. Foi adicionado 2/3 do volume de acetato de amônio e 2,5 volumes de etanol 100%. Os tubos foram centrifugados por 8 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado em etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco e ressuspensão em 10 µl de água deionizada.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit de sequenciamento Big Dye (Applied Biosystems) e o primer universal compatível com o plasmídeo. A reação de sequenciamento ocorreu no termociclador e as amostras foram purificadas em seguida. Ao volume de reação de 10 µl, adicionou-se 10 µl de água deionizada e 2 µl de acetato de amônio 7,5 M. Após a homogeneização, adicionou-se 65 µl de etanol 100% e a mistura foi transferida para tubos de 0,5 mL. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 500 µl de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o tubo foi seco no escuro. As amostras foram sequenciadas no sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems).

#### 4.8 OBTENÇÃO DE FRAGMENTO I-IV

Para obter um fragmento que contenha tanto os fragmentos I-II quanto III-IV,

foi feita uma restrição de pTZthul-II e de pTZthulll-IV com *EcoRI*. Em pTZthul-II, o fragmento I-II foi liberado, enquanto em pTZthulll-IV, o plasmídeo foi apenas aberto. A enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. Em seguida, realizou-se uma ligação entre os dois produtos das restrições, com o objetivo de formar um plasmídeo pTZ57R contendo um inserto com ambos fragmentos ligados. O inserto desse plasmídeo foi chamado de fragmento I-IV.

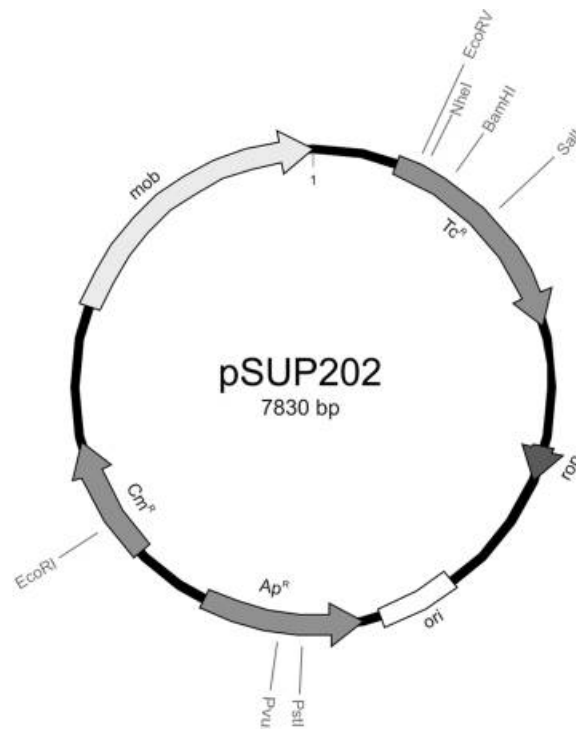
A ligação foi utilizada como molde para PCR, feita com os *primers* thul e thulV para a amplificação do fragmento I-IV e com as enzimas *Taq* DNA Polymerase e *Pfu* DNA Polymerase (1:5), para aumentar a fidelidade da amplificação sem interferir na amplificação específica do fragmento. O produto de PCR foi purificado com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

#### 4.9 CLONAGEM MOLECULAR EM pSUP202

O vetor pSUP202 foi escolhido como vetor suicida, devido a dificuldades na utilização do vetor pK18*mobsacB* previamente escolhido. pSUP202 possui resistência a três antibióticos diferentes: ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. Os sítios de restrição presentes estão contidos nos genes de resistência a antibióticos, possibilitando a seleção de transformantes por resistência a antibiótico e seleção de presença de inserto por sensibilidade a outro antibiótico. Ele é considerado um vetor suicida pois é capaz de ser replicado em *E. coli* mas não em NGR234. Sendo assim, quando for transferido para NGR234, não será mais replicado. A FIGURA 6 mostra o mapa do vetor.

Para a clonagem do fragmento I-IV em pSUP202, foi primeiramente realizada uma reação de restrição no produto de PCR I-IV, com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I, que contêm sítios específicos nas extremidades do produto. O vetor foi cortado com as enzimas *Bam*HI e *Nhe*I. A enzima *Nhe*I possui um sítio de corte compatível àquele cortado por *Xba*I. Após a inativação das enzimas, foi feita a ligação do fragmento I-IV ao vetor pSUP202. Foram utilizados 3 µl da ligação para fazer a transformação de células competentes por choque térmico (descrita acima). As células foram plaqueadas em meio LA com 250 µg/mL de ampicilina e 30 µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas. A ampicilina faz a seleção de células transformantes.

