

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024**AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DE UMA NOVA
ENDOGLUCANASE DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* PARA A
PRODUÇÃO DE BIOETANOL****Alice Carmo Oliveira; Raquel Guimarães Benevides²**1. Bolsista – Modalidade Bolsa/Cnpq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alicemelg14@gmail.com2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelgb@gmail.com**PALAVRAS-CHAVE:** cDNA; produção recombinante; celulase**INTRODUÇÃO**

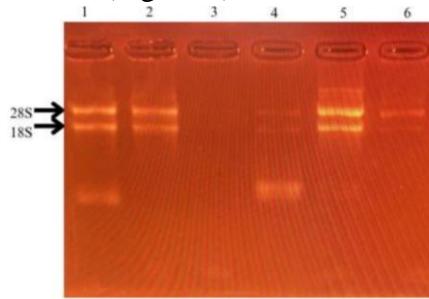
O iminente embargo do setor de energia causado pelo esgotamento dos combustíveis fósseis incita o interesse em fontes de energia sustentáveis, capazes de substituir os combustíveis convencionais (Apergis; Danuletiu, 2014). Neste sentido, estudos vêm se desenvolvendo quanto a utilização de microrganismos com arcabouço enzimático capaz de catalisar a hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de bioetanol. Na literatura, pesquisas envolvendo a amplificação de DNA complementar (cDNA), referente a sequências proteicas de hidrolases de fungos e posterior clonagem em células de microrganismos recombinantes, tais como a *Escherichia coli* (Saha, 2003), objetivam ampliar os processos de bioconversão dos subprodutos do polímero de celulose em bioetanol. Destarte, a clonagem e expressão heteróloga de uma nova endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa*, compõe-se um método favorável que ampara a grande produção de celulases em células de *E. coli*, em razão de ser pouco oneroso quanto ao seu substrato, possuir crescimento célere e dispor de um genoma conhecido, possibilitando a manipulação genética por técnicas de DNA recombinante.

METODOLOGIA

Para extração de RNA foi utilizado protocolo conhecido, com TRIZOL Reagent (Invitrogen®). Anterior às etapas de amplificação de cDNA foram desenhados iniciadores (*primers*) utilizando-se a ferramenta online OligoAalyzer 3.1 - DNA Technologies®. Para sintetizar moléculas de cDNA, foi realizada a técnica de transcriptase reversa, utilizando-se as enzimas Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT; Promega®), GoScrit – reverse transcriptase (Promega®) e Improm-II reverse transcriptase (Promega®). No que se refere à amplificação do cDNA, foram utilizados também diferentes protocolos a partir da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por gradiente, utilizando-se o kit Qiagen® Master Mix, GoTaq Colorness Master Mix e TopTaq DNA polimerase (Sinapse®). O produto obtido por PCR foi purificado utilizando-se o protocolo de precipitação de DNA com PEG (Polietilenoglicol).

RESULTADOS

O presente trabalho objetivou primordialmente a amplificação da sequência proteica 10670, sequenciada do genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa* e cedida pelo Professor Dr. Gonçalo Guimarães, da UNICAMP, a fim de sequenciá-la a partir do fungo cultivado em meio indutor WY, rico em farelo de trigo, para obter os *primers* referentes ao gene de interesse para o vetor de expressão pET-32a, para posterior clonagem em células de *E. coli*. Ademais, as extrações de RNA total para utilização do produto para síntese de cDNA resultaram em produtos satisfatórios quanto à integridade das bandas das subunidades 28s e 18s (Figura 1).



Fonte: Autora.

Figura 2: Corrida eletroforética em gel de Agarose 1%, com amostras de micélio de *Moniliophthora perniciosa*, cultivadas em meio WY, com corante para ácido nucleico Gel Red.

Foram utilizadas diferentes enzimas transcriptases reversas a fim de otimizar o processo de amplificação do cDNA, visto que, selecionada a melhor enzima a partir dos produtos gerados seria possível sintetizar diversas amostras de cDNA eletivas de uma boa amplificação, com o objetivo de garantir concentração final adequada para o sequenciamento da proteína expressa pelo fungo.

Para a etapa seguinte utilizando os protocolos de diferentes enzimas DNA polimerases, foram desenhados ao total oito iniciadores na plataforma OligoAalyzer 3.1 - DNA Technologies®, quatro destes contendo uma pequena sequência nucleotídica referente aos sítios de restrição das enzimas BamHI e Ndel, e desconsiderando o peptídeo sinal da proteína, que corresponde ao intervalo entre seis e 21 aminoácidos (Tabela 1). Outrossim, os demais *primers* foram desenhados com o peptídeo sinal e sem as sequências das enzimas de restrição, com e sem nucleotídeo de proteção (Tabela 2).

Tabela 1. Dados referentes aos quatro primeiros *primers* desenhados para 10670. Em vermelho, destaca-se os sítios de restrição das enzimas.

Denominação	Sequência (5'3')	Temp. De Melting
Endo10_BamHI_F25	ATT GGA TCC ATG GAA ATG AAA ATC G	54.2°C
Endo10_BamHI_F28	ATT GGA TCC ATG GAA ATG AAA ATC GGT G	57.9°C
Endo10_Ndel_R29	ATG CAT ATG CTA GA ATG CAT CCA GTA ATG	57.3°C
Endo10_Ndel_R27	ATG CAT ATG CTA ATG CAT CCA GTA ATG	55.8°C

Tabela 2. Dados referentes aos quatro *primers* com peptídeo sinal e sem sítios de restrição.

