

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynB3* QUE CODIFICA
A β -XILOSIDASE III NA BACTÉRIA AQUÁTICA *Caulobacter crescentus***

ADILSON BOSETTO

CASCAVEL-PARANÁ-BRASIL

2015

ADILSON BOSETTO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynB3* QUE CODIFICA
A β -XILOSIDASE III NA BACTÉRIA AQUÁTICA *Caulobacter crescentus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Garcia Simão.

CASCADEL-PARANÁ-BRASIL

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B754c

Bosetto, Adilson

Clonagem e expressão do gene xynB3 que codifica A β -xilosidase III na bactéria aquática *Caulobacter crescentus*. / Adilson Bosetto. Cascavel, 2015.

58 p

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola.*

1. Biotecnologia agroindustrial. 2. B-xilosidase recombinante. 3. C. crescentus. 4. Super-expressão enzimática. 5. Resíduos agroindustriais. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 660.6

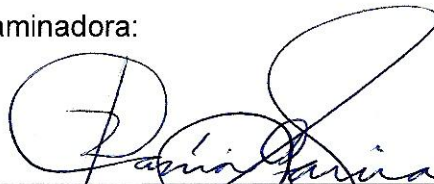
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9^a/965

* Revisão de língua portuguesa, inglesa e normas de monografia efetuada por Ana Maria M. A. Vasconcelos em 27 de abril de 2015.

ADILSON BOSETTO

Clonagem e expressão do gene xynb3 que codifica a β -Xilosidase III da bactéria aquática *Caulobacter crescentus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos hídricos e saneamento ambiental, linha de pesquisa Saneamento ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



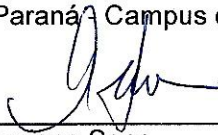
Orientador(a) - Rita de Cassia Garcia Simão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Cristina Beatriz Aroca Ribeiro

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)



Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

BIOGRAFIA

Filho de Agenor e Dirse Bosetto, o discente é natural de Laranjeiras do Sul, com nascimento em 08 de dezembro de 1988. Graduiu-se em Biomedicina no ano de 2010 pela Universidade Paranaense. Trabalhou na empresa DASA – Diagnósticos da América durante dois anos (fevereiro de 2011 a fevereiro de 2013). Ingressou no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Engenharia Agrícola em nível de mestrado no ano de 2013 para desenvolver pesquisa na área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Mares calmos não fazem marinheiros habilidosos
(Provérbio Africano)

À minha família, principalmente
à minha mãe Dirse, ao meu pai, Agenor,
e meu Irmão Alessandro, por todo amor,
carinho, apoio e pelo exemplo de vida.

Àquela que sempre esteve
ao meu lado durante essa jornada, obrigado
pelo amor, compreensão e incentivo:
minha namorada, Indina Patrícia
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas escolhas. Sem a presença divina nos dias difíceis não teria eu suportado com tal serenidade as dificuldades encontradas durante a caminhada;

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Garcia Simão, minha orientadora, pela sabedoria dividida e pelo conhecimento transmitido, incentivo e pela confiança depositada;

Agradeço a todos os colegas e amigos dos laboratórios de Bioquímica que me ajudaram e ensinaram o que sabiam. Em especial à Juliana, Luciana, Fabíola, Priscila, Elaine, Amanda. Pois, com vocês, tudo ficou mais fácil;

Aos professores Marina, José Luiz, Ana, Alexandre e Luciane pela disponibilidade em ajudar, pela utilização dos laboratórios e equipamentos;

A todos os professores do PGEAGRI que dedicaram seu tempo e sua sabedoria e contribuíram para minha formação;

À secretaria e toda equipe do PGEAGRI que sempre esteve disposta a me auxiliar quando necessário;

À UNIOESTE, pela infraestrutura necessária para desenvolver a pesquisa e a todos os funcionários;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *xynB3* QUE CODIFICA A β -XILOSIDASE III NA BACTÉRIA AQUÁTICA *Caulobacter crescentus*

A utilização de enzimas em processos industriais, no seu sentido mais amplo, demonstra a evolução do mercado em relação a alternativas inovadoras de preservação do meio ambiente. Devido à grande quantidade de material lignocelulósico residual, proveniente da agricultura, o Brasil é um país com elevado potencial para o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem a utilização desses materiais como substrato para produtos de maior valor agregado. Dessa forma, o estudo da expressão de genes microbianos relacionados com a degradação da parede celular vegetal tem despertado a atenção de pesquisadores, principalmente pelo fato de estar relacionado com a possibilidade de síntese controlada e em larga escala de enzimas utilizadas na produção de biocombustíveis. Neste contexto, a bactéria gram-negativa *Caulobacter crescentus* encontra-se como um microrganismo promissor para a exploração biotecnológica em função da capacidade que tem de degradar o xilano, principal componente hemicelulósico das plantas. Essa bactéria contém em seu genoma vários genes que codificam para xilanases e β -xilosidases. Dentre eles o gene *xynB3* (CCNA_00856), que apresenta 1623 nucleotídeos e codifica uma proteína contendo domínios conservados de β -xilosidase, com 540 resíduos de aminoácidos, denominada neste trabalho como β -xilosidase III de *C. crescentus*. Com o objetivo de possibilitar em estudos futuros a caracterização bioquímica dessa proteína, foi estudado o gene *xynB3*. Para isso, *xynB3* foi isolado a partir do DNA genômico de *C. crescentus* NA1000 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando oligonucleotídeos específicos. O único produto de amplificação foi clonado no vetor pJet1.2blunt em sítios não coesivos e reintroduzido no vetor de expressão pTrcHisA dentro do quadro de leitura para a produção de uma cauda de histidinas na região amino-terminal da proteína de fusão. A construção obtida foi denominada pTrcHis-*xynB3* e após confirmação da identidade da mesma por sequenciamento de DNA foi inserida na cepa TOP10 de *Escherichia coli* e submetida a ensaios experimentais de expressão com diferentes temperaturas de crescimento, concentrações de IPTG e tempos de indução. A proteína recombinante foi super-expressa em corpos de inclusão, portanto, em uma forma não solúvel. Diferentes protocolos de indução e purificação foram empregados para obtenção da β -xilosidase III de *C. crescentus* pura, em forma nativa ou não nativa. Entretanto, nos ensaios de atividade enzimática, com diferentes substratos, foram obtidos níveis de atividade de β -xilosidase não detectáveis pelas ferramentas utilizadas. Esses resultados sugerem que a enzima não se mostrou ativa durante os ensaios, em função da formação de corpos de inclusão. Isso leva a crer que essa proteína pode apresentar efeito tóxico para *E. coli* quando expressa em níveis elevados. Assim, este trabalho contribui com dados adicionais a cerca do complexo xilanolítico da bactéria aquática *C. crescentus*.

Palavras-chave: β -xilosidase recombinante, *C. crescentus*, resíduos agroindustriais, super-expressão enzimática.

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF *xynB3* GENE CODING FOR β -XYLOSIDASE III IN *Caulobacter crescentus* AQUATIC BACTERIUM

The application of enzymes in industrial processes, in its broad sense, has shown the market evolution for innovative alternatives for preserving the environment. Brazil has a great potential to develop some technologies, which allow the use of such materials as substratum for products with higher added value, due to the large amount of lignocellulose as waste that comes from agriculture. Therefore, the analysis of genes expression related to microbial degradation of plant cell wall has caught the researchers' attention, mainly because it is associated to the possibility of controlled large-scale synthesis of enzymes applied in biofuel production. In this context, the Gram-negative bacterium *C. crescentus* is found as a promising microorganism for biotechnological exploitation due to its ability on degrading xylan, the major component of plant hemicellulose. There are several genes in the bacterial genome that codify to Xylanases and β -Xylosidases. In order to purify and biochemically characterize the β -Xylosidase III protein of *C. crescentus*, *xynB3* gene (CCNA_00856) that contains 1,623 nucleotides and encodes a protein with conserved domains of β -Xylosidase with 540 amino acid residues has been studied. Therefore, *xynB3* gene was isolated from genomic DNA of *C. crescentus* NA1000 by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers. The single amplification product was cloned into pJet1.2Blunt vector in non-cohesive sites and reintroduced in vector of pTrcHisA expression within the reading frame to produce a histidine tag at the amino-terminus area of fusion protein. The obtained construction was denominated pTrcHis-*xynB3* and the confirmation of its gene identification was figured out by the DNA sequence after insertion into the TOP10 *E. coli* strain and subsequent experimental tests of expression in different temperature of growth, IPTG concentrations and induction times. The recombinant protein was overexpressed into inclusion bodies, thus, in a non-soluble form. Different induction and purification protocols were used to obtain the β -xylosidase III pure of *C. crescentus*, in native or non-native form. However, assays of enzymatic activity with different substrates neither demonstrated β -xylosidase activity nor detectable levels of the protein. These results suggest that the enzyme was not active during the assays, due its expression in inclusion bodies. This suggests that this protein may have a toxic effect on *E. coli* when expressed at high levels. Thus, this trial contributes to additional data about the xylanolytic complex concerning the aquatic bacterium *C. crescentus*.

Keywords: recombinant β -Xylosidase; *C. crescentus*; agroindustrial residues; enzymatic overexpression.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 A bactéria <i>Caulobacter crescentus</i>	3
3.2 Parede celular vegetal e seus constituintes.....	4
3.3 Enzimas xilanolíticas.....	6
3.4 Clonagem molecular e a expressão de β -xilosidases recombinantes.....	8
3.4.1 β -xilosidases de origem bacteriana.....	8
3.4.2 β -xilosidases de origem fúngica.....	10
3.5 Desafios na produção de enzimas recombinantes.....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos.....	13
4.2 Meios de cultura e manutenção dos microrganismos.....	14
4.3 Oligonucleotídeos.....	14
4.4 Obtenção do DNA genômico de <i>C.crescentus</i>	15
4.5 Amplificação do gene <i>xynB3</i>	15
4.6 Confirmação da amplificação em gel de agarose.....	16
4.7 Preparo dos fragmentos para ligação com vetor de clonagem.....	16
4.8 Ligação entre vetor e fragmento.....	17
4.9 Preparo de células competentes.....	18
4.10 Transformação das células de <i>E.coli</i>	18
4.11 Minipreparação plasmidial (miniprep).....	19
4.11.1 Mini extração plasmidial – Hidrólise alcalina.....	20
4.11.2 Mini extração plasmidial – Kit Invitrogen®.....	20
4.12 Digestão enzimática e confirmação da clonagem em gel de agarose.....	21
4.13 Purificação do DNA através do método de eletroeluição e precipitação.....	22
4.14 Sequenciamento do gene <i>xynB3</i>	23
4.15 Subclonagem do gene <i>xynB3</i>	24
4.15.1 Preparo do vetor de expressão.....	24
4.15.2 Ligação de <i>xynB3</i> em vetor de expressão e transformação por choque térmico... ..	25
4.16 Ensaio de indução de expressão da proteína heteróloga.....	26
4.17 Purificação da proteína recombinante.....	27
4.17.1 Purificação em condições nativas.....	27
4.17.2 Purificação da proteína em corpos de inclusão.....	28
4.18 Eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE)	29
4.19 Avaliação da atividade de β -xilosidase III.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Amplificação do gene <i>xynB3</i>	31
5.2 Resultados do sequenciamento do gene amplificado.....	31
5.3 Confirmação da clonagem de <i>xynB3</i> em pJET1.2 <i>blunt</i>	32
5.4 Recuperação do fragmento clonado por eletroeluição.....	33
5.5 Confirmação da subclonagem.....	33
5.6 Ensaio de expressão.....	35
5.7 Purificação da proteína recombinante.....	35
5.8 Ensaio de dosagem de β -xilosidase.....	38
6 CONCLUSÕES	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8 REFERÊNCIAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais características de algumas β -xilosidases recombinantes de origem bacteriana.....	10
Tabela 2 Linhagens bacterianas e plasmídeos.....	13
Tabela 3 Oligonucleotídeos para amplificação do gene <i>xynB3</i>	14
Tabela 4 Protocolo da reação de PCR para o gene <i>xynB3</i>	16
Tabela 5 Reação “ <i>blunt</i> ” dos produtos de PCR.....	17
Tabela 6 Protocolo de digestão enzimática - Mini prep Hidrólise alcalina.....	21
Tabela 7 Protocolo de digestão enzimática da Mini-prep Invitrogen®.....	22
Tabela 8 Protocolo de digestão do pTrcHis A.....	24
Tabela 9 Protocolo de ligação de <i>xynB3</i> com pTrcHis A.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Caulobacter crescentus</i>	3
Figura 2 Representação esquemática da parede celular vegetal e seus constituintes....	5
Figura 3 Principais hemiceluloses.....	5
Figura 4 Enzimas envolvidas na hidrólise enzimática do xilano.....	7
Figura 5 Mapa do vetor de clonagem pJET 1.2 blunt da Thermo scientific®.....	17
Figura 6 Mapa do vetor de expressão pTrcHis A Invitrogen®.....	25
Figura 7 Visualização do produto de PCR em gel de agarose 1% TAE 1X.....	31
Figura 8 Janela de análise de domínios conservados da sequência de <i>xynB3</i> clonado..	32
Figura 9 Confirmação da clonagem do gene <i>xynB3</i> no vetor pJET1.2 <i>blunt</i> em gel de agarose 1% TAE.....	33
Figura 10 Recuperação por eletroeluição.	34
Figura 11 Confirmação da clonagem de <i>xynB3</i> +pTrcHis A em gel de agarose	34
Figura 12 Gel SDS-PAGE 9%: Ensaio de expressão em condições padronizadas.....	36
Figura 13 Gel SDS-PAGE 9%: Resultado da tentativa de purificação 1.....	36
Figura 14 Gel SDS-PAGE 9%: Resultado da tentativa de purificação 2.....	37

1 INTRODUÇÃO

A grande quantidade de biomassa vegetal residual considerada como lixo é, potencialmente, um excelente substrato para o crescimento de várias bactérias e fungos produtores de enzimas industrialmente importantes (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). O xilano é um grande constituinte dessa biomassa lignocelulósica e as enzimas que o degradam têm recebido grande atenção nas últimas décadas. Nesse contexto, as β -xilosidases têm destaque importante devido às aplicações práticas em processos industriais (JORDAN *et al.*, 2012).

A biotecnologia moderna possibilita a produção em escala industrial de enzimas com atividades específicas visando aos processos inovadores com matérias primas renováveis e à preocupação com a melhoria do meio ambiente. Dessa forma, existe a necessidade da exploração biotecnológica a fim de identificar, isolar e super-expressar genes que codificam substâncias potencialmente promissoras para fins industriais. A manipulação genética se faz necessária porque possibilita a produção em níveis que sejam economicamente viáveis, além de aperfeiçoar e acelerar a atividade enzimática.

Dentre os microrganismos potencialmente aplicáveis na produção enzimática, pode-se citar a ainda pouco explorada bactéria aquática *Caulobacter crescentus*. Essa proteobactéria Gram-negativa possui um complexo conjunto de enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular vegetal, entre elas uma celulase, uma alfa glucosidase, quatro endo- β -xilanasas e cinco β -xilosidases (GRACIANO, 2011). A *C. crescentus* pode ser encontrada em qualquer tipo de água doce; possui capacidade adaptativa para ambientes oligotróficos; depende de poucos nutrientes para a sobrevivência e é equipada com sensores ambientais, transportadores e vias metabólicas adequadas para explorar metabólitos provenientes da decomposição de material vegetal (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

A *C. crescentus* cepa NA1000 teve seu genoma concluído (Marks *et al.*, 2010) e está disponibilizado na rede mundial de computadores na página do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O genoma apresenta o gene CCNA_00856 (aqui denominado *xynB3*), o qual codifica uma proteína do tipo β -xilosidase, possui 1623 nucleotídeos e codifica 540 aminoácidos.