FIGURA 6 – MAPA DO VETOR pSUP202.



FONTE: ROSCHANSKI E STRAUCH (2010).

#### 4.10 SELEÇÃO POR SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICO

Para a seleção de células que possuem o plasmídeo e o inserto, foram feitas novas placas com meio LA. Em uma, foi adicionado 250 µg/mL de ampicilina apenas. Na outra, foi adicionado 250 µg/mL de ampicilina e 10 µg/mL de tetraciclina. Como as células que possuem inserto têm o gene de resistência a tetraciclina interrompido, elas tornam-se sensíveis a esse antibiótico. As colônias foram enumeradas e transferidas em ordem para as novas placas. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas.

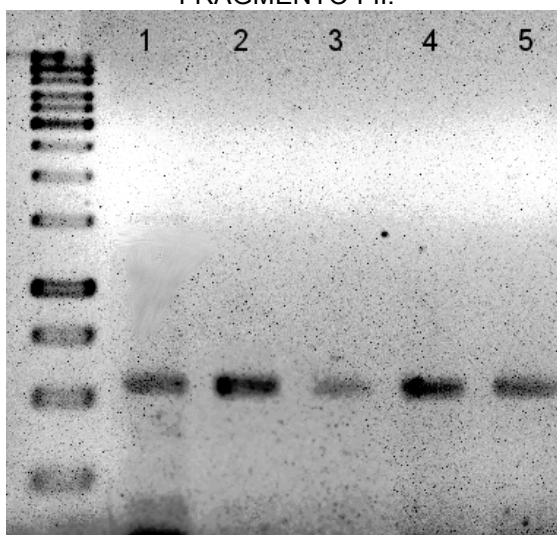
Aquelas colônias que cresceram em presença de ampicilina mas não em presença de tetraciclina foram selecionadas. Foi feita PCR de colônia para presença de inserto e eletroforese para confirmação. Das colônias com resultado positivo por PCR, 6 foram inoculadas em LB e ampicilina. No dia seguinte foi realizada Miniprep e consequente restrição com as enzimas *EcoRV* e *BamHI* para a verificação da presença do inserto por eletroforese. Com as mesmas amostras, foi feita restrição com *EcoRI*, que corta o plasmídeo ao meio e o fragmento ao meio, formando duas bandas no gel de agarose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS I-II E III-IV

A enzima *Taq* DNA Polymerase foi escolhida por dificuldades encontradas no uso da enzima Phusion DNA Polymerase. Os produtos de PCR gerados pela enzima Phusion mostravam muitas bandas inespecíficas no gel de agarose, enquanto aqueles formados pela *Taq* tinham menos bandas inespecíficas. A Phusion seria uma escolha mais adequada pois tem alta fidelidade, mas não foi possível amplificar o fragmento com ela. Foram utilizados dois aditivos junto às reações para otimizar a reação de PCR. Para a amplificação do fragmento I-II, foi utilizada a betaína. A betaína é um agente isoestabilizador, que contribui para a especificidade de produtos de PCR e para um maior rendimento, por facilitar a separação das fitas de DNA (FRACKMAN; KOBIS; SIMPSON, 1998). A FIGURA 7 mostra os testes feitos com os aditivos para amplificação do fragmento I-II, sendo a segunda amostra aquela em que se adicionou betaína.

FIGURA 7 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS ADITIVOS TESTADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO I-II.



FONTE: O autor (2016)

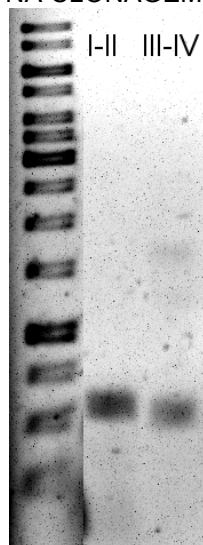
LEGENDA: 1 – sem aditivo; 2 – betaína 1M; 3 – DMSO 2%; 4 – DMSO 5%; 5 – betaína 1M e DMSO 2%

Na amplificação do fragmento III-IV, foram feitos testes semelhantes aos feitos com o I-II, e o aditivo que demonstrou maior eficiência foi o DMSO 5%. O DMSO é um aditivo amplamente utilizado e é frequentemente incluído à otimização

de reações de PCR. Como a betaína, ele facilita a separação das fitas de DNA, interferindo no pareamento de bases (FRACKMAN; KOBS; SIMPSON, 1998).

