

Universidade Federal de Pelotas  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Curso de Bacharelado em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Desenvolvimento de vetores para a expressão de diferentes  
proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à  
aplicação em estudos de patogênese**

Gabrielle de Oliveira Sanches Valerio Navarro

Pelotas, novembro de 2017.

Universidade Federal de Pelotas  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Curso de Bacharelado em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Desenvolvimento de vetores para a expressão de diferentes  
proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à  
aplicação em estudos de patogênese**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia  
da Universidade Federal de Pelotas, para  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador(a) acadêmico: Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto  
Orientadora de estágio: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marie-Anne Van Sluys

Gabrielle de Oliveira Sanches Valerio Navarro

Pelotas, novembro de 2017.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

N322d Navarro, Gabrielle de Oliveira Sanches Valerio

Desenvolvimento de vetores para a expressão de diferentes proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à aplicação em estudos de patogênese / Gabrielle de Oliveira Sanches Valerio Navarro ; Luciano da Silva Pinto, Marie-Anne Van Sluys, orientadores. — Pelotas, 2017.

54 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Proteobactéria. 2. Fitopatógeno. 3. Cana-de-açúcar. 4. Fluorescência. 5