Esta dissertação contribui com os estudos sobre o complexo xilanólítico da bactéria aquática *Caulobacter crescentus* por verificar a expressão heteróloga do gene *xynB3*. A partir desse estudo, trabalhos posteriores poderão ser realizados a fim de purificar e caracterizar a enzima recombinante para então verificar o potencial biotecnológico do produto desse gene.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Expressar o gene *xynB3* (número de acesso: CCNA_00856) de *C. crescentus* que codifica uma proteína com atividade 1,4- β -xilosidase em *E. coli*, visando à purificação e à caracterização enzimática.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o gene *xynB3* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Clonar a sequência codificadora do gene em vetor de clonagem (pJet 1.2/blunt);
- Subclonar o gene *xynB3* em vetor de expressão (pTrcHis A) para obtenção de uma proteína de fusão com cauda de histidina recombinante;
- Purificar e verificar a atividade predominante da enzima recombinante purificada e
- Caracterizar bioquimicamente a enzima pura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A bactéria *Caulobacter crescentus*

O gênero *Caulobacter* foi proposto por Henrici e Johnson no ano de 1935 com a finalidade de agrupar bactérias Gram-negativas arredondadas, fusiformes ou vibriões que apresentam um talo em uma de suas extremidades e têm multiplicação do tipo binária, transversal (POINDEXTER, 1981).

Em função das características peculiares do ciclo celular assimétrico da espécie *C. crescentus* (Figura 1), a mesma tem sido amplamente estudada. Naturalmente podem ser encontradas células de *C. crescentus* com duas morfologias distintas: uma forma móvel (flagelada) e outra sésil (que possui um talo com o qual consegue aderir aos substratos). Isso ocorre porque durante o ciclo, as células-talo alongam o corpo celular tornando-se células pré-divisionais. No lado oposto ao talo, um flagelo começa a ser sintetizado e assim que a citocinese ocorre, a célula pré-divisional dá origem a duas células morfologicamente diferentes. Posteriormente, as células móveis irão se diferenciar em células-talo e iniciar o ciclo celular novamente. Na diferenciação, o flagelo é ejetado para o meio extracelular e, no mesmo polo onde se encontrava anteriormente o flagelo, um novo talo é sintetizado (CURTIS; BRUN, 2010).

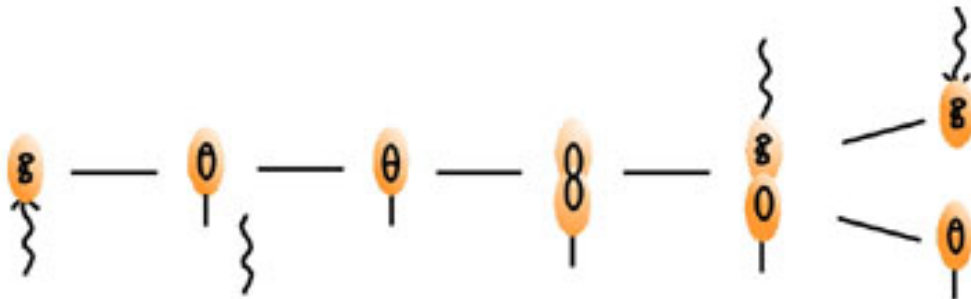


Figura 1 Ciclo de vida de *C. crescentus*. Fonte: <http://www.iq.usp.br/sulgomes/>

As bactérias da espécie *C. crescentus* são microrganismos aquáticos de vida livre que podem ser encontrados em qualquer tipo de água doce, água do mar ou em sedimentos. Entretanto, estão predominantemente presentes na forma planctônica móvel, assim formam um biofilme sobre a lâmina de água de rios e lagos. Essa espécie pertence ao grupo das α -proteobactérias, conhecidas em função de sua adaptação a ambientes oligotróficos. Elas são equipadas com vias metabólicas adequadas para explorar metabólitos oriundos da quebra de detritos orgânicos flutuantes e material vegetal (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

A fim de manter a sobrevivência em um ambiente hostil, tais bactérias desenvolveram algumas características adaptativas, tais como a capacidade de aumentar a

absorção de fosfato, regular o crescimento e o ciclo celular e diminuir a respiração em situações de deficiência de oxigênio. Isso é possível graças à carga genética das mesmas, que permite a bactéria *C. crescentus* sintetizar grande número de proteínas essenciais para sobrevivência em ambientes nutricionalmente pobres (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007, NIERMAN *et al.*, 2001).

Estudos com *C. crescentus* demonstram que essas bactérias podem ser usadas para degradar compostos aromáticos como benzoato e *p*-hidroxibenzoato (Chatterjee; Bourquin, 1987), e clorofenol (MANNISTO *et al.*, 1999). Além disso, elas podem ser utilizadas no tratamento ambiental por terem a função de remover cádmio em fontes contaminadas (Patel *et al.*, 2010), detectar níveis tóxicos de urânio e biodiesel em águas subterrâneas, indústrias ou diretamente no solo (HILLSON *et al.*, 2007).

Outra característica interessante de *C. crescentus* está relacionada com a expressão de vários genes que codificam enzimas hidrolíticas induzidas por xilose (JACKSON; NICOLSON, 2002). A possibilidade de metabolizar materiais lignocelulósicos abre caminho para a investigação biotecnológica, uma vez que tal ação pode possibilitar a degradação de resíduos provenientes da agroindústria e assim utilizá-los como substratos baratos para a síntese de produtos mais elaborados.

A linhagem de *C. crescentus* NA1000 é uma variante da cepa selvagem CB15, adaptada para ter funções conjugativas. Além disto, a NA1000 vem sendo amplamente utilizada em ensaios de laboratório em função da capacidade de sincronização do ciclo celular (EVINGER; AGABIAN, 1977).

3.2 Parede celular vegetal e seus constituintes

A Parede celular vegetal (Figura 2) é a fonte mais abundante de biomassa terrestre, pois a maior parte do carbono fixado por fotossíntese é incorporado aos seus polímeros. Essa complexa estrutura é formada por diversos compostos como proteínas, sais minerais, substâncias aromáticas e polissacarídeos, que estão conectados de forma bem organizada através de ligações covalentes e não covalentes. Dentre esses compostos, os polissacarídeos são os mais abundantes e representam cerca de 90% do peso seco da parede celular que, por sua vez, é constituída de celulose, hemiceluloses, lignina e pectinas. A estrutura e a composição molecular desses polissacarídeos diferem entre espécies, tecidos de uma mesma espécie e entre células de uma mesma planta (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010, FARINAS, 2011).

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da parede celular vegetal, que é subdividida em parede primária, secundária e terciária. Entre as células há uma fina camada composta por elevada concentração de lignina denominada lamela média. A hemicelulose liga-se às microfibrilas da celulose através de pontes de hidrogênio, formando uma rede

complexa que é a estrutura da parede celular da planta (FENGEL; WEGENER; GRUYTER, 1989).

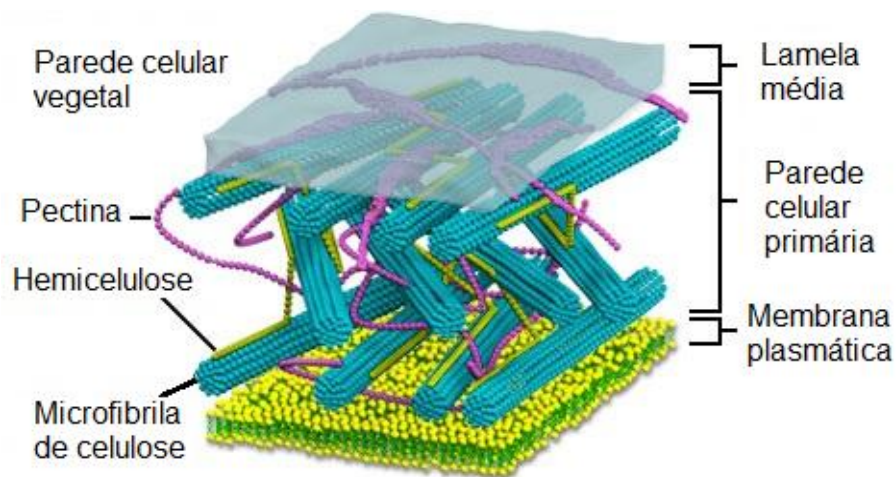


Figura 2 Representação esquemática da parede celular vegetal e seus constituintes. Ilustração adaptada de: <http://organellesandtheirspecials.weebly.com/the-cell.html>

Depois da celulose, a hemicelulose é o segundo maior constituinte das paredes celulares. É formada por uma estrutura principal, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. Nesse conjunto, a cadeia principal é composta por vários resíduos de açúcares pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) e ainda pode apresentar variadas quantidades de ácidos urônicos e grupos acetila. Todavia, as principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos, os mananos e os xilanos, (Figura 3) cujos constituintes principais são: glicose, manose e xilose, respectivamente (FARINAS, 2011).

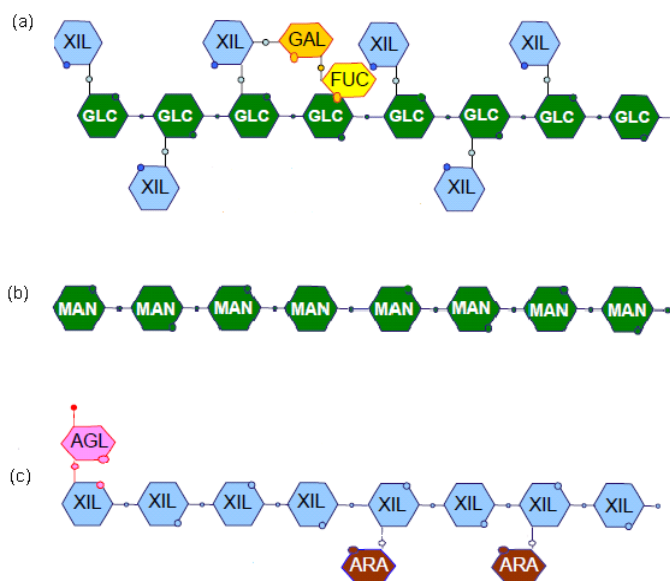


Figura 3 Principais hemiceluloses: xiloglucano (a), manano (b) e glucuronoarabinoxilano (c) e seus principais constituintes: GLC=glicose, XIL=xilose, MAN=manose, GAL=galactose, FUC= fucose, ARA=arabinose, AGL=ácido glucurônico. Fonte: Mat. didático disponível em: <http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDF%20TEORICA/Parede%20celular.pdf>

Para a síntese dos xilanos, as unidades de xilose ligam-se umas às outras através de ligações β -(1,4) e juntas formam uma estrutura linear, a cadeia principal. Os compostos que normalmente se ligam a essa cadeia são a arabinose e o ácido glucurônico para formar assim o glucuronoarabinoxilano. Esse composto é a hemicelulose mais abundante da parede celular de monocotiledôneas como o milho e a cana de açúcar. Em outras plantas, como nas dicotiledôneas, a xilose participa da constituição dos xiloglucanos através de ligações com as glicoses que formam ramificações laterais paralelas à cadeia principal (BERTOLO, 2007).

Diferente da celulose, que é sintetizada por complexos da membrana plasmática, o xilano é sintetizado pelo complexo de Golgi e requer ação e regulação de diversas enzimas. Pesquisas recentes identificaram vários genes envolvidos na síntese de xilano nas plantas, alguns dos quais já foram utilizados em esforços de engenharia genética para a criação de plantas molecularmente modificadas e mais adequadas para a aplicação na produção de biocombustíveis (RENNIE; SCHELLER, 2014).

O xilano é, portanto, o segundo maior constituinte da parede celular vegetal, depois da celulose, de grande parte das plantas cultivadas pela agricultura no Brasil e no Planeta. É parte representativa da massa lignocelulósica, tem função estrutural, ajuda a proteger a planta contra herbívoros, patógenos e, embora seja mais facilmente degradado do que a celulose, a degradação eficiente do xilano com bom rendimento de açúcares fermentescíveis ainda é um desafio. Com isso, estudar os genes e os processos envolvidos na degradação desse polissacarídeo é de fundamental importância para propor soluções biotecnológicas que atendam às atuais necessidades de processos industriais sustentáveis (RENNIE; SCHELLER, 2014).

3.3 Enzimas xilanolíticas

A degradação completa do xilano requer a ação sinérgica de uma variedade de enzimas (Figura 4), incluindo xilanases, β -xilosidases, α -glucuronidases, α -arabinofuranosidases e acetil-xilano esterases. A hidrólise enzimática da hemicelulose começa com as enzimas α -L-arabinosidase, α -D-glucuronidase, e acetil xilano esterase, as quais atuam para remoção das cadeias laterais que bloqueiam os locais onde as xilanases clivam a cadeia principal de xilano. Assim, as enzimas endo-1,4- β -xilanases clivam as ligações glicosídicas de maneira seletiva em função do comprimento da cadeia principal e grau de ramificação. A quebra da cadeia produz xilooligossacarídeos, substratos disponíveis para as β -xilosidases que hidrolisam esses oligossacarídeos de cadeia curta de xilobiose a partir dos terminais não redutores liberando monômeros de xilose (SHI *et al.*, 2013; KIRIKYALI; CONNERTON, 2014).

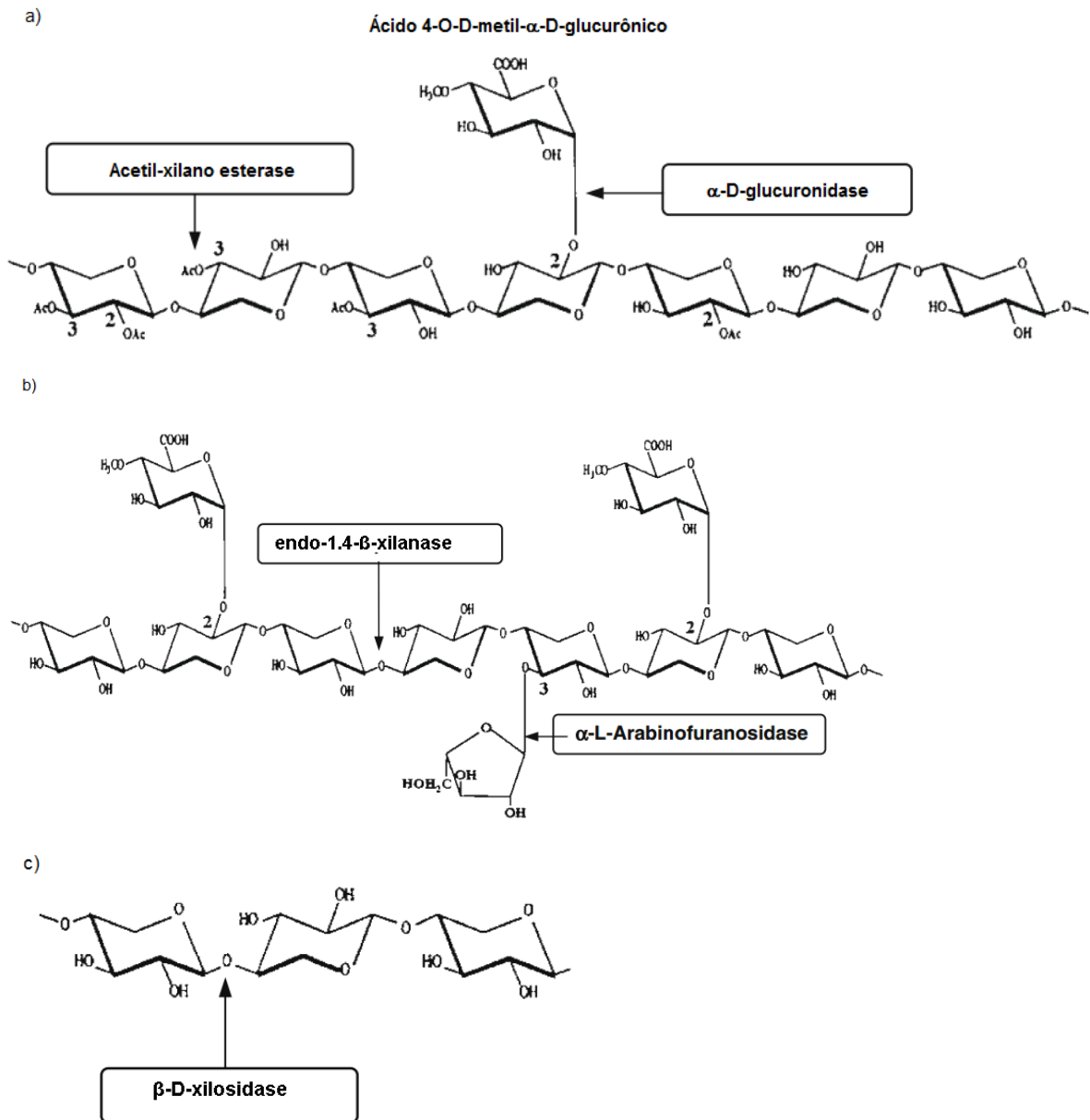


Figura 4 Enzimas envolvidas na hidrólise enzimática do xilano. Ilustração Adaptada de: (POLIZELI *et al.*, 2005).