A FIGURA 8 mostra o fragmento I-II e III-IV após a amplificação eficiente. Mesmo com tamanho similar, os fragmentos mostraram uma pequena diferença na migração no gel de agarose.

FIGURA 8 – GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS PRODUTOS DE PCR I-II E III-IV, UTILIZADOS NA CLONAGEM.

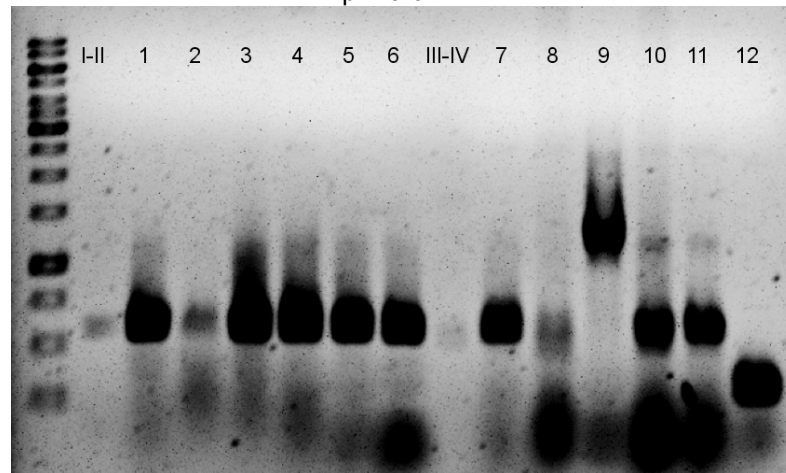


FONTE: O autor (2016).

## 5.2 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS I-II E III-IV

Após a amplificação e consequente clonagem dos fragmentos I-II e III-IV em pTZ57R, foi feita uma reação de PCR de colônia para 6 colônias de pTZthul-II e 6 colônias de pTZthulll-IV. No gel de agarose, para melhor visualização do tamanho dos fragmentos, foi aplicado o produto de PCR no poço anterior aos que possuíam as amostras de PCR de colônia (FIGURA 9). A FIGURA 9 mostra os resultados obtidos após a PCR de colônia. As amostras 1 a 6 foram obtidas da clonagem do fragmento I-II. Apenas a amostra 2 não mostra amplificação semelhante às outras, então ela foi descartada. Já as amostras 7 a 12 foram obtidas da clonagem do fragmento III-IV. As amostras 8, 9 e 12 foram desprezadas por não mostrarem o resultado esperado. As amostras 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 11 foram selecionadas por obterem o tamanho esperado.

FIGURA 9 – GEL DE AGAROSE CONTENDO AS AMOSTRAS DE PCR DE COLÔNIA DE pTZthul-II E pTZthulll-IV.

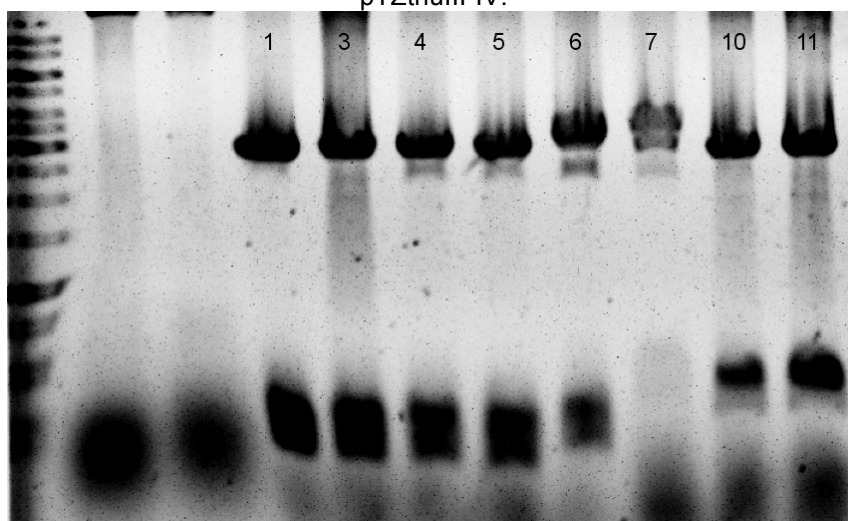


FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Amostras 1-6: fragmento I-II; Amostras 7-12: fragmento III-IV.