Denominação	Sequência (5'3')	Temp. De Melting
Endo10670_25F	ATG GAA ATG AAA ATC CTC TCT TTT C	51.9°C
Endo10670_28R	TTA TCA ATA ACT TGA GTG GCG AAT GCA T	57.1°C
Endo10670N_25F	GGA ATC ATG GAA ATG AAA ATC CTC T	53.5°C
Endo10670N_28R	GCG CTT ATA ACT TGA GTG GCG AAT GCA T	61.3°C

Utilizando os quatro primeiros *primers* (Tabela 1), mesclando ou não suas combinações, não foram obtidos resultados favoráveis ao amplificado, correspondente ao peso molecular de 735 pb em gel de Agarose a 1%, apenas foi notificado o aparecimento de bandas claras inespecíficas na amostra incubada em temperatura de anelamento de 56°C.

Em dois testes utilizando os novos *primers* com e sem os nucleotídeos de proteção, foram observadas bandas aparentemente mais próximas ao peso molecular correspondente, entretanto, por motivo desconhecido, em Figura 2.A. é perceptível um problema na corrida, quanto às conformações das bandas dos marcadores e das amostras, sendo assim, pondera-se que as bandas tenham peso molecular de aproximadamente 1000 pb, enquanto em Figura 2.B. o peso molecular das bandas corresponde a 500 pb.

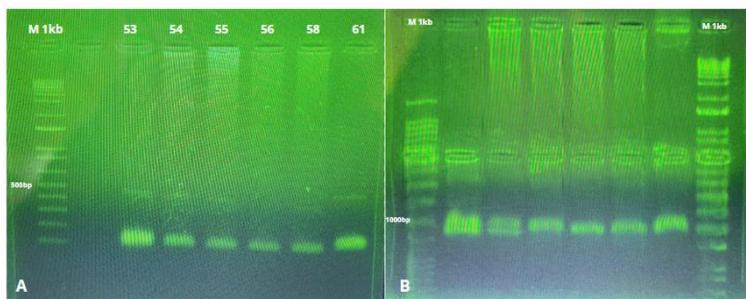


Figura 2: Resultados para corrida em gel de Agarose a 1% com Ladder 1Kb. A. Bandas em todas as temperaturas de anelamento: 52, 53, 54, 55, 56 e 57 graus (em Celsius) correspondente a 1000bp. B. Bandas correspondente a 500bp nas temperaturas 53, 54, 55 e 61 graus (em Celsius).

Foram realizados inúmeros testes de amplificação utilizando todos os *primers* desenhados, com mudanças de parâmetros de concentração de reagentes e temperatura. A remodelação dos protocolos priorizou o aumento na concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂), que, acoplado ao Buffer 5x (Tampão MgCl₂ Free) promovem a precipitação dos íons de Mg²⁺, que corresponde a um cofator da enzima DNA polimerase (Torres, 2020), e são responsáveis por estabilizar o pH reacional e de desoxinucleotídeos fosfatados, presentes no reagente dNTP's - fonte de nucleotídeos livres (Dos Santos, 2022). No mais, a concentração de cDNA e enzima também foi alterada, variando de 2,5 μL a 3,5 μL para cDNA e 0,25 μL a 1 μL para TopTaq polimerase (Sinapse), para reação final de 25 μL.

Os produtos da PCR referentes à figura 2 foram purificados por PEG a fim de verificar as condições em gel de Agarose a 1%. O purificado foi ressuspensionado para a maior concentração (10 µL), entretanto, não se obteve resultado favorável, visto que a banda correspondente não apareceu novamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante ao exposto, a etapa de amplificação da sequência 10670, sequenciada do genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa* mostrou-se difícil, pois apesar das adaptações e remodelações dos protocolos de PCR, utilizando diferentes enzimas de síntese de cDNA e DNA polimerase não foram obtidos resultados favoráveis do amplificado em nenhuma das tentativas. Todavia, acredita-se que seja possível que a amplificação da sequência 10670 ainda seja exequível, visto que uma das principais dificuldades encontradas neste estudo tenha sido na categoria logística, quanto a obtenção dos *primers* e disponibilidade de reagentes. Além disso, considerando o estudo *in silico* realizado em projetos anteriores, 10670 possui grande similaridade estrutural com as demais Glicosil Hidrolases GH45, sendo assim, é provável conseguir resultados favoráveis otimizando as melhores condições de concentração de reagentes e temperaturas para os últimos *primers* desenhados.

REFERÊNCIAS

- APERGIS, N.; DANULETIU, D. C. Renewable energy and economic growth: Evidence from the sign of panel long-run causality. *International Journal of Energy Economics and Policy*, v. 4, n. 4, p. 578-587, 2014.
- DOS SANTOS, MARCELA LUANA RIBEIRO. Contribuições da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (hiv). Universidade de São Paulo, 2022.
- PICHON, Maëva et al. 2', 3'-Protected Nucleotides as Building Blocks for Enzymatic de novo RNA Synthesis. *Chemistry—A European Journal*, v. 30, n. 24, p. e202400137, 2024.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.
- TORRES, Naiara Utimura. Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase Hot Start e suas implicações na atividade da enzima. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.