A função de β -xilosidase não está limitada à degradação de xilooligossacarídeos. Essa enzima também contribui para a redução da inibição pelo produto final de xilanases (SHI *et al.*, 2013). Nos últimos anos muitos esforços na área de biotecnologia têm sido feitos para caracterizar bioquimicamente novas β -xilosidases de diferentes fontes com a esperança de utilizá-las industrialmente, de forma que possam substituir compostos químicos poluidores. Segundo o Carbohydrate-Active Enzymes Database: CAZY (www.cazy.org), as β -xilosidases são agrupadas com base em suas semelhanças de sequência de aminoácidos e classificadas em cinco famílias de glicosil hidrolases (GH 3, 39, 43, 52 e 54).

A utilização biotecnológica para melhorar a atividade de xilanases também tem crescido consideravelmente nos últimos anos devido à abrangência de aplicação em diversas indústrias. Além de seu conhecido uso em indústrias de celulose, os xilanos e as xilanases são utilizados como aditivos alimentares para aves, em farinha de trigo para melhorar a massa e a qualidade de alimentos; para a extração de café, óleos vegetais, e amido; no melhoramento de propriedades nutricionais da silagem agrícola e cereais forrageiros; em combinação com pectinase e celulase para o processamento de sucos de frutas, e na degomagem de fontes de fibra vegetal, como o linho de cânhamo e na produção de xilitol. A utilização de xilanases pode melhorar muito a economia global do processamento de materiais lignocelulósicos para a geração de combustíveis e outros produtos. As xilanases, celulases e pectinases representam 20% do mercado mundial do comércio de enzimas (YANG *et al.*, 2014; BAJPAI, 2014).

As xilanases podem ser produzidas industrialmente em cultura líquida submersa ou sobre um substrato sólido. Entretanto, cerca de 80-90% de todas as xilanases são produzidas em cultura submersa. Nas culturas em substrato sólido, os farelos de trigo e de arroz são considerados como indutores. Substratos alternativos para a produção de enzimas também foram relatados, como bagaço de cana, sabugo de milho, casca de arroz e pasta de madeira (POLIZELI *et al.*, 2005; KADOWAKI; PACHECO; PERALTA, 1995).

3.4 Clonagem molecular e a expressão de β -xilosidases recombinantes

No início da década de 1970, um conjunto de técnicas no âmbito dos estudos em Genética e Biologia Molecular começaram a se desenvolver. Essas metodologias inovadoras foram coletivamente chamadas de tecnologia do DNA recombinante. Com o desenvolvimento dessa tecnologia, a manipulação de genes para expressão heteróloga de proteínas de interesse biotecnológico e industrial é uma realidade crescente e tem revolucionado a produção de proteínas e enzimas anteriormente disponíveis apenas em quantidades extremamente reduzidas (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2014).

Ao longo de anos de estudos com β -xilosidases, pesquisadores da área contribuíram com informações relevantes sobre tais enzimas. Uma breve revisão sobre o comportamento *in vitro*, de algumas β -xilosidases recombinantes de origem fúngica e bacteriana já caracterizadas, pôde ser realizada para auxiliar os estudos durante o presente trabalho. Parte dela está resumida na sequência:

3.4.1 β -xilosidases de origem bacteriana

As β -xilosidases recombinantes de origem bacteriana possuem semelhanças em relação à faixa de pH em que atuam. Mostram ótima atividade em valores próximos a 6,0 e

permanecem relativamente estáveis na faixa entre 5,0 e 7,0. Entretanto, algumas dessas enzimas estudadas possuem características que as diferenciam das demais, como é o caso da β -xilosidase isolada da bactéria termófila *Thermotoga thermarum* estudada por Shi *et al.* (2013). Neste trabalho, a proteína recombinante de 85 Kilodaltons (KDa) foi expressa em *Escherichia coli* BL21 (DE3) e mostrou atividade ótima a 95 °C e pH 6,0, mantendo-se estável a um intervalo de pH de 5,0 a 7,5 e meia vida de 2 horas a 85 °C.

Os parâmetros cinéticos foram de 0,27 milimolar (mM) e 223,3 unidades por miligrama (U/mg) para p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) e 0,21 mM e 75 U/mg para p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosido (pNPA). Outra característica importante foi a alta tolerância à xilose, pois manteve 50% da sua atividade original mesmo quando a concentração de xilose foi tão elevada quanto 1000 mM., além de exibir elevada atividade hidrolítica em xilo-oligossacarídeos.

A boa atividade observada em uma ampla faixa de pH é uma propriedade importante. Tal característica foi apresentada pela β -xilosidase recombinante de *Geobacillus thermodenitrificans*, quando estudada por Jain *et al.* (2014). A enzima mostrou ótima atividade em pH 7,0 e 60 °C e bom desempenho na faixa que compreende pH de 5,0 a 8,0. Manteve 70% de atividade residual em pH 8,0 e 42% de atividade em pH 9,0. Isso pode ser considerado um diferencial importante em comparação com outras β -xilosidases que apresentam, em geral, pouca ou nenhuma atividade em pH alcalino.

A enzima de *Alicyclobacillus sp.*, estudada por Zhang *et al.* (2014), merece destaque em relação à atividade enzimática observada no grupo de β -xilosidases recombinantes de origem bacteriana, cuja atividade enzimática de 564,9 unidades por mililitro (U/mL), degradou com eficiência o substrato pNPX e mostrou-se bastante acima dos padrões normalmente encontrados para β -xilosidases bacterianas. Essa enzima obteve a mais elevada atividade de β -xilosidase específica conhecida até o momento para a família 52 das glicosil hidrolases (GH52), que foi de 261,1 U/mg e com eficiência catalítica de 601,5 milimolar por segundo (mM/s). As condições ideais de atividade foram observadas com a faixa de temperatura entre 60 e 65 °C, a qual se manteve estável ao longo da gama de pH 5,0 a 9,0. Logo, corresponde a uma ampla faixa de tolerância. A termoestabilidade dessa enzima também é notável, pois manteve quase toda a atividade após uma hora de incubação a 65 °C.

Outra enzima interessante foi caracterizada por Corrêa *et al.* (2012). Nesse estudo, o produto de um gene que codifica β -xilosidase em *Caulobacter crescentus* foi expresso em *E. coli* com uma atividade de 215 miligramas por litro (mg L^{-1}) para o substrato pNPX em condições ótimas de pH 6,0 e 55 °C. Apresentou ainda estabilidade ao pH na faixa de 4,5 – 7,5 e demonstrou mais de 50% da sua atividade original (imediatamente após purificação) depois de 6 meses de incubação a pH 6,0 e 4 °C, assim, demonstra ser estável a condições de armazenamento. Essa enzima ainda foi capaz de produzir açúcares redutores de forma

eficiente a partir de fibras de xilana de bétula e bagaço de cana pré-tratados com uma xilanase purificada, mostrando sinergia com outras enzimas. Segue abaixo uma tabela para comparação entre diferentes enzimas recombinantes.

Tabela 1 Principais características de algumas β -xilosidases recombinantes de origem bacteriana

Microrganismo	<i>Alicyclobacillus</i> <i>sp</i>	<i>Caulobacter</i> <i>crenscentus</i>	<i>Caulobacter</i> <i>crenscentus</i>	<i>Thermotoga</i> <i>thermarum</i>	<i>Geobacillus</i> <i>thermodenitrificans</i>
Substrato	p-NPX, arabinoxilano de trigo, xilano de birchwood,	p-NPX, xilobiose, xilotriose e xylopentaose	oNPX, pNPA	p-NPX, p-NPA	p-NPX, xilano de birchwood
pH ótimo	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0
Estabilidade ao pH	5,0-9,0	4,5-7,5	3,0 -10,0	5,0 -7,5	5,0-8,0
Temperatura ótima (°C)	65 °C	55 °C	45 °C	95 °C	60 °C
Estabilidade térmica	65 °C (1h)	60 °C (4h)	45 °C (4h)	85 °C (2h)	70 °C (58min.)
Massa molecular	78,5 kDa	60 kDa	65 kDa	85 kDa	68 kDa
Atividade enzimática	261,1 U mg ⁻¹ (p-NPX)	215 mg L ⁻¹ (p-NPX)	1,25 U mg ⁻¹ (oNPX) 0,47 U/ mg ⁻¹ (pNPA)	nd*	70 U ml ⁻¹ (p-NPX)
Vmax	341,6 μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹	402 \pm 19 μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹	1,4 \pm 0,04 μ M min ⁻¹	223,3 U (mg proteína)	1250 μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹
Km	0,74 mM	9,3 \pm 0,45 mM	2,89 \pm 0,13 mM	0,27 mM	2 \times 10 ⁻³ M (p-NPX)
Fonte	Zhang <i>et al.</i> 2014	Corrêa <i>et al.</i> 2012	Graciano <i>et. al.</i> 2012	Shi <i>et al.</i> 2013	Jain <i>et al.</i> 2013

*nd: Não determinado

3.4.2 β -xilosidases de origem fúngica

Grande parte das β -xilosidases recombinantes de origem fúngica tem atividade ótima na faixa de temperatura entre 50 e 60 °C. Algumas diferem das demais por apresentar melhor resultado em temperatura igual ou inferior a 40 °C, como é o caso das β -xilosidases de *Aspergillus oryzae*, (SUZUKI *et al.*, 2010) e *Penicillium purpurogenum* (RAVANAL *et al.*, 2013). A maioria das β -xilosidases isoladas de fungos mostra-se estável por poucas horas e nem sempre a temperatura ótima encontrada é aquela que confere maior estabilidade térmica. Nesse sentido, pode-se considerar que as enzimas isoladas de *Paecilomyces thermophila* (Juturu; Wu, 2012; Teng *et al.*, 2011) possuem considerável estabilidade porque mantêm boa atividade após 72 e 10 horas, respectivamente, após incubação em temperaturas ótimas predefinidas.

Em relação ao pH, essas enzimas apresentam atividade ótima na faixa entre 5,0 e 7,0 e são, em geral, tolerantes a ambientes alcalinos. Duas β -xilosidases isoladas de *Humicola insolens* (YANG *et al.*, 2014) merecem destaque por apresentarem ampla faixa de tolerância ao pH, sendo estáveis entre 5,0-12,0 (xyl43A) e 6,0-10,0 (Xyl43B). Entretanto, algumas possuem afinidade a ambientes mais ácidos, como é o caso das isoladas de *Neurospora crassa* (Kirikyali; Connerton, 2014), *Aspergillus sp* (Wongwisansri *et al.*, 2013) e *Phanerochaete chrysosporium* (Huy *et al.*, 2014) que apresentam estabilidade na faixa de 4,0-6,0, de 3,0-6,0 e de 3,0-8,0, respectivamente.

Ensaio *in vitro* têm constatado que muitas enzimas com atividade de β -xilosidase são capazes de hidrolisar os substratos pNPX e pNPA, mas não é comum a observância de atividade com outro tipo de substrato comercial. Tal característica leva a crer que essas enzimas adotam dois padrões: parte delas tem atividade unicamente β -xilosidase e a outra parte é bifuncional com predominância para o tipo β -xilosidase/arabinofuranosidase. A afinidade ao substrato é bastante variável.

3.5 Desafios na produção de enzimas recombinantes

A expressão de polipeptídeos heterólogos em *E. coli* consiste em um sistema bastante difundido e utilizado por pesquisadores do mundo todo para produção de proteínas recombinantes que não necessitam de modificação pós-tradução, tal como a glicosilação (SWARTZ, 2001). Entretanto, a expressão de altos níveis de proteínas recombinantes por vezes resulta em acúmulos, *in vivo*, de agregados insolúveis no citoplasma da célula hospedeira. Esses corpos densos de precipitado proteico são denominados corpos de inclusão. Proteínas nessa situação são desprovidas de atividade biológica e precisam de solubilização e enovelamento adequado, além de eficientes procedimentos de purificação para recuperação de um produto final com atividade (SINGH; PANDA, 2005). Proteínas hidrofóbicas e com ligações dissulfeto em sua estrutura são mais propensas a formar corpos de inclusão, uma vez que o ambiente de redução do citosol bacteriano inibe a formação de ligações dissulfeto (MITRAKI *et al.* 1991).

Os corpos de inclusão são partículas mais densas do que muitos dos componentes celulares e podem ser separados por centrifugação após o rompimento das células. Essas estruturas costumam conter pouca proteína hospedeira ou outros componentes ribossômicos. São basicamente constituídos pela proteína heteróloga superexpressa que se agrega. Características significativas de agregados de proteínas em corpos de inclusão são a existência da estrutura secundária semelhante à nativa da proteína expressa e resistência à degradação proteolítica (TAYLOR *et al.*, 1986).

A solubilização dos corpos de inclusão pode ser feita pela utilização de uma concentração elevada de agentes desnaturantes, tais como ureia ou cloridrato de guanidina,

juntamente com um agente redutor tal como o β -mercaptoetanol. As proteínas solubilizadas podem então ser renaturadas por remoção lenta do desnaturante na presença de agente oxidante em um processo chamado reenovelamento. É importante frisar que a velocidade em que a proteína precipita é maior do que a velocidade com que ela se renatura. A perda da estrutura secundária durante a solubilização e a interação entre as moléculas de proteínas desnaturadas, que resulta em agregados protéicos durante o processo de redobramento, são consideradas como as principais razões da má recuperação de proteínas bioativas. Assim, a conversão da proteína insolúvel e inativa em um produto solúvel e corretamente dobrado é um grande desafio na produção de enzimas que formam corpos de inclusão (MITRAKI *et al.*, 1991).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Bioquímica Molecular, localizado na sala 136 do prédio de Biomédicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE – *campus* de Cascavel) durante 2013 e 2014. As metodologias e protocolos adotados têm como referência principal o Manual de Referências de Clonagem Molecular apresentado por Sambrook *et al.* (1989), e os protocolos utilizados nos trabalhos de Corrêa (2011); Corrêa *et al.* (2012); Corrêa *et al.* (2014); Graciano (2011) e Graciano *et al.* (2012).

4.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

As estirpes bacterianas bem como os plasmídeos que foram utilizados no estudo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 Linhagens bacterianas e plasmídeos

Linhagem/ plasmídeo	Função	Propriedades	Fonte ou referência
<i>C. crescentus</i>			
NA1000	Isolamento do gene <i>xynB3</i>	Sincronizável e com funções conjugativas	Evinger & Agabian, 1977
<i>E. coli</i>			
DH5 α	Clonagem do gene <i>xynB3</i> Modificações no Genoma: (<i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)</i> <i>supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>)	Permite seleção branca/azul; baixa degradação por endonuclease e baixa taxa de recombinação	Invitrogen [®]
TOP10	Super-expressão do gene <i>xynB3</i> Modificações no Genoma: (F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>)	Cepa derivada da <i>E. coli</i> DH10B, permite seleção branca/azul; baixa degradação por endonuclease e baixa taxa de recombinação	Invitrogen [®]
Plasmídeos			
pJET 1.2/ <i>blunt</i>	Vetor de clonagem (Amp ^R)	Clonagem em DH5 α Confere resistência à ampicilina	Thermo scientific [®]
pTrcHis A	Vetor de Expressão (Amp ^R)	Expressão em TOP10 Histidinas N-terminal Confere resistência à ampicilina	Invitrogen [®]

4.2 Meios de cultura e manutenção dos microrganismos

As culturas-estoque de *E. coli* (DH5 α e TOP10) foram crescidas em meio líquido e sólido de LB (Meio Luria-Bertani contendo: bacto-triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 1,5%; pH 7,5) a 37 °C durante 12 horas. As placas com meio sólido foram mantidas a 4 °C e o repique foi a cada vinte dias. As colônias estoque com LB líquido foram armazenadas em freezer a -80 °C com glicerol 50%. Para seleção e manutenção dos recombinantes foi adicionado ao meio LB o antibiótico ampicilina (citado neste trabalho como LBA), sempre na concentração de 100 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

As culturas-estoque de *C. crescentus* (cepa NA1000) foram crescidas em meio de cultura, sólido e líquido do tipo PYE (do inglês “Peptone-Yeast Extract” contendo: bacto-peptona 0,2%; extrato de levedura 0,1%; MgSO₄ 0,2g; CaCl₂ 0,5 mM; ágar bacteriológico 1,5% – para os meios sólidos) e em meio mínimo de cultivo - M2 (Na₂HPO₄ 12 mM; KH₂PO₄ 8 mM; NH₄Cl 9 mM; FeSO₄ 10 mM; MgSO₄ 2mM; CaCl₂ 0,5 mM; glicose 0,2%) a 30 °C. (JOHNSON e ELY, 1977).