Após obtido o resultado da PCR de colônia, foi feita Miniprep das colônias que em teoria possuíam o inserto e seguinte restrição com enzimas que cortaram as pontas do inserto. A FIGURA 10 mostra o resultado da restrição do DNA plasmidial. Os resultados confirmam a presença do inserto em todas as amostras indicadas, mesmo com restrição parcial na amostra 7. Foram obtidas 5 amostras diferentes de pTZthul-II (1, 3, 4, 5 e 6) e 3 amostras de pTZthulll-IV (7, 10 e 11). Por sequenciamento, foi confirmada a presença ou não de mutações no inserto. As amostras 1, 3 e 4 de pTZthul-II não possuíam alterações, enquanto apenas a amostra 11 de pTZthulll-IV não possuía alterações. As amostras de pTZthul-II foram chamadas de A, B e C, respectivamente, e a amostra C foi utilizada na clonagem posterior.

FIGURA 10 – GEL DE AGAROSE CONTENDO RESULTADOS DE RESTRIÇÃO DE pTZthul-II e pTZthulIII-IV.

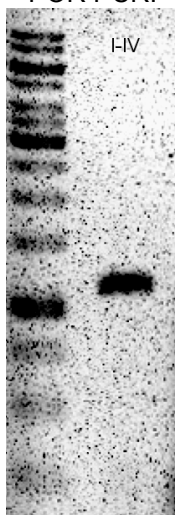


FONTE: O autor (2016).

### 5.3 OBTENÇÃO DO FRAGMENTO I-IV

Para a obtenção de fragmento I-IV, foi feita uma ligação do inserto I-II ao plasmídeo pTZthulIII-IV, formando um plasmídeo pTZthul-IV. Como as tentativas de transformação desse plasmídeo não tiveram sucesso, essa ligação foi utilizada como molde para PCR. A PCR com a enzima *Taq* DNA Polymerase e os primers thul e thulIV formou um fragmento do tamanho esperado e sem bandas inespecíficas. Entretanto, essa enzima não tem alta fidelidade, podendo gerar mutações durante a amplificação do fragmento. Foi utilizada uma mistura de *Taq* DNA Polymerase com *Pfu* DNA Polymerase para gerar um fragmento de tamanho correto mas com menor probabilidade de conter mutações. A FIGURA 11 mostra o resultado da amplificação do fragmento I-IV por PCR com as enzimas *Taq* e *Pfu*, com tamanho esperado de 1158 pares de base.

FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE CONTENDO AMOSTRA DO FRAGMENTO I-IV AMPLIFICADO POR PCR.



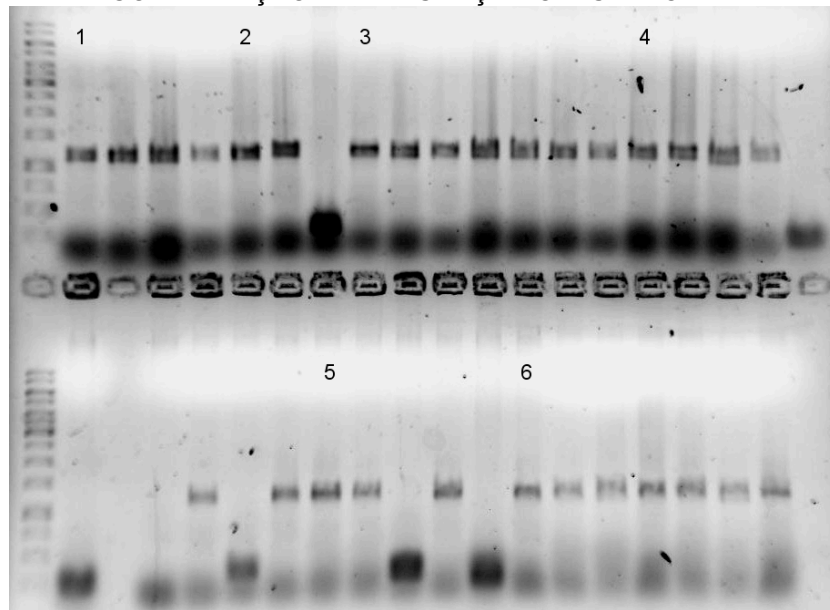
FONTE: O autor (2016).

#### 5.4 CLONAGEM DO FRAGMENTO I-IV

A estratégia inicial era clonar o fragmento I-IV em *pK18mobsacB*. Após múltiplas tentativas, as células não apresentaram crescimento esperado e, mesmo formando colônias brancas resistentes a canamicina, não possuíam o inserto. Por possuir o gene *sacB*, que confere sensibilidade a sacarose, pode ser que o plasmídeo tenha conferido alta sensibilidade às colônias transformadas, que não cresceram eficientemente no meio LA. Em teoria, o meio LA não possui uma quantidade significativa de sacarose, mas por *pK18mobsacB* não possuir o locus *sacR*, que regula a sua expressão, a expressão da enzima levanasacarase é constitutiva e pode acarretar em alta sensibilidade a sacarose. Devido a essas dificuldades, foi escolhida uma nova estratégia, clonando o fragmento primeiramente no plasmídeo *pSUP202*, que não possui a região *sacB*. Após a clonagem em *pSUP202*, um cassete contendo gene de resistência a canamicina, *sacB* e *sacR* será introduzido no plasmídeo.

O fragmento I-IV obtido por PCR foi clonado em *pSUP202*. Foram selecionadas 70 colônias transformantes, das quais 37 possuíam resistência a tetraciclina. Foi realizada PCR de colônia e várias colônias possuíam o inserto (FIGURA 12). Dessas colônias, seis foram selecionadas para realização de Miniprep e restrição, para melhor confirmação da presença do inserto. As 6 colônias escolhidas estão numeradas na FIGURA 12.

FIGURA 12 – GEL DE AGAROSE COM O RESULTADO DE PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO I-IV.

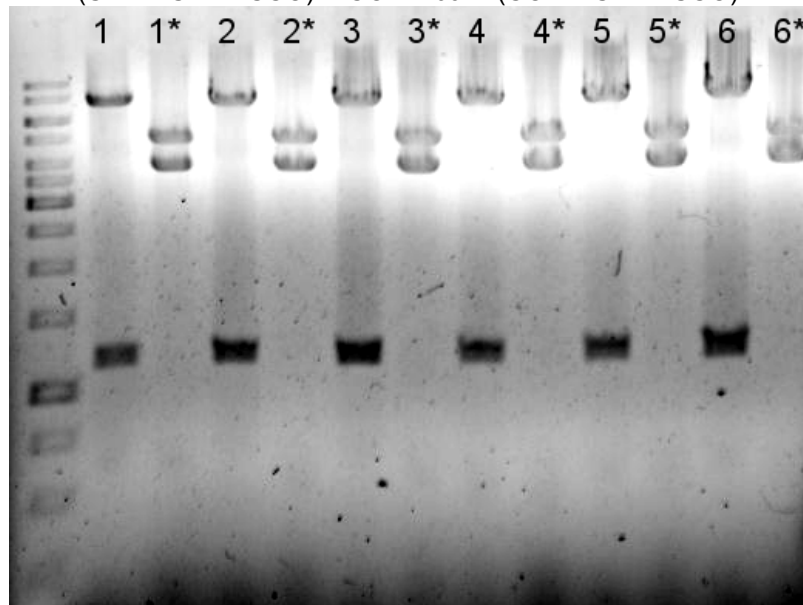


FONTE: O autor (2016).

Após a realização da Miniprep dessas seis colônias, foram feitas duas reações de restrição com cada amostra. Primeiramente, foi feita restrição com *Bam*HI e *Eco*RV. Uma das pontas do fragmento possui o sítio de *Bam*HI, mas o sítio de *Xba*I previamente existente na ponta do inserto foi perdido após a clonagem, por ter se ligado ao sítio de *Nhe*I e formado uma sequência diferente das que ambas enzimas reconhecem. Então, foi escolhido o sítio de *Eco*RV, que fica próximo ao fim do inserto. As amostras sem asterisco mostram o resultado dessas restrições na FIGURA 13.