4.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos, para o isolamento do gene que codifica a β -xilosidase III de *C. crescentus* (cepa NA1000), foram desenhados com base no genoma da bactéria disponível no *GenBank*. Porém, o gene de interesse foi denominado neste trabalho como *xynB3* (número de acesso: CCNA_00856) porque outros dois genes (*xynB1* e *xynB2*) para a mesma classe de enzimas já foram estudados pelo laboratório (CORRÊA, 2011), GRACIANO, 2011). Portanto, a proteína heteróloga expressa em *E. coli* a partir do gene *xynB3* foi referida como β -xilosidase III.

Os dados do sequenciamento completo são de consulta livre através do NCBI no domínio público <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Bioneer - AccuOligo[®] e foram diluídos para uma concentração final de 50 picomoles por microlitro ($\rho\text{moles}/\mu\text{l}$). Os detalhes dos oligonucleotídeos estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 3 Oligonucleotídeos para amplificação do gene *xynB3*

Nome do Oligonucleotideo	Sequência 5' – 3'	Fragmento que amplifica (kb)
<i>xynB3-EcoRI-leu</i>	AAG AAT TCT GGT CGA TAT CAA CCG TCG A	1,6
<i>xynB3-HindIII-stop</i>	TAT AAG CTT TTA CGG CAA CGC CCG ATA	1,6

Os sítios de restrição para as ezimas *EcoRI* e *HindIII* estão destacados em negrito.

4.4 Obtenção do DNA genômico de *C. crescentus*

O isolamento de DNA genômico de *C. crescentus* foi realizado de acordo com a técnica descrita por Chen e Kuo (1993), conforme o protocolo a seguir.

Culturas bacterianas foram crescidas em 1,5 mililitros (mL) de meio de cultura PYE durante 12 horas a 30 °C sob agitação de 120 rotações por minuto (rpm). No dia seguinte, foram centrifugadas a 12.000 força-g (x g) por 10 minutos à temperatura ambiente (TA) e ressuspensas em 200 microlitros (µL) de tampão para extração (Tris-acetato pH 7,8 40 mM; NaOAc 20 mM EDTA 1 mM; SDS 1% em um total de 100 mL).

Na suspensão, foram adicionados 66 microlitros de cloreto de sódio (NaCl) a 5 molar (M), seguidos de uma centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e então acrescentados 250 µL de uma solução composta por clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1 que agiu como agente de desnaturação proteica. O material foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x g por três (3) minutos TA. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado duas vezes o volume de etanol absoluto (EtOH) e precipitado no freezer a - 80 °C durante duas horas.

Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Ao restante do material precipitado no fundo do tubo foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi novamente aspirado em trompa a vácuo com cuidado para não tocar o precipitado. A amostra então foi seca em estufa a 37 °C por duas horas. Após esse período, o precipitado de DNA genômico contido no tubo foi ressuspensão em 50 µL de tampão Tris-EDTA acrescido de ribonuclease na concentração final de 100 µg/mL (TE/RNase) e a amostra foi armazenada à temperatura de -20 °C até o momento de uso.

4.5 Amplificação do gene *xynB3*

A região correspondente ao gene de interesse foi amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pelas seguintes etapas: DNA molde desnaturado a 94 °C por 30 segundos, hibridação com os oligonucleotídeos a 55 °C por 30 segundos, extensão dos fragmentos em presença de desoxiribonucleotídeos (dNTPs) a 68 °C por dois minutos pela Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) em um volume final de reação de 50 µL. Foram realizados 35 ciclos em termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®).

Após a reação de PCR, uma alíquota do produto final foi imediatamente aplicada para análise em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X concentrado (Tris Base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 10 mM; pH 8). A outra parte foi utilizada para

sequenciamento de DNA após prévia purificação e o restante foi congelado para procedimentos de clonagem posteriores.

Os reagentes utilizados bem como seus volumes e concentrações estão definidos na Tabela 4 mostrada a seguir.

Tabela 4 Protocolo da reação de PCR para o gene *xynB3*

PRODUTOS	UNIDADES
Água MilliQ	16 µL
DNA Genômico de <i>C.crescentus</i> NA1000 (200 ηg/µL)	1 µL
Oligonucleotídeo Forward: <i>xynB3</i> - Met (50ρmoles/µL)	1 µL
Oligonucleotídeo Reverse : <i>xynB3</i> - Stop (50ρmoles/µL)	1 µL
Dimetil sulfóxido (DMSO ultrapuro)	5 µL
Tampão 2X Reaction Mix* (Invitrogen [®])	25 µL
Enzima Platinum [®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen [®]) (2,5 U)	1 µL
Volume Total	50 µL

*O tampão contém: (0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM de MgSO₄)

4.6 Confirmação da amplificação em gel de agarose

Uma alíquota de 4 µL do produto de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose (Sigma[®]) com o tampão TAE 1X. Após a corrida, o gel foi corado com Brometo de etídeo (EtBr) e a banda de 1,6 kilobases (kb) correspondente ao gene *xynB3* pôde ser visualizada em transiluminador por luz ultravioleta. Foi utilizado como marcador de DNA o 1Kb DNA Ladder Plus (Promega[®]).

4.7 Preparo dos fragmentos para ligação com vetor de clonagem

A reação de PCR com a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen[®]) gerou um produto final, correspondente ao gene em estudo contendo aproximadamente 1,6 kb, com extremidades coesivas. Grande parte dos vetores de clonagem exige um processo de digestão enzimática do fragmento de interesse e também do plasmídeo. Porém, com o kit de clonagem Clone pJET1.2 *blunt* PCR (Thermo scientific[®]), foi possível ligar o produto de PCR no vetor de clonagem sem preparação prévia do plasmídeo com enzimas de restrição, porque o vetor já vem linearizado com um único sítio não coesivo (*blunt*).

Para a obtenção de fragmentos de PCR com extremidades não coesivas (*blunt ends*), o fragmento correspondente ao gene de interesse precisou passar por um processo breve de tratamento, chamado de reação “*blunt*”, com uma polinucleotídeo quinase. Assim, o produto de PCR foi incubado a 70 °C por cinco minutos e resfriado a 4 °C por cinco minutos para inativar a enzima. Nesse momento, as extremidades foram tratadas, assim, foi

possível iniciar o processo de ligação do gene com o plasmídeo (Figura 5). O protocolo para a reação está detalhado na Tabela 5.

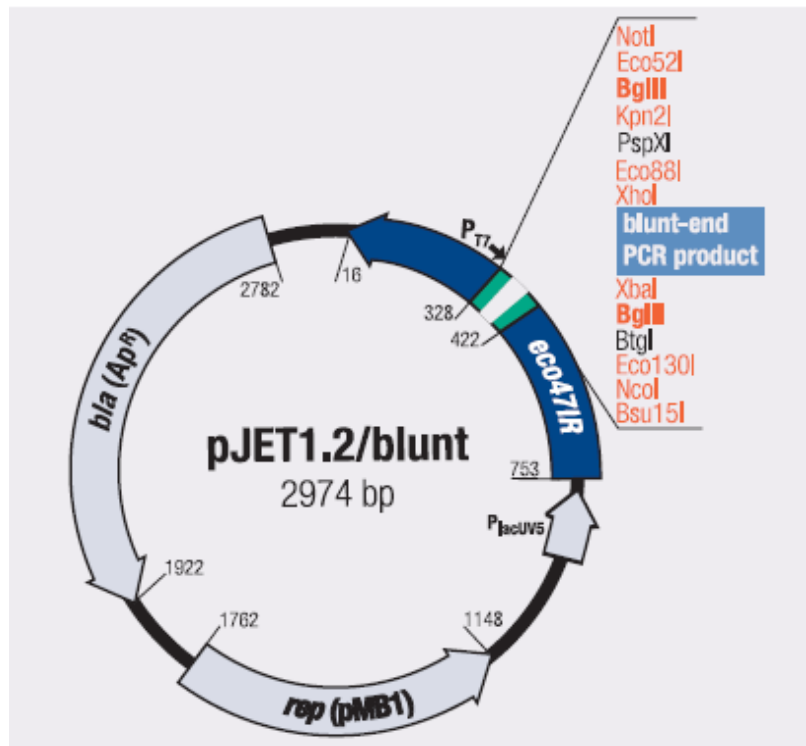


Figura 5 Mapa do vetor de clonagem pJET 1.2 *blunt* da Thermo scientific®

Tabela 5 Reação “*blunt*” dos produtos de PCR

Componentes	Volume
2X Reaction Buffer* (contém polinucleotídeo quinase)	10 µL
Produto de PCR	1 µL
Água nuclease free*	6µL
DNA <i>Blunting</i> (Fermentas®)*	1 µL
Total da reação	18 µL

* Incluídos no kit de clonagem clone JET PCR Thermo scientific®

O produto de PCR foi quantificado em espectrofotômetro de acordo com a técnica descrita por Sambrook e Russel (2001) e a concentração foi ajustada a partir da diluição com água deionizada estéril, de acordo com o protocolo do fabricante do kit de clonagem clone JET PCR Thermo scientific®.

4.8 Ligação entre vetor e fragmento

Foram adicionados ao microtubo contendo a reação *blunt* descrita na Tabela 5 acima, 1 µL do vetor de clonagem (50 ng/µL) previamente descongelado em banho de gelo e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (5 U/µL) da Thermo scientific®. A reação de ligação foi

incubada a 22 °C por 60 minutos e, após essa fase, usada para transformação de células de *E. coli* DH5 α competentes.

4.9 Preparo de células competentes

Células de *E. coli* quimicamente competentes foram preparadas com cloreto de cálcio (CaCl₂). Assim, foi possível o processo de transformação de acordo com a técnica descrita por Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989).

Para esse procedimento, uma alíquota de um estoque de células de *E. coli* DH5 α foi repicada em placa contendo meio LB sólido e incubada por 12 horas a 37° C. Após o crescimento celular, uma colônia isolada dessa placa foi lançada em 5 mL de meio LB líquido e incubada por mais 12 horas sob agitação orbital de 120 rpm a 37 °C, para o crescimento na forma de pré-inóculo. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado em 30 mL de novo meio LB líquido e incubado novamente sob as mesmas condições de agitação e temperatura.

As células tiveram seu crescimento monitorado em espectrofotômetro até a cultura atingir a densidade óptica de 0,5 em 600 nanômetros (D.O. $\lambda=600nm$). A partir dessa condição, as células foram transferidas para um tubo novo e estéril com capacidade de 50 mL, e mantidas em banho de gelo por 10 minutos. Uma centrifugação a 6.000 x g durante 10 minutos a 4 °C foi utilizada para concentrar as células. Enquanto o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 10 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M gelada e incubada por mais 10 minutos em banho de gelo.

Na sequência, foi realizada uma segunda etapa de centrifugação e de ressuspensão do precipitado sob as condições descritas anteriormente, dessa vez com a mudança do volume de CaCl₂ 0,1 M para então 1 mL. Assim, as células de *E.coli* ficaram competentes para serem transformadas e foram mantidas em banho de gelo sob refrigeração até a hora da transformação, feita no mesmo dia. Este tratamento deixa as células viáveis para uso em transformações bacterianas em no máximo 48 horas.

4.10 Transformação das células de *E. coli*

A técnica do choque térmico, cuja função é alterar a permeabilidade da membrana celular e permitir que uma sequência de DNA exógeno adentre a célula, foi utilizada para a transformação das bactérias.

Foram utilizados 200 μ L de células competentes e, para transformá-las, adicionaram-se 20 μ L da ligação contendo plasmídeo e DNA de interesse a ser clonado. O material ficou em banho de gelo por 15 minutos e o choque térmico foi dado em banho-

maria previamente estabilizado a 42 °C por 90 segundos. Imediatamente ao término do tempo de 90 segundos, o tubo foi retirado e acomodado em banho de gelo. Ao tubo foi adicionado 1mL do meio LB líquido e incubado a 37 °C por 60 minutos para que a bactéria expressasse o gene de resistência à ampicilina. Foram centrifugados 12.000 x g por dois minutos. Em seguida, verteu-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso com 300 µL do meio LB líquido. Em campo estéril e com o auxílio de uma alça de Drigalski, as células transformadas foram plaqueadas em ágar de LBA (Meio LB contendo ampicilina a 100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 12 horas.

Os recombinantes foram selecionados em meio contendo o antibiótico, característica adquirida devido à ligação com pJET 1.2 *blunt*. Nesse sistema, espera-se que todas as colônias que cresceram na presença de ampicilina sejam clones *xynB3* + pJET 1.2 *blunt* porque não expressaram o gene que codifica uma proteína letal para a célula. Entretanto, na prática podem existir falhas nesse processo e por esse motivo é importante a confirmação da clonagem. Para isso, doze (12) colônias foram selecionadas e de cada uma delas foi realizada a extração do DNA plasmidial dos possíveis recombinantes, seguida pela digestão com as enzimas de restrição e aplicação em gel de agarose.

4.11 Minipreparação plasmidial (miniprep)

Após o crescimento das células *E. coli* transformadas, quando cultivadas em placas de Petri com meio seletivo sólido, escolheram-se colônias isoladas para testar a clonagem a partir da minipreparação plasmidial, também denominada de mini-prep (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Retirou-se cada colônia da placa LBA com o auxílio de um palito estéril, que foi imediatamente lançado em um tubo de vidro pequeno (com capacidade para 10 mL) contendo 1,5 mL de meio líquido LBA. Repetiu-se o mesmo procedimento com as demais colônias até o número total de doze. Os tubos foram tampados e incubados a 37 °C por 12 horas com agitação de 120 rpm em incubador *shaker* com agitação orbital. Tal procedimento foi denominado pré-inóculo das colônias.

No dia seguinte, as diferentes culturas bacterianas estavam em fase estacionária, portanto turvas. Foram transferidas para microtubos com 1,5 mL de capacidade e centrifugadas por cinco minutos a 12.000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado em trompa a vácuo e descartado. Utilizou-se o precipitado celular para o teste de colônias recombinantes a partir da extração do DNA plasmidial.

Optou-se por realizar o método da mini-prep de hidrólise alcalina, por ser mais econômico, e apenas quando as clonagens foram confirmadas, utilizou-se o kit Pure Link[®] da Invitrogen[®] para obter um material mais puro, ideal para análises mais finas subsequentes como a confirmação da identidade do gene por sequenciamento automatizado de DNA. Os dois métodos estão descritos a seguir.

4.11.1 Miniextração plasmidial – Hidrólise alcalina

O sedimento de células obtido na etapa do pré-inóculo foi ressuspenso em 100 mL de Solução I gelada (glicose 50 mM; tris-HCl pH 8,0 25 mM; EDTA 10 mM; pH: 8,0 ; q.s.p. H₂O ultrapura). Foi necessária a adição de 200 µL de solução II fresca (NaOH 200 mM; SDS 1%), os quais foram misturados por inversão do tubo até que esse ficasse leitoso. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução III gelada (Acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 29mM, H₂O milli-Q). Agitou-se o tubo em vórtex até homogeneizar bem e centrifugou-se a 10.000 x g por cinco minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e a ele foram adicionados 200 µL de fenol (previamente equilibrado em pH 8 com Tris-HCl 1M e 0,1M) e 200 µL de uma solução composta por clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1. Agitou-se em vórtex até completa homogeneização, centrifugou-se a 10.000 x g, por cinco minutos a TA. O sobrenadante foi recuperado em tubo novo, livre de DNase e RNase, e foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado. Deixou-se em repouso em banho de gelo por cinco minutos, os tubos foram centrifugados novamente a 11.000 x g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado em trompa a vácuo e o precipitado ressuspenso em etanol 70% gelado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por alguns segundos e em seguida centrifugadas a 11.000 x g por cinco minutos, a 4 °C.

Descartou-se o etanol, inverteu-se o tubo em papel absorvente e a secagem foi realizada em estufa a 37 °C por 2 horas. Passado esse período, foram adicionados 30 µL de TE/RNase ao tubo com precipitado de DNA. O tubo com o DNA plasmidial foi então etiquetado e armazenado a - 20 °C até o processo de digestão enzimática.