A segunda restrição foi feita apenas com a enzima *Eco*RI, que corta o plasmídeo na região do gene de resistência a cloranfenicol (FIGURA 6) e o inserto ao meio. Se não houvesse o inserto, a enzima apenas abriria o plasmídeo e apareceria uma banda no gel. Como é visto na FIGURA 13, as amostras com asterisco mostram duas bandas, indicando que o inserto está presente em todas. Os números na FIGURA 13 se referem às amostras enumeradas na FIGURA 12.

FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE COM OS RESULTADOS DE RESTRIÇÕES COM *EcoRV* e *BamHI* (SEM ASTERISCO) E COM *EcoRI* (COM ASTERISCO).



FONTE: O autor (2016).

O clone esperado foi obtido, e uma das amostras foi escolhida para continuação do projeto.

## 5.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a obtenção do clone em pSUP202, não há garantias de que não houveram mutações durante a PCR do fragmento I-IV, então esse deve ser sequenciado. Após a confirmação da sequência, será introduzido no plasmídeo um cassete contendo gene de resistência a canamicina, *sacB* e *sacR*. Assim, o plasmídeo estará pronto para ser transformado novamente em *E. coli* e para a realização da conjugação entre *E. coli* transformadas e *Sinorhizobium fredii* NGR234. Esse plasmídeo será chamado de pSUP*sacBI-IV*.

Os genes contidos nesse plasmídeo possibilitam a conjugação e seleção de bactérias que receberam o inserto. Primeiramente, a região *mob* possui genes essenciais para a mobilidade do plasmídeo, tornando possível a sua transferência por conjugação. Entretanto, ele é um plasmídeo suicida, ou seja, não é replicado em NGR234. Para que ele continue presente em NGR234, deve haver uma recombinação homóloga, possível devido a regiões homólogas ao genoma de NGR234 presentes no fragmento thul-IV. A primeira recombinação pode ser

selecionada com canamicina, presente no plasmídeo. Se houver a recombinação, todo o plasmídeo pSUP*sacBI*-IV será incluído no plasmídeo pNGR234b de NGR234, conferindo às colônias resistência ao antibiótico.

Como o objetivo é a deleção do operon, deve ocorrer uma segunda recombinação homóloga. Se a dupla recombinação ocorrer corretamente, NGR234 perderá a região do operon *thuEFGKAB* presente em pNGR234b, que será substituída por esta versão deletada presente no pSUP202*sacBI*-IV. A seleção da dupla recombinação poderá ser feita com sacarose.

Uma vez obtida a linhagem mutante de NGR234, pode ser realizada uma análise fenotípica através de testes de nodulação, para analisar o efeito da perda do operon na nodulação e na interação planta-bactéria.

## 6 CONCLUSÃO

Foi obtido um clone do fragmento I-IV, em pSUP202, que contém regiões que flanqueiam o operon *thuEFGKAB*. Há a necessidade da inserção de um cassete contendo o gene *sacB* e o gene de resistência à canamicina para que seja realizada uma conjugação com *Sinorhizobium fredii* NGR234. Após a conjugação e recombinação, uma análise fenotípica possibilitaria a obtenção de maiores informações sobre o efeito da deleção do operon na nodulação e na interação entre planta e bactéria. Estudos futuros são necessários para que sejam obtidas conclusões mais concretas.

## REFERÊNCIAS

- AMPOMAH, O. Y. *et al.* The *thuEFGKAB* Operon of Rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* Codes for Transport of Trehalose, Maltitol, and Isomers of Sucrose and Their Assimilation through the Formation of Their 3-Keto Derivatives. **Journal of Bacteriology**. v. 195, n. 17, p. 3797-3807, set 2013. American Society for Microbiology.
- ARGÜELLES, Juan Carlos. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 174, n. 4, p.217-224, 25 set. 2000. Springer Science + Business Media.
- BOBOYE, B.. Degradation of trehalose by rhizobia and characteristics of a trehalose-degrading enzyme isolated from *Rhizobium* species NGR234. **J Appl Microbiol**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.256-261, ago. 2004. Wiley-Blackwell.
- BROWN, T.A. Genética um enfoque molecular. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- DAVIDSON, A. L. *et al.* Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 72, n. 2, p. 317-364, jun 2008. American Society for Microbiology.
- DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J.. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], p.312-320, 9 mar. 2009. Nature Publishing Group.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 8, p.621-631, ago. 2004. Nature Publishing Group.
- FINAN, T. M. *et al.* The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 17, p.9889-9894, 31 jul. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- FRACKMAN, S.; KOBBS, G.; SIMPSON, D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. **Promega Notes**, O, n. 65, p.27-30, 1998.
- GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J.. The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast-and slow-growing species of *Rhizobium*. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 129, n. 3, p.238-239, maio 1981. Springer Science + Business Media.
- GUALTIERI, G.; BISSELING, T. The evolution of nodulation. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.181-194, 2000. Springer Science + Business Media.
- JENSEN, J. B. *et al.* Role of Trehalose Transport and Utilization in *Sinorhizobium meliloti*-Alfafa Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, n. 7, p.