4.11.2 Miniextração plasmidial – Kit Invitrogen®

De acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, o método de lise pelo Kit Invitrogen® foi inicialmente feito pela ressuspensão do precipitado celular (do pré-inóculo) dos recombinantes com 250 µL do tampão R3 que contém RNase. Em seguida, foi adicionado 250 µL de tampão L7 (contendo SDS) à mistura, responsável pela lise; depois foi preciso deixar em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente (TA).

Foram adicionados 350 µL do tampão N4 para a desnaturação e precipitação de proteínas. O próximo passo foi agitar o tubo por inversão até a homogeneidade; em seguida, foi feita a centrifugação por dez minutos, 12.000 x g a TA. Transferiu-se a solução contendo o DNA plasmidial solúvel para um tubo de minicoluna do próprio kit a fim de acomodar a coluna em um tubo de lavagem como suporte inferior.

A passagem da amostra pela coluna foi realizada com centrifugação por um minuto a 12.000 x g a TA. Descartou-se o eluato e a coluna voltou para o mesmo tubo de lavagem

uma vez que ela apresentava cargas positivas, conseqüentemente, o DNA ficou retido na mesma. Foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem dentro da coluna, contendo etanol absoluto (W10). Em seguida, o material foi incubado por um minuto TA e centrifugado por 1 minuto 12.000 x g TA. O eluato foi descartado e a coluna voltou para o mesmo tubo de lavagem. Foram adicionados 700 µL do tampão W9 dentro da coluna). Em seguida, o material foi centrifugado por um minuto, 12.000 x g a TA. Descartou-se o eluato e a coluna voltou para o mesmo tubo de lavagem. Para a remoção dos resíduos do tampão W9, foi preciso centrifugar o material por um minuto 12.000 x g TA.

O tubo de lavagem foi descartado, a coluna limpa com papel absorvente e acomodada em outro tubo de 1,5 mL de capacidade como suporte inferior. Adicionam-se 60 µL de tampão TE no centro da coluna. Foi preciso também incubar a mistura por um minuto em TA, além de centrifugá-la por dois minutos 12.000 x g também em TA e descartar a coluna a fim de armazenar o eluato contendo o DNA plasmidial de interesse. A minipreparação do plasmídeo purificado foi devidamente identificada e armazenada a -20 °C para procedimentos posteriores.

4.12 Digestão enzimática e confirmação da clonagem em gel de agarose

Após a extração do DNA plasmidial das células transformadas pelo método da hidrólise alcalina, o próximo passo para a confirmação da clonagem foi a digestão pelas enzimas de restrição. Os oligonucleotídeos foram desenhados com sítios de ligação para as enzimas *EcoRI*, que reconhece o sítio GAATTC e *HindIII*, o qual cliva o DNA na sequência AAGCTT. Segue na tabela abaixo o protocolo utilizado para digestão.

Tabela 6 Protocolo de digestão enzimática – Mini-prep Hidrólise alcalina

Componente da reação	Volume
Alíquota da Mini Prep	10 µL
Tampão Buffer 10x M*	2 µL
Enzima <i>EcoRI</i> (Invitrogen) [®]	0,5 µL
Enzima <i>HindIII</i> (Invitrogen) [®]	0,5 µL
Água milli Q*	7 µL
Total da reação	20 µL

*Componentes para digestão da Invitrogen[®]

A reação de digestão foi preparada em um tubo de 1,5 mL de capacidade em banho de gelo e incubada por duas horas a 37 °C. Ao término do processo, todo o volume da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma[®]) com o tampão TAE 1X, como marcador de peso molecular utilizou-se o 1 Kb DNA ladder plus (Promega[®]). Após

a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador por luz ultravioleta.

Confirmada a clonagem, uma colônia clone foi escolhida para refazer os processos de mini-prep (utilizando-se o Kit Invitrogen[®]) com recuperação do DNA para seguir os trabalhos de subclonagem e sequenciamento do clone. Uma alíquota de 20 µL da nova minipreparação foi armazenada a -20 °C para sequenciamento. O restante foi digerido, conforme exposto na Tabela 7, com as enzimas *EcoRI* e *Hind III* (presentes apenas nos olinucleotídeos desenhados).

Tabela 7 Protocolo de digestão enzimática da Mini-prep Invitrogen[®]

Componente da reação	Volume
Alíquota da Mini Prep	100 µL
Tampão Buffer 10x M*	15 µL
Enzima <i>EcoRI</i> (Invitrogen) [®]	2 µL
Enzima <i>HindIII</i> (Invitrogen) [®]	2 µL
Água milli Q*	31 µL
Total da reação	150 µL

*Componentes para digestão da Invitrogen[®]

A reação de digestão foi preparada em um tubo de 1,5 mL de capacidade em banho de gelo e incubada por duas horas a 37 °C.

Nova eletroforese preparativa foi realizada. Desta vez, em quantidades maiores para obter boa recuperação do fragmento amplificado pelo clone. Aplicou-se toda a reação de digestão em gel de agarose 1% com tampão TAE 1X e seguiu-se a recuperação do fragmento de *xynB3* por eletroeluição.

4.13 Purificação do DNA através do método de eletroeluição e precipitação

Recortou-se a banda correspondente ao gene *xynB3* (1,6kb) do gel de agarose com o auxílio de um estilete apropriado e acomodou-se o fragmento de gel dentro de um saco de diálise. Foram adicionados 600 µL de tampão TAE 0,5 X e as extremidades da membrana de diálise foram fechadas com prendedores apropriados para este fim. O saco de diálise foi acomodado no centro da cuba de eletroeluição, que também foi preenchida com tampão TAE 0,5 X e um potencial de 100 Volts foi aplicado ao sistema de eletroforese durante duas horas. Ao final do processo, descartou-se o gel e aspirou-se o líquido interno da membrana de diálise que continha o DNA eletroeluído. Esse material foi acondicionado em um tubo de microcentrífuga e foi precipitado como descrito a seguir.

Para limpar a amostra, foram adicionados aos 500 µL recuperados, 250 µL de fenol equilibrado em pH 8 e 250 µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção

24:1). Foi homogeneizado em vórtex, centrifugado a 12.000 x g por três minutos em TA e, novamente, o sobrenadante foi recuperado em novo tubo de microcentrífuga. Foi adicionado então 1 µL de RNA transportador (tRNA) ao volume recuperado, para auxiliar o carregamento do DNA para o fundo do frasco. Adicionou-se 0,1 X o volume recuperado de acetato de sódio (NaOAc - na concentração de 3M e pH 5,3) e também 2,5 X de etanol ultrapuro gelado (EtOH - grau Biologia Molecular). O DNA ficou em processo de precipitação por duas horas a - 80 °C.

Após a precipitação, centrifugou-se o tubo contendo EtOH e o DNA a 12.000 x g, 15 minutos a 4 °C; O EtOH foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado. Foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições do passo anterior, o sobrenadante contendo etanol 70% foi aspirado em trompa a vácuo e o tubo contendo o DNA foi seco a 37 °C durante duas horas. A ressuspensão do DNA foi feita com 60 µL de TE/RNase. Uma alíquota de 10 µL foi aplicada em gel de agarose para verificar a eficiência da recuperação. O microtubo com o restante do material foi etiquetado com a devida identificação e armazenado a -20 °C para os procedimentos de subclonagem.

4.14 Sequenciamento do gene *xynB3*

O DNA foi submetido ao sequenciamento por PCR para confirmar a identidade do gene *xynB3*. A realização das seqüências foi feita com o kit de sequenciamento de DNA *Big Dye terminator version 3.1 (Life-Technologies-Applied Biosystems®)*. O DNA foi diluído em concentração de 150 ng e acondicionado em um microtubo de PCR juntamente com 3 µL de primer (3,2 pmoles/ µL) e 3 µL do Tampão de sequenciamento 5 X concentrado do próprio kit *Big Dye version 3.1*. Após as adições, completou-se o volume para 15 µL final com água ultrapura estéril e aplicou-se um pulso de 10.000 x g na amostra. O tubo foi colocado em termociclador com programação de 96 °C por dois minutos, 50 °C por 30 segundos, 60 °C por quatro minutos, total de 35 ciclos.

Passado esse procedimento, foi realizada a precipitação da reação de sequenciamento com glicogênio pela adição de 25 µL do coquetel de precipitação (NaOAc 3M pH 5,2; glicogênio 1 mg/mL; EtOH ultrapuro). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas em banho de gelo por 15 minutos. O tubo contendo as amostras foi centrifugado a 4.000 x g por 20 minutos sob TA. O coquetel de precipitação foi descartado e então 50 µL de etanol 70%, gelado, foram adicionados ao tubo. Na seqüência, houve outra centrifugação a 4.000 x g por dez minutos e descarte do etanol 70%. O tubo contendo o DNA foi seco em estufa a 37 °C por uma hora, selado com papel alumínio, rotulado e encaminhado para leitura do material no serviço de sequenciamento no Instituto de Química da USP/SP, coordenado pela Prof^a Dr^a Suely Lopes Gomes.

4.15 Subclonagem do gene *xynB3*

Para a subclonagem do gene *xynB3*, foi preciso digerir o vetor de expressão pTrcHis A (Invitrogen®) com as mesmas enzimas do inserto (*EcoRI* e *HindIII*). Os demais procedimentos foram semelhantes aos realizados para a clonagem. Foi necessário o preparo de células competentes (dessa vez da cepa *E. coli* TOP10). Em seguida, foi feita a ligação do fragmento do gene de interesse (*xynB3 EcoRI/HindIII*) com o vetor de expressão (pTrcHis A *EcoRI/HindIII*) e transformação das células pelo método de choque térmico.

A confirmação da transformação também ocorreu por meio do pré-inóculo da colônia transformante, minipreparação plasmidial, digestão com as enzimas *EcoRI/HindIII* e gel de agarose para visualizar o clone *xynB3+pTrcHisA* digerido. Todos os protocolos já foram descritos anteriormente.

4.15.1 Preparo do vetor de expressão

Neste trabalho, foi utilizado o vetor pTrcHis A (Invitrogen®), pois o mesmo permite a construção de uma fusão de tradução com uma cauda de Histidinas na porção N-terminal da proteína alvo para posterior purificação. As células TOP10 crescem na presença do indutor sintético Isopropil-β-D-Galactopiranosídeo (IPTG) e a seleção dos subclones é feita pela adição do antibiótico ampicilina ao meio de cultivo na concentração de 50 a 100 µg/mL (neste trabalho, foi utilizada a concentração máxima de antibiótico). Para transformação em pTrcHis, as células *E. coli* TOP10 são consideradas as mais adequadas, segundo manual do fabricante. O esquema geral do vetor está apresentado na Figura 6.

O vetor de expressão pTrcHis A foi linearizado por digestão dupla no sítio múltiplo de clonagem. O protocolo utilizado neste trabalho para digestão plasmidial com volume final de 100 µL segue na tabela detalhada a seguir.

Tabela 8 Protocolo de digestão do pTrcHis A

Componente da reação	Volume
Vetor de expressão intacto (pTrcHis A)	10 µL
Tampão Buffer 10x M *	10 µL
Enzima <i>EcoRI</i> (Invitrogen®)	2 µL
Enzima <i>HindIII</i> (Invitrogen®)	2 µL
Água ultrapura	76µL
Total da reação	100 µL

*Componentes do para digestão da (Invitrogen®)

A reação de digestão foi preparada em um microtubo de 1,5 mL, em banho de gelo e incubada por duas horas a 37 °C. Após a digestão, o DNA plasmidial foi precipitado. A

precipitação foi realizada com a adição de 300 μL de TE (tris HCl pH 8,0 10mM., EDTA 1 mM., q.s.p. água ultrapura estéril) para um volume de 100 μL , totalizando 400 μL juntamente com 10% do volume de NaOAC (3 M, pH: 5,4) e duas vezes o volume de solução final com etanol absoluto, armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante duas horas. Após esse período, foi preciso centrifugar o precipitado a 12.000 x g por 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, com descarte do sobrenadante, lavar com etanol 70%, seguido de nova centrifugação (12.000 x g por cinco minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) com posterior descarte do sobrenadante e secagem a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa. O DNA precipitado foi ressuspensão em 50 μL de TE/RNase e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o procedimento de ligação.

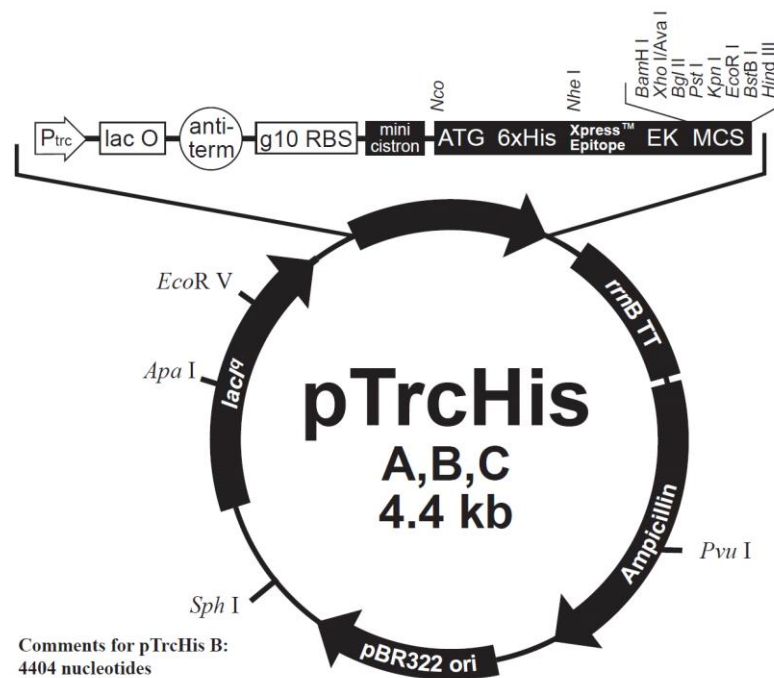


Figura 6 - Mapa do vetor de expressão pTrcHis A (Invitrogen®). Como pode ser visualizado no mapa plasmidial acima, esse apresenta um cassete de resistência ao antibiótico ampicilina, promotor induzível por IPTG e origem de replicação derivada do pRB322 e pode ser replicado em inúmeras cópias em *E. coli* TOP10. A clonagem nesse vetor possibilita a construção de uma proteína de fusão com uma cauda contendo seis histidinas a 5' do múltiplo sítio de clonagem sendo expressa, portanto, na extremidade amino terminal da proteína recombinante superexpressa. Os sítios de restrição usados para clonagem do gene *xynB3* foram: *EcoRI* e *HindIII* e a proteína de fusão superexpressa poderá ser purificada, em estudos posteriores, usando-se coluna de níquel-sepharose pré-empacotadas (*Life Technologies*®).

4.15.2 Ligação de *xynB3* em vetor de expressão e transformação por choque térmico

A quantificação do plasmídeo (pTrcHis A *EcoRI/HindIII*) e do gene (*xynB3* *EcoRI/HindIII*) foi realizada para a ligação de *xynB3*, conforme o método citado anteriormente e foi utilizada uma proporção de três partes de fragmento (150 ηg) para uma parte de vetor (50 ηg). A reação foi incubada durante 12 horas a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Segue na tabela a seguir o protocolo de ligação utilizado.

Tabela 9 Protocolo de ligação de *xynB3* com pTrcHis A

Componentes	Volume
Vetor: pTrcHisA	1 µL
Inserto: <i>xynB3</i>	0,7 µL
Ligase 10X Buffer (Promega [®])	2µL
T4 DNA Ligase (Promega [®])	0,5 µL
Água ultrapura	16 µL
Total da reação	20,2 µL

A reação de ligação foi utilizada para a transformação da bactéria *E. coli* da linhagem TOP10, quimicamente competente também por choque térmico.

Depois de confirmada a subclonagem, a cepa transformada de *E. coli* TOP10 que conteve a construção *xynB3*+pTrcHis A, foi submetida ao processo piloto de indução. A codificação desta proteína resulta em uma enzima com provável atividade de β - xilosidase.

4.16 Ensaios de indução de expressão da proteína heteróloga

Um ensaio piloto de indução da expressão proteica foi realizado a fim de avaliar a expressão da enzima. Para tal procedimento, um pré-inóculo do recombinante foi incubado em 1,5 mL do meio líquido LBA durante 12 horas a 37 °C sob agitação orbital de 120 rpm. No dia seguinte, 150 µL do pré-inóculo foram inoculados em Erlenmeyer estéril de 125 mL contendo 15 mL de meio líquido LBA e incubado a 37 °C sob agitação de 120 rpm por duas horas e meia (até o inóculo atingir a D.O._{600nm} = 0,4 medida em espectrofotômetro). Retirou-se então 1 mL da cultura para controle de expressão negativo, chamado tempo zero (t0) e adicionou-se ao Erlenmeyer com a cultura celular um indutor sintético de transcrição não metabolizável (IPTG) a uma concentração final de 1 mM. As bactérias ficaram sob tais condições por três horas e a cada intervalo de uma hora foram recolhidas alíquotas de 1 mL da cultura bacteriana induzida.

A alíquota controle (t0) e as amostras que foram retiradas a cada intervalo de uma hora (t1, t2 e t3) foram centrifugadas a 12.000 x g por três minutos em TA. Descartou-se o sobrenadante e a cada alíquota foram adicionados 200 µL da solução O (tampão de amostra contendo para 10 mL: 0,076 g de Tris-base, 4 mL de SDS 10%, 10 mL (1 M) de DDT, 2 mL de glicerol, 100 µL de azul de bromofenol 1%, e o restante do volume com água destilada). Por fim, as amostras foram aquecidas a 95 °C por cinco minutos e congeladas para procedimentos posteriores.

Ao término do processo de indução, as alíquotas foram descongeladas, fervidas e centrifugadas a 12.000 x g por três minutos em TA. De cada amostra, 20 µL de solução do sobrenadante foram retirados e aplicados em gel de poliacrilamida em condições

desnaturantes (SDS-PAGE). Foi realizado um ensaio paralelo com uma cepa de *E. coli* TOP10 contendo o plasmídeo pTrcHis A sem o gene *xynB3* e também aplicado em gel para controle negativo de expressão de *xynB3*.

Outros testes de indução da expressão variaram D.O. λ_{600nm} (0,4; 0,5 e 0,6), temperatura (35, 36 e 37 °C), meios de cultura (LB e 2XTY – o meio 2XTY é composto por: triptona 1,6%; extrato de Levedura 1%; NaCl 0,5% e água ultrapura estéril q.s.p. 1.000mL), tempo de indução (2, 4, 5 e 12 horas), concentração de indutor (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1mM) e diferentes velocidades de agitação (80, 120 e 180 rpm) a fim de que se avaliassem as melhores condições para expressão da enzima β -xilosidase III. A partir dos resultados obtidos com esses testes, foi possível a padronização dos ensaios de expressão para purificação dessa proteína.

4.17 Purificação da proteína recombinante

As tentativas de purificação da proteína contendo calda de histidinas (carga positiva) foram realizadas com o His Spin Trap Kit (GE healthcare[®]), um sistema de cromatografia de afinidade ao metal imobilizado que contém colunas pré-empacotadas com resina móvel de níquel sepharose em volume de 1,5 mL. Antes do uso as colunas foram previamente equilibradas com 600 μ L de tampão de ligação (tampão fosfato 20 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 20 mM; pH 7.4). Foram utilizadas duas colunas por ensaio.

4.17.1 Purificação em condições nativas

Para este procedimento, depois de definidos o tempo de incubação e a temperatura ideal para a superexpressão da enzima durante os ensaios de indução da expressão, foi então realizada uma nova indução nas condições padronizadas como as mais adequadas (Indução a D.O. λ_{600nm} = 0,5 com 0,6 mM de IPTG a 37 °C, 120 rpm por 3 horas). A cultura induzida foi centrifugada a 12.000 x g, 4 °C por dez minutos com descarte do sobrenadante e ao precipitado celular foi adicionada a solução de lise para liberação da proteína intracelular de interesse.

A lise celular foi realizada com 4 mL de *Fast Break Cell Lysis* (Promega[®]), conforme protocolo do fabricante, sendo que para cada 1 mL de solução foram adicionados: 879 μ L de meio de cultura LB líquido, 100 μ L de *Fast Break Cell Lysis*, 10 μ L de lisozima (20 mg/mL Sigma[®]), 1 μ L de DNase (20 μ g/mL Invitrogen[®]) e 10 μ L de inibidor de protease (1 mM GE healthcare[®]).

Após o precipitado celular ter sido ressuspenso com a solução de lise, o tubo foi incubado por 30 minutos à temperatura de 25 °C com agitação orbital de 80 rpm. As células

lisadas foram centrifugadas e o sobrenadante foi tratado com as colunas pré-empacotadas His Spin Trap conforme protocolo a seguir.

Para cada 1 mL do sobrenadante, foi utilizada uma coluna que foi aberta e acomodada em um frasco de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 500 μ L do sobrenadante ao centro da coluna, seguido de uma centrifugação de 1.600 x g por um minuto a 4 °C. O eluato foi descartado e foi realizada nova centrifugação (1.600 x g por 1 minuto a 4 °C) com mais 500 μ L do sobrenadante. Descartou-se o eluato e as colunas foram lavadas duas vezes pela adição de 600 μ L de tampão de ligação (tampão fosfato 20 mM, Imidazol 20 mM pH 7,4 e NaCl 500 mM). Cada lavagem foi seguida de centrifugação (1.600 x g por 1 minuto a 4 °C) e depois foi feito descarte do eluato. Durante essa etapa, a proteína de fusão contendo a cauda de histidinas fica presa à resina enquanto as demais proteínas celulares de *E. coli* passam pela coluna e saem junto com o eluato.

A coluna foi acomodada em novo tubo de microcentrífuga e lavada com 1 mL de tampão de eluição (tampão fosfato 20 mM, Imidazol 500 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM), seguido de centrifugação (1.600 x g por 1 minuto a 4 °C). Nesse momento, a proteína recombinante se desliga da resina da coluna e fica no eluato que é recolhido. Em todas as fases do protocolo de purificação foram coletadas amostras para aplicar em gel SDS-PAGE 9%.

4.17.2 Purificação da proteína em corpos de inclusão

Foi realizada uma nova indução nas condições determinadas (Indução à D.O. $\lambda_{600nm} = 0,5$ com 0,6 mM de IPTG a 37 °C, 120 rpm por três horas conforme protocolo já descrito). A cultura de 50 mL induzida foi centrifugada a 12.000 x g, 4 °C por 10 minutos com descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspense em 2 mL de tampão de sonicação (Tris 20 mM, pH 8 + 20 μ L do coquetel Inibidor de protease da promega[®]) e as bactérias foram sonicadas (40 Hertz em gelo por seis vezes de 25 segundos, com intervalos de 20 segundos) e centrifugadas 11000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspense em 1 mL do reagente *Fast Break Cell Lysis* (Promega[®]) e sonicado por cinco vezes de 30 segundos com intervalos de 20 segundos, seguido de centrifugação a 11000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os passos de ressuspensão, sonicação e centrifugação foram repetidos por quatro vezes.

O precipitado foi então ressuspense com tampão contendo Tris 20 mM + NaCl 200 mM e sonicado por três vezes de 20 segundos com intervalos de 20 segundos. O líquido foi centrifugado 11000 x g, 4 °C por dez minutos e o precipitado ressuspense em 4 mL do tampão de ligação (Tris 20mM, NaCl 100mM, uréia 8M e Imidazol 20 mM), sonicado uma vez por 20 segundos e incubado por 12 horas em agitação orbital de 80 rpm a 22 °C.

No dia seguinte, a amostra passou por purificação com colunas de cromatografia de afinidade com o níquel *His Spin Trap Kit (GE healthcare®)*, conforme protocolo do fabricante para purificação em condições desnaturantes. Todos os passos da purificação foram coletados para eletroforese em SDS-PAGE 9%. O eluato dos passos de eluição da proteína purificada passou por re-enovelamento com tampão fixo contendo Tris 20 mM, NaCl 100 mM, 40 µL do coquetel Inibidor de protease (Promega®) e gradientes decrescentes de 6, 5, 4, 2, 1, 0,5 e 0 molar de ureia trocados a cada 12 horas.

4.18 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de proteínas em gel de poliacrilamida foi utilizada para verificar a expressão do ensaio piloto de indução e para checar a eficácia da purificação. O protocolo para SDS-PAGE, descrito abaixo, está de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970).

Para um gel de poliacrilamida 9%, foi necessário o preparo de duas soluções, uma denominada “*Running Gel*” ou Gel de corrida (2,5 mL de solução L (Tris base 36,20 g – 200 mL pH 8,8); 3,0 mL de solução N (Acrilamida 30%); 70 µL de PA (Persulfato de Amônia 20%); 7 µL TEMED e 4,5 mL de água destilada completando 10 mL) e outra chamada “*Stacking Gel*” ou Gel de empilhamento (1,25 mL solução M (Tris – Base 12,0 g – 200 mL pH 6,8), 0,75 mL solução de N, 30 µL de persulfato de amônio 10 %, 7 µL TEMED e 3 mL de água deionizada completando 5 mL).

A solução para montar o “*Running gel*” foi vertida em suporte adequado para polimerização do gel, após cerca de 30 minutos. Assim, a solução para *Stacking* foi adicionada juntamente com o pente do sistema para polimerização dos poços e, quando todo o gel ficou polimerizado, as amostras das proteínas foram aplicadas cada uma em seu respectivo poço e submetidas a uma corrida eletroforética vertical pelo sistema BIO-RAD, modelo Mini-PROTEIN®. O sistema foi preenchido com tampão de corrida 1X (Tris-Base 0,30%, Glicina 1,44%, SDS 0,1%) e a ele foi aplicado um campo elétrico de 100 volts por cerca de 120 minutos. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o 10 KDa Protein ladder (Gibco-BRL®).

Ao término da corrida, o gel foi corado com solução “*stain*” (etanol absoluto 50%, ácido acético 7% e Coomassie Blue R 250 0,4%) durante 40 minutos em estufa a 40 °C e descorado com a solução “*destain*” (etanol comercial 30%, ácido acético 7% e água 63%) em leve agitação e com lavagens subsequentes durante aproximadamente uma hora. Após esse período, o gel pôde ser visualizado em luz ambiente.

4.19 Avaliação da atividade da β -xilosidase III

Uma alíquota do tempo de indução de três horas (t_3), onde foi observada a presença da enzima, foi submetida ao ensaio padrão de determinação de atividade de β -xilosidase de acordo com o método proposto por Miller (1959), que consiste na incubação de 250 μ L de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) na concentração de 1 mg/mL (solubilizado em tampão citrato de sódio 50mM pH 5.4) e 50 μ L da proteína purificada. A reação foi realizada em um tubo de microcentrífuga e incubada por 60 minutos a 50 °C. Para interromper a reação, foi adicionado 1 mL de solução de tetraborato de sódio saturado.

Nesta técnica, a atividade de β -xilosidase é determinada pela coloração amarelada no frasco, representando a quantidade de p-nitrofenol (pNP) que é liberado, em função da reação entre a enzima e o substrato. Assim, a quantidade de enzima é determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm utilizando-se como branco 50 μ L de água deionizada com 250 μ L de substrato e 1mL de tetraborato de sódio saturado. A D.O. da amostra foi aplicada na fórmula da curva padrão feita com paranitrofenol para a determinação da concentração exata da enzima na amostra e o valor foi convertido em unidades enzimáticas. Entende-se, nesse contexto, como uma unidade enzimática aquela capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por mililitro por minuto de reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação do gene *xynB3*

O gene de interesse foi amplificado por PCR usando oligonucleotídeos específicos para o gene *xynB3* e 4 μ L da reação foram aplicados em gel de agarose TAE 1% (Figura 7). Nota-se claramente, ao observar o gel (Figura 7), a presença de uma banda na altura de 1,6 kb esperada para *xynB3*, o que indica que o gene foi amplificado com sucesso. Uma alíquota de 1 μ L do produto do PCR foi utilizada para ligar ao vetor de clonagem pJET1.2 *blunt* e o restante foi armazenado a -20 °C.

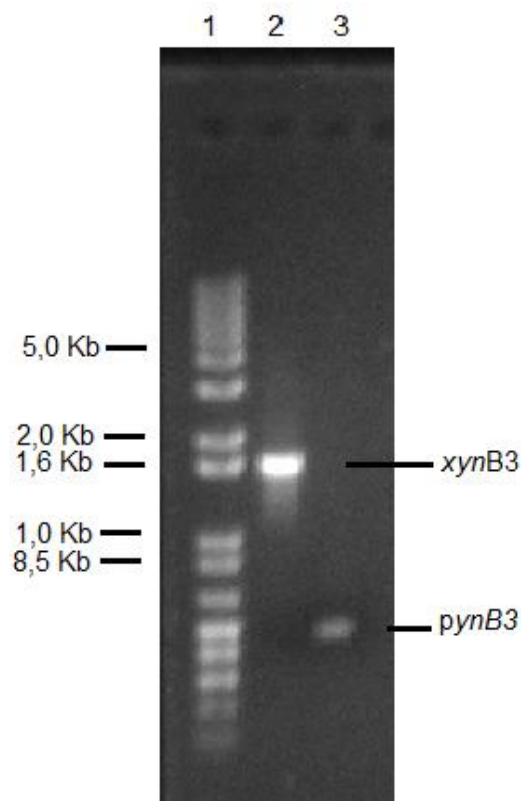


Figura 7 Visualização do produto de PCR em gel de agarose 1% TAE 1X. Na canaleta (1) Marcador 1Kb DNA Ladder Plus – Promega®, (2) Fragmento do gene *xynB3* amplificado por PCR, (3) Fragmento do promotor do gene *xynB3*.

5.2 Resultados do sequenciamento do gene amplificado

A sequência do gene clonado foi analisada através da ferramenta de bioinformática blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A sequência clonada mostrou confirmação de identidade para uma β -xilosidase do grupo GH43, pois apresentou 99% de identidade com uma β -xilosidase de *C. crescentus* cepa CB15 e 92% de identidade com a β -xilosidase de *C.*

henricii. A análise da sequência mostrou que há pelo menos dois domínios conservados para GH43 (Figura 8). Isso indica fortemente que o produto do gene clonado seja de fato uma proteína do tipo β -xilosidase.

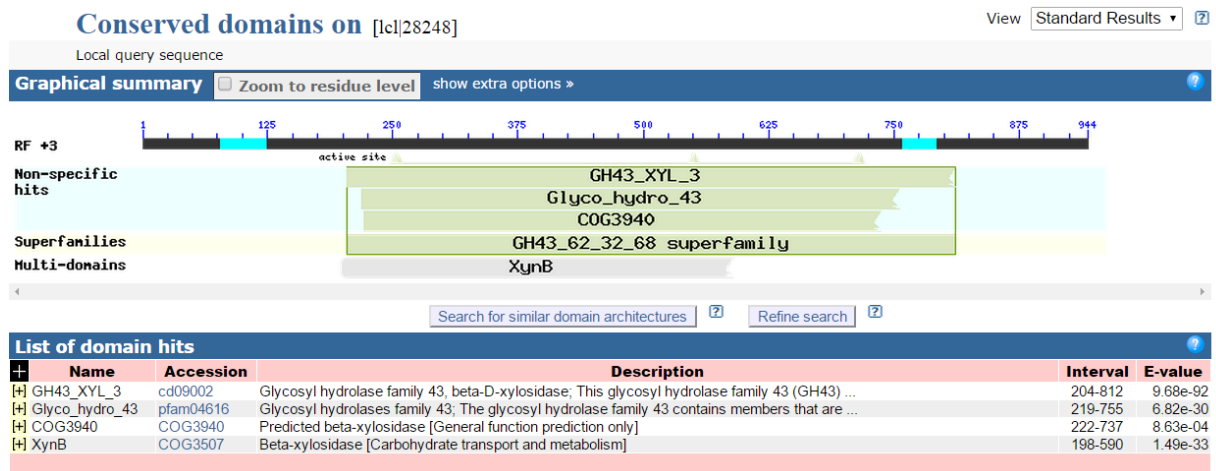


Figura 8 Janela de análise de domínios conservados da sequência de *xynB3* clonado. Criada pela ferramenta *Conserved domains*, a ferramenta é de acesso aberto e está disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

5.3 Confirmação da clonagem de *xynB3* em pJET1.2 *blunt*

Neste trabalho, a reação de ligação seguiu o protocolo do fabricante do kit de clonagem, conforme já descrito anteriormente. O vetor de clonagem contendo o gene *xynB3* foi introduzido pelo método de transformação por choque-térmico, em cepas de *E. coli* DH5 α quimicamente competentes para receber DNA exógeno. Para plaquear a reação de transformação, foram utilizadas três placas de Petri. Nelas foram aplicadas diferentes concentrações de células transformantes (50, 100 e 150 μ L da transformação). Em todas as placas houve crescimento de colônias pequenas, transparentes e bem delimitadas. Conforme o esperado, não houve crescimento celular na placa controle de células competentes.