694-702, 2005. The American Phytopathological Society.

JENSEN, J. B.; PETERS, N. K.; BHUVANESWARI, T. V.. Redundancy in Periplasmic Binding Protein-Dependent Transport Systems for Trehalose, Sucrose, and Maltose in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 184, n. 11, p.2978-2986, 1 jun. 2002. American Society for Microbiology.

JONES, K. M. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.619-633, ago. 2007. Nature Publishing Group.

KORESSAAR, T. *et al.* Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1289-1291, 22 mar. 2007. Oxford University Press (OUP).

KRYSCIAK, D. *et al.* RNA Sequencing Analysis of the Broad-Host-Range Strain *Sinorhizobium fredii* NGR234 Identifies a Large Set of Genes Linked to Quorum Sensing-Dependent Regulation in the Background of a *tral* and *ngrI* Deletion Mutant. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 18, p.5655-5671, 7 jul. 2014. American Society for Microbiology.

LUNN, J. E. *et al.* Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Biochem. J.**, [s.l.], v. 397, n. 1, p.139-148, 1 jul. 2006. Portland Press Ltd.

LUNN, J. E. *et al.* Trehalose metabolism in plants. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.544-567, 21 maio 2014. Wiley-Blackwell.

MORRISON, N. A *et al.* 1983. Heat curing of a sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium* sp. that is able to nodulate legumes and the nonlegume *Parasponia* sp. **J. Bacteriol.** v. 153, n.1, p.527-531, jan. 1983

**NCBI.** 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

PONNU, J.; WAHL, V.; SCHMID, M. Trehalose-6-Phosphate: Connecting Plant Metabolism and Development. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 2, p.1-6, 2011. Frontiers Media SA.

PREMIER BIOSOFT. NetPrimer. Disponível em: <<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>>.

REIBACH, P. H.; STREETER, J. G.. Metabolism of <sup>14</sup>C-Labeled Photosynthate and Distribution of Enzymes of Glucose Metabolism in Soybean Nodules. **Plant Physiology**, v. 72, n. 1, p.634-640, fev. 1983.

ROSCHANSKI, N.; STRAUCH, E. Assessment of the Mobilizable Vector Plasmids pSUP202 and pSUP404.2 as Genetic Tools for the Predatory Bacterium *Bdellovibrio*

bacteriovorus. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.589-596, 8 set. 2010. Springer Science + Business Media.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHÄFER, A. *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, [s.l.], v. 145, n. 1, p.69-73, jul. 1994. Elsevier BV.

SCHLUEPMANN, H.. Trehalose Mediated Growth Inhibition of *Arabidopsis* Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 135, n. 2, p.879-890, 4 jun. 2004. American Society of Plant Biologists (ASPB).

SCHMEISSER, C. *et al.* *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 75, n. 12, p.4035-4045, 17 abr. 2009. American Society for Microbiology.

STABACH, C. G. **Análise de expressão diferencial de Sinorhizobium fredii NGR234 em nódulos de diferentes plantas hospedeiras**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Genética, UFPR, Curitiba, 2016.

STREETER, J. G.. Accumulation of alpha,alpha-Trehalose by *Rhizobium* Bacteria and Bacteroids. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 164, n. 1, p.78-84, out. 1985.

SUÁREZ, R. *et al.* Improvement of Drought Tolerance and Grain Yield in Common Bean by Overexpressing Trehalose-6-Phosphate Synthase in Rhizobia. **Mpmi**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.958-966, jul. 2008. Scientific Societies.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. *Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit #K1214 #K1214*. Jan 2015. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012706\\_InsTAclone\\_PCR\\_Cloning\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012706_InsTAclone_PCR_Cloning_UG.pdf)>. Acesso em 22 fev. 2016

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 40, n. 15, p.115-115, 22 jun. 2012. Oxford University Press (OUP).