Foram escolhidas doze colônias transformantes para minipreparação plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Todas as doze reações foram digeridas com as enzimas *EcoRI/HindIII* e aplicadas em gel de agarose 1% TAE 1X para checar a clonagem (Figura 9). A análise em gel de agarose dos produtos de digestão mostrou duas bandas em cada poço de aplicação: uma com o tamanho esperado de 1,6 kb correspondente ao gene *xynB3*, e a outra de 2,9 kb, correspondente ao plasmídeo pJET 1.2 *blunt*, confirmando assim a clonagem.

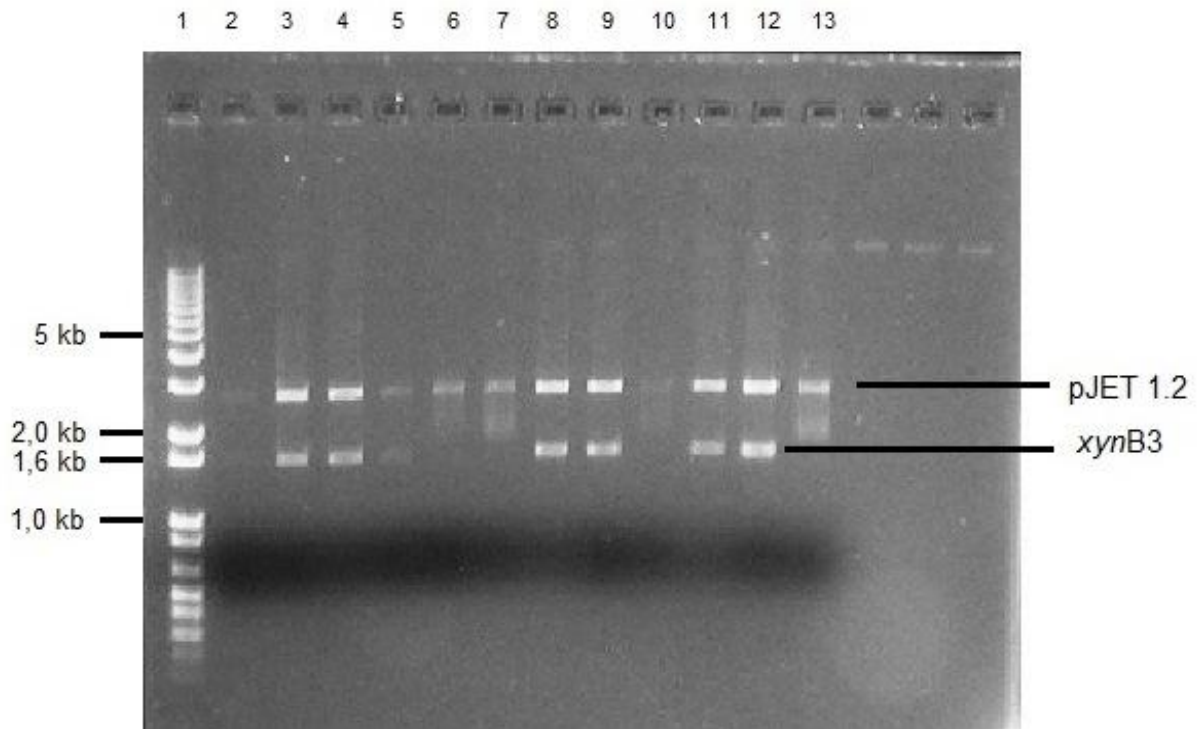


Figura 9 Confirmação da clonagem do gene *xynB3* no vetor pJET1.2 *blunt* em gel de agarose 1% TAE 1X. Na canaleta (1) Marcador 1Kb DNA Ladder Plus – Promega®, as canaletas 3, 4, 8, 9, 11 e 12 correspondem a colônias clones confirmadas. Os produtos correspondentes às alíquotas, aplicados nas demais canaletas, foram descartados porque não eram adequados.

5.4 Recuperação do fragmento clonado por eletroeluição

Neste trabalho, foi escolhida a colônia de número (3) do gel mostrado na figura 9 para seguir os procedimentos de subclonagem em vetor de expressão. Para isso, foi realizada nova minipreparação plasmidial com o kit da Invitrogen®, seguido de digestão com as enzimas *EcoRI/HindIII*. O DNA plasmidial proveniente da mini-prep foi aplicado em gel de agarose 1% TAE 1X e o fragmento de *xynB3 EcoRI/HindIII* foi recuperado por eletroeluição conforme mostrado na figura 10.

5.5 Confirmação da subclonagem

O fragmento do gene *xynB3 EcoRI/HindIII* eletroeluído e recuperado no passo anterior foi ligado ao vetor de expressão pTrcHisA (que também foi digerido com as enzimas *EcoRI/HindIII*). A ligação foi introduzida em cepas de *E. coli* TOP10 quimicamente competentes através do método de transformação por choque térmico.

Após a incubação da reação de transformação em placas de Petri, nenhuma colônia cresceu na placa controle de células competentes e uma única colônia foi observada na placa dos transformantes. Foram realizados os procedimentos de minipreparação plasmidial e digestão do DNA com as enzimas de restrição *EcoRI/HindIII*. A presença do inserto foi então confirmada em gel de agarose 1% TAE 1X, conforme mostra a figura 11.

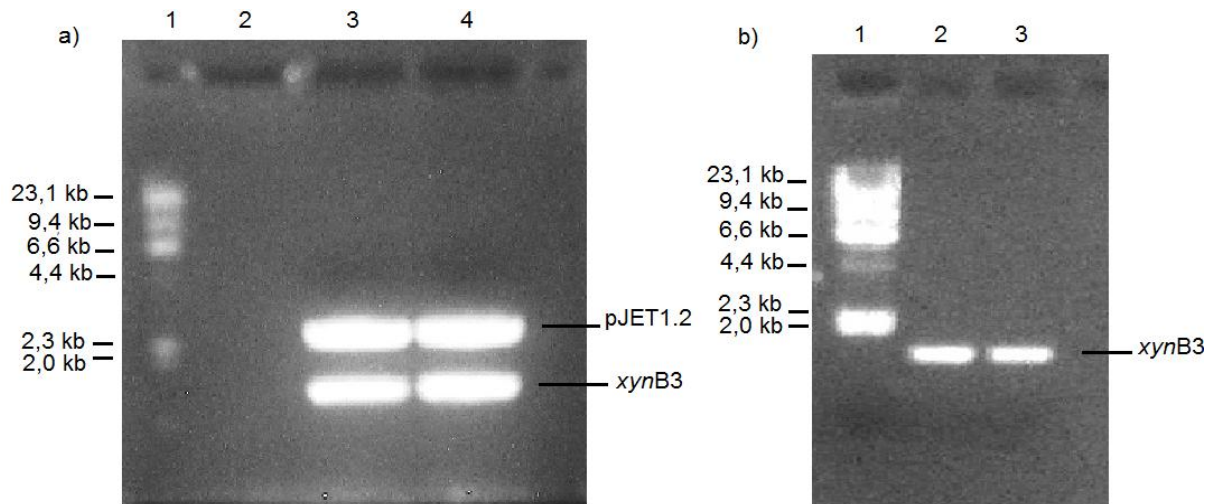


Figura 10 Recuperação por eletroeluição. Em: a) Gel de agarose 1% TAE 1 X mostrando a preparação plasmidial para eletroeluição. Na canaleta (1) observa-se o marcador de peso molecular λ HindIII, nas canaletas 3 e 4 o DNA plasmidial de *xynB3*+pJET1.2 clone digerido com *EcoRI* e *HindIII*. A banda de 2,9 kb corresponde ao plasmídeo pJET 1.2, enquanto a banda de 1,6 kb corresponde ao gene *xynB3* clonado. Em: b) (1) marcador, (2) e (3) uma alíquota de 5 μ L do gene *xynB3*, recuperado para visualizar a eficiência da recuperação.

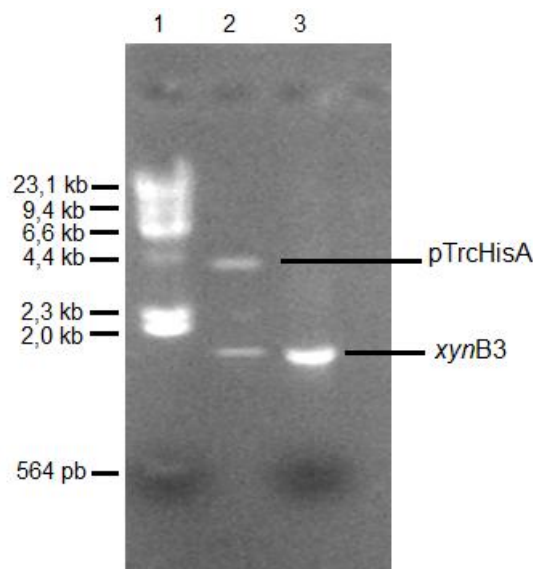


Figura 11 Confirmação da clonagem de *xynB3*+pTrcHis A em gel de agarose. Na canaleta (1), o marcador λ HindIII; na canaleta (2), o transformante *xynB3*+pTrcHisA e (3) Fragmento de PCR do gene *xynB3* para controle. A banda de 4,4 Kb corresponde ao plasmídeo pTrcHisA, enquanto a de 1,6 Kb corresponde ao gene *xynB3*.

5.6 Ensaio de expressão

A colônia transformante *xynB3+pTrcHisA* foi usada para ensaios de indução da expressão da β -xilosidase III. Durante os testes a 37 °C, pôde-se observar que períodos mais longos de indução (acima de 3 horas) não aumentavam significativamente a expressão da proteína recombinante (de 65 KDa). Todavia, a expressão alcançada no tempo de cinco horas era similar àquela alcançada com apenas três horas de indução. Também nessa temperatura, a concentração final de IPTG de 0,2 e 0,4 mM mostrou-se insuficiente para promover boa expressão, porém, as concentrações acima de 0,6 mM não promoviam maior expressão da proteína de interesse.

Em relação ao meio de cultura, a expressão observada, ao utilizar o meio 2XTY a 37°C com 1mM de IPTG, mostrou resultados semelhantes àquela observada com o meio LB nas mesmas condições. Padronizou-se então como meio de cultura ideal o LB. Os ensaios de indução em D.O. $\lambda_{600nm} = 0,4$ (com IPTG 1mM, 37 °C, 3 horas) mostraram expressão mais baixa do que aqueles realizados com o inóculo em D.O. $\lambda_{600nm} = 0,5$ e 0,6. A β -xilosidase III não foi expressa com agitação de 80 rpm, mas houve boa expressão nas velocidades de 120 e 180 rpm. Nas temperaturas de 35 e 36 °C, não houve indução da expressão da proteína recombinante.

Assim, o início da indução ocorreu com a adição do indutor IPTG na concentração final de 0,6 mM quando o inóculo encontrava-se em D.O. $\lambda_{600nm} = 0,5$ medida em espectrofotômetro. O ensaio ocorreu sob condições de temperatura de 37 °C, 120 rpm, durante três horas. Pode-se observar no gel SDS-PAGE 9% que foi possível visualizar a presença de uma banda na região entre 50 e 75 KDa com peso aproximado de 65 KDa, tamanho já esperado para a β -xilosidase III . O gel obtido nas condições padronizadas para a indução da β -xilosidase III é mostrado na Figura 12.

5.7 Purificação da proteína recombinante

Foram utilizadas duas colunas (a e b) de cromatografia de afinidade com o níquel da GE Healthcare® para a primeira tentativa de purificação. O resultado é mostrado na Figura 13. Nota-se, ao observar o gel SDS-PAGE, que houve expressão de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 65 KDa após indução de três horas (t3) com IPTG sob condições já descritas anteriormente. A ausência dessa banda minutos antes do início da indução (t0) reforça o indício de que a mesma corresponde ao produto do gene clonado (β -xilosidase III).

O fato de a enzima não ter saído da coluna nas fases de eluição da proteína pura (P1a, P2a, P1b e P2b) indica que a mesma poderia estar insolúvel durante a fase de lise celular e, assim, sequer teria se ligado à coluna nos passos de purificação anteriores. Hipótese reforçada quando observa-se uma banda evidente na altura esperada da enzima β -xilosidase III na canaleta (D). E isso corresponde a uma alíquota dos debrís celulares (precipitado celular retirado após a lise enzimática com o coquetel *Fast Break Cell Lysis* - Promega®).

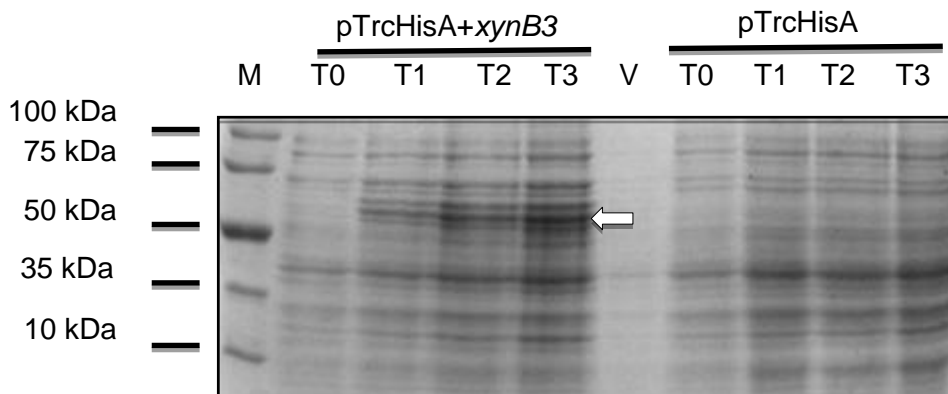


Figura 12 Gel SDS-PAGE 9%: Ensaio de expressão em condições padronizadas. Proteínas totais extraídas da cepa TOP10 de *E. coli* contendo o clone recombinante (pTrcHisA+xynB3) e o clone controle (pTrcHisA) após indução com IPTG. (M) Marcador de peso molecular 10 KDa Protein ladder (Life-Technologies®), os poços representados por T0 a T3 correspondem aos tempos 0 a 3 horas de indução com IPTG. A flecha branca indica a proteína recombinante β -xilosidase III de *C. crescentus* de aproximadamente 65 kDa (v) canaleta sem amostra contendo extravasamento do tempo T0 da cepa controle.

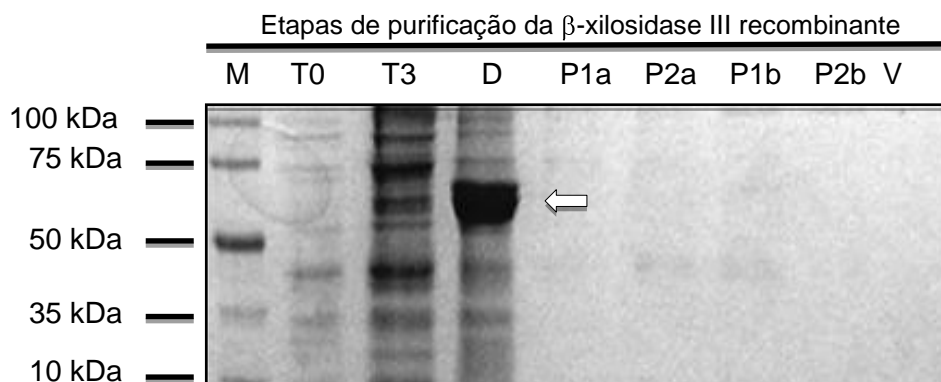


Figura 13 Gel SDS-PAGE 9%: Resultado da tentativa de purificação 1. Gel SDS-PAGE 9% contendo proteínas totais obtidas a partir das diferentes etapas de purificação da β -xilosidase III recombinante de *C. crescentus*. (M) marcador 10 KDa Protein ladder (Life-technologies). (T0-T3) Tempos 0 e 3 horas de indução com IPTG. (D) Debrís celulares após lise enzimática. (P1a, P2a, P1b e P2B) Alíquotas dos eluatos da coluna de níquel sepharose com tampão contendo imidazol. (V) canaleta sem amostra. A flecha branca destaca a proteína recombinante superexpressa no precipitado celular e sugere a formação de corpos de inclusão.

Na tentativa de purificar a proteína recombinante, outros protocolos foram testados, um deles incluía ciclos de sonicação em que foram realizados cinco pulsos de 20 segundos com intervalos de 20 segundos entre cada pulso, em substituição ao *Fast Breack cell lysis*[®] (promega[®]) do protocolo padrão. Utilizou-se ainda Triton X100 por trinta minutos após a sonicação, seguida de centrifugação e purificação conforme já descrito anteriormente. Em todos os passos do processo de purificação, foi retirada uma alíquota para aplicação em gel SDS-PAGE. O resultado está apresentado na Figura 14 abaixo.

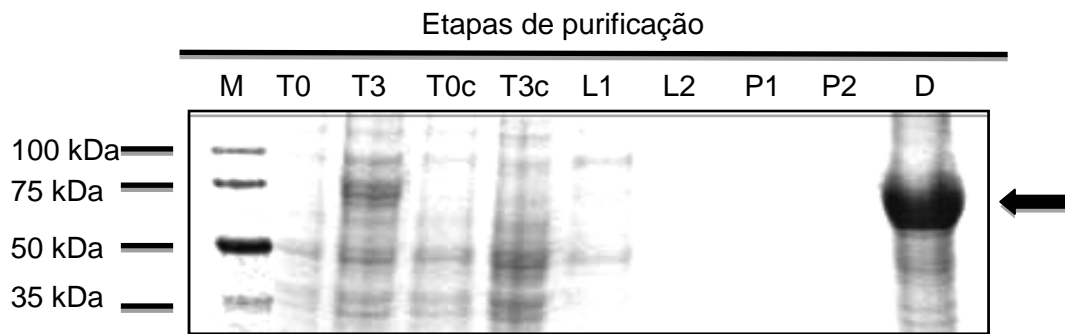


Figura 14 Gel SDS-PAGE 9%: Resultado da tentativa de purificação 2. Gel SDS-PAGE mostrando extrato total obtido durante as diferentes etapas de purificação com Triton X100. (M) Marcador de peso molecular 10 *KDa Protein ladder* (Life-Technologies). (T0 - T3) Tempos 0 e 3h de indução com IPTG da cepa recombinante. (T0c - T3c). Tempos 0 e 3h de indução com IPTG da cepa controle. (L1) Eluato após a primeira lavagem com tampão indicado em Material e Métodos, (L2) eluato da segunda lavagem com o tampão, (P1) eluato correspondente a primeira lavagem com o tampão de eluição, (P2) eluato do segundo passo de lavagem com tampão de eluição, (D) alíquota dos debrís celulares coletada após a lise com sonificador e Triton X100, sugerindo a expressão da proteína recombinante (indicada pela flecha preta) em corpos de inclusão.

Como se pode observar no gel SDS-PAGE (Figura 14), houve novamente superexpressão da enzima β -xilosidase III na forma insolúvel, pois a proteína continuou a ser encontrada em sua totalidade nos debrís celulares gerados após a lise celular. Assim, um protocolo de purificação de corpos de inclusão foi testado conforme metodologia já descrita. Entretanto, não foi obtido qualquer resultado positivo.

A solubilização de proteínas em corpos de inclusão pode ser alcançada com ajuda de agentes desnaturantes, os quais provocam desdobramento completo ou parcial da estrutura das proteínas. A renaturação pode ser alcançada por diminuição gradativa da concentração do desnaturante utilizado por troca de tampão, pelo emprego de diálise e cromatografia de gel filtração. Por consumir muito tempo e frequentemente produzir baixas quantidades da proteína ativa, esse processo não é tão simples de ser realizado, e por vezes, é preciso testar vários protocolos diferentes para chegar à purificação.

Diante das dificuldades encontradas no processo de purificação da β -xilosidase III, outras formas de solubilização de corpos de inclusão poderão ser utilizadas futuramente. Vans *at al.*, (2008) conseguiram superexpressar e purificar com eficiência a proteína recombinante humana Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) em *E. coli*, utilizando quantidades mais brandas do agente desnaturante ureia. Outro ponto importante diz respeito ao pH, pois quando aquela proteína foi purificada em pH alcalino, verificou-se maior solubilidade. Assim, alguns ajustes no protocolo de purificação de corpos de inclusão são necessários para um resultado positivo na purificação da β -xilosidase III.

5.8 Ensaio de dosagem de β -xilosidase

Os valores entre 0,3 e 0,8 unidades enzimáticas por mL encontrados nos ensaios realizados com o substrato pNPX, utilizando-se alíquotas de diferentes estágios da purificação, foram demasiadamente baixos. Nos ensaios de dosagem de β -xilosidase, é muito provável que a enzima não estava disponível ou até mesmo encontrava-se inativa em função da agregação em forma de corpos de inclusão. Substratos alternativos também foram utilizados, como o-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (oNPX), p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) e p-nitrofenil- α -L-arabinofuransídeo (pNPA). No entanto, não foi verificada qualquer atividade com substratos diferentes do pNPX.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi verificado que:

- O gene *xynB3* foi isolado;
- A clonagem de *xynB3* em vetor de clonagem foi possível;
- A subclonagem do gene em vetor de expressão foi realizada com sucesso;
- Foi possível a expressão heteróloga em *E.coli* TOP 10 do produto do gene *xynB3* de *C. crescentus*;
- A identidade do gene *xynB3* foi confirmada por sequenciamento de DNA;
- Embora tenha ocorrido a superexpressão da proteína, todas as tentativas de purificação executadas até o momento, em condições nativas ou desnaturantes, não levaram a sua purificação. Assim, os resultados sugerem a formação de uma proteína recombinante que pode ter um efeito tóxico para *E. coli*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão da proteína recombinante de forma insolúvel impôs limitações ao estudo da β -xilosidase III de *C. crescentus*. Entretanto, sabe-se que a superexpressão do produto de *xynB3* foi realizada e, com isso, experimentos futuros poderão ser feitos utilizando novas cepas hospedeiras, vetores de expressão, colunas de cromatografia ou outras técnicas que facilitem a solubilização e o estudo de tal proteína.

8 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D.M.; SILVA, J.H.V.; ARAÚJO, J.A.; TEIXEIRA, E.N.M.; JORDÃO, J.F.; RIBEIRO, M.L.G. Farelo de trigo na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de recria, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.1, 2008.
- BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes** – Industrial Applications of Xylanases, Elsevier, p.69-104, 2014.
- BERTOLO, A.L.F. Alteração da composição dos polissacarídeos da parede celular de *Nicotiana tabacum*, pela modulação da expressão do gene *uxs* que codifica uma enzima UDP-D-glucuronato descarboxilase (EC4.1.1.35). Tese (Doutorado em Agronomia), 142p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz **USP**, Piracicaba, 2007.
- BIELY, P. Microbial Xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, The United States of America, v.3, n.11, p.286-290, 1985.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, The United States of America, Duluth, v. 72, p.248-256, 1976.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, p. 365-380, 2010.
- CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v.115, p.215-221, 2012.
- CHATTERJEE, D.K.; BOURQUIN, P. Expression of degradative genes of *Pseudomonas putida* in *C. crescentus*. **Journal of Bacteriology**, The United States of America, v.169, n.7, p.2962- 2966, 1987.
- CHEN, W.P.; KUO, T.T. A Simple and Rapid Method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, The United States of America, v.21, n.9, p. 22-60, 1993.
- CORRÊA J.M. Análise da expressão da β -xilosidase II da bactéria aquática *Caulobacter crescentus* e seu papel no aproveitamento de resíduos agroindustriais, 55p. Dissertação (Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.
- CORRÊA, J.M.; GRACIANO, L.; ABRAHÃO, J.; LOTH, E.A.; GANDRA, R.F.; KADOWAKI, M.K.; HENN, C.; SIMÃO, R. de C. Expression and characterization of a GH39 β -xylosidase II from *Caulobacter crescentus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** The United States of America, v.168, n.8, p.2218-2229, 2012.
- CORRÊA, J.M.; MINGORI, M.R.; GANDRA, R.F.; LOTH, E.A.; SEIXAS, F.A.V.; SIMÃO, R. de C. Depletion of the *xynB2* Gene Upregulates β -Xylosidase Expression in *C. crescentus*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, The United States of America, v.172, n.2, p.1085-1097, 2014.
- CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, n.1, p.13-41, 2010.
- EVINGERN, M.; AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **The Journal of Bacteriology**, The United States of America, v.132, n.1, p. 294-301, 1977.

FARINAS, C.S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação, Embrapa Instrumentação, São Carlos-SP-Brasil, 2011. Disponível on line em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/919344/1/DOC542011.pdf>

FENGEL, D., WEGENER, G.; GRUYTER, W. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**, Alemanha, 613p, 1989. Disponível em: http://books.google.com.br/books/about/Wood.html?id=x1B4uITKnt0C&redir_esc=y, acessado em: 30/03/2014.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.73, n.2, p.627-50, 1927.

GRACIANO, L. Clonagem, expressão, Purificação e Caracterização da β -Xilosidase I de Bactéria Aquática *Caulobacter crescentus*. 2011. 69f. Dissertação (Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.

GRACIANO, L.; CORRÊA, J.M.; GANDRA, R.F.; SEIXAS, F.A.; KADOWAKI, M.K.; SAMPAIO, S.C.; SILVA, J.L.; OSAKU, C.A.; SIMÃO, R.DE C.G. The cloning, expression, purification, characterization and modeled structure of *Caulobacter crescentus* β -Xylosidase I, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.28, n.9, p.2879-2888, 2012.

HENRICI, A.T.; JOHNSON, D.E. Studies on freshwater bacteria. II. Stalked bacteria, a new order of schizomycetes, **J. Bacteriol.**, v.30, p.61-93, 1935.

HILLSON, N.J, HU, P., ANDERSEN, G.L & SHAPIRO, L. *Caulobacter crescentus* as a Whole-Cell Uranium Biosensor . **Appl. Environ. Microbiol.** The United States of America, v.73, n.23, p.7615-762, 2007.

HUY, N.D.; NGUYEN, C.; SEO, J.W.; KIM, D.H.; PARK, S.M. Putative endoglucanase PcGH5 from *Phanerochaete chrysosporium* is a β -xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase, **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Disponível em: doi:10.1016/j.jbiosc.2014.09.012. Acessado em: 25/01/2015.

JACKSON, S., NICOLSON, S. W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. Comp. Biochem. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B, Biochemistry & Molecular biology, v.131, n.4, p.613–620, 2002.

JAIN, I., KUMAR, V., SATYANARAYANA, T. Applicability of recombinant b-xylosidase from the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* in synthesizing alkylxylosides. **Bioresource Technology**. v. 170, p. 462-469, 2014.

JOHNSON, R.C.; ELY, B. Isolation of spontaneously derived mutants of *Caulobacter crescentus*. **Genetics**, Bethesda-MD, The United States of America, n. 86, 1977. 25-32 p.

JORDAN, B.D., WAGSCHAL, K ; GRIGORESCU, A.A; BRAKERD. J. Biotechnologically Relevant Enzymes And Proteins Highly active β -xylosidases of glycoside hydrolase family 43 operating on natural and artificial substrates. **Applied Microbiology And Biotechnology**. Set. 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/>> Acesso em 10 dezembro de 2013.

JUTURU, V.; WU, J.C. Heterologous expression of b-xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.29, p.249-255.

KADOWAKI, M.K.; PACHECO, M.A.C.; PERALTA, R.M.; Xylanase production by *Aspergillus* isolates grown on corn cob. **Rev.Microbiol.**, v.26, n.3, p.219–223, 1995.

KIRIKYALI, N.; CONNERTON, I.F. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa* β -xylosidase in *Pichia pastoris*, **Enzyme and Microbial Technology**, v.57, n.10, p.63-68, 2014.

KUMAR, S., RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a b-xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microb.Lett.**, Amsterdam, v.135, p.287-293, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, NY, n.227, p.680-685, 1970.

LAUB, M.T.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, A.H. Systems Biology of *Caulobacter*. **The Annual Review of Genetics**, The United States of America, v.41, n.1, p.429-441, 2007.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, **Journal of the American Chemical**, The United States of America, v.56, n.3, p.658-666, 1934.

MANNISTO, M.K.; TIROLA, M.A.; SALKINOJASALONEN, M.S.; KULOMAA, M.S.; PUHAKKA, J.A. Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater. **Arch. Microbiology**, v.171, n.3, p.189-197, 1999.

MARKS, M.E.; CASTRO-ROJAS, C.M.; TEILING, C.; DU, L. KAPATRAL, V.; WALUNAS, T.L.; CROSSON, S. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal Bacteriology**, The United States of America, n.192 v.14, p.3678-3688, 2010.

MATOS, G.S.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Formação de Xilitol, Etanol e Glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 Durante a Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t003.doc. Acessado em: 20/03/2014.

McADAMS, H.H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. **FEBS Letters**, n.583, p.3984-3991, 2009.

MIDDELBERG, A.P. Preparative protein refolding. **Trends Biotechnol.** v.20, n.10, p.437-443, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MITRAKI, A.; FANE, B.; HAASE-PETTINGELL, C.; STURTEVANT, J.; KING, J. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation **Science**, n.253, p.54-58, 1991.

NIERMAN W.C.; FELDBLYUM, T.V.; LAUB, M.T.; PAULSEN L.; NELSON, K.E.; EISEN, J. HEIDELBERG, M.R.K.; OHTA, N.; MADDOCKI, J.R.; POTOCKA, W.C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKEI, N.D.; ELY, B.; DEBOY, R.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GWINN, M. HAFT, D.H.; KOLONAY, J.F.; SMIT, J.; CRAVEN, M.B.; KHOURI, H.; SHETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.; ERMOLAEVA, O.W.; WHITE, O.; SALZBERGT, S.; VENTER,C.; SHAPIRO, L. FRASER, C. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. The United States of America, v. 98, n.7, p.4136-4141, 2001.

PATEL, J.; WILSON, G.; McKAY R.M.L.; VICENT, R.; XU, Z. Self-immobilization of recombinant *Caulobacter crescentus* and its application in removal of cadmium from water. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Nova York, n.162, p.1160-1173, 2010.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S., MONTI, R.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n.5, p.577-591, 2005.

POINDEXTER, J. A. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiology Reviews**, The United States of America, v.45, n.1, p.123-179, 1981.

RAVANAL, M.C.; ARCOS, M.A.; GONZALEZ-NILO, F.D.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces two GH family 43 enzymes with b-xylosidase activity, one monofunctional and the other bifunctional: Biochemical and structural analyses explain the difference. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.540, p.117-124, 2013.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H.V. Xylan biosynthesis, **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.100-107, abril de 2014.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 1989.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning**. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, v.3, 2001.

SHI, H.; LI, X.; GU, H.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; WANG, L.; WANG, F. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Thermotoga thermarum*, **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.27, 2013.

SINGH, S.M.; PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.4, p.303-310, 2005.

SUZUKI, S., FUKUOKA, M., OOKUCHI, H.; SANO, M.; OZEKI, K.; NAGAYOSHI, E.; TAKII, Y.; MATSUSHITA, M.; TADA, S.; KUSUMOTO, K.; KASHIWAGI, Y. Characterization of *Aspergillus oryzae* glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v.109, n.2, p. 115-117, 2010.

SWARTZ. J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins, **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.195-201, 2001

TAYLOR, G., HOARE, M., GRAY, D.R., MARSTON, F.A.O. Size and density of protein inclusion bodies. **Nature Biotechnology**. v.4, n.6, p. 553–557, 1986.

TENG, C.; JIA, H.; YAN, Q.; ZHOU, P., JIANG, Z.; High-level expression of extracellular secretion of a β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**. v.102, n.2, p.1822-1830, 2011.

WONGWISANSRI, S.; PROMDONKOY, P.; MATETAVIPAREE, P.; ROONGSAWANG, N.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. High-level production of thermotolerant β -xylosidase of *Aspergillus sp.* BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. **Bioresource Technology**, v.132, p.410-413, 2013.

YANG, X.; SHI, P.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; ZHANG, W.; YAO, B.; Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan, **Food Chemistry**, v.148, n.1, p.381-387, 2014.

VANS, A. L. S., RENARD, G., PALMA, M.S., CHIES, J.M., DALMORA, S.L., BASSO, L.A., SANTOS, D.S. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. **Microbiol Cell Factories**, v.7, n.13, 2008.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre, Artmed, 416p., 2014.

ZHANG, S.; WANG, H.; SHI, P.; XU, B.; BAI, Y.; LUO, H.; YAO, B. Cloning, expression, and characterization of a thermostable β -xylosidase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4. **Process Biochemistry**, v.49, n.09, p. 1422-1428, 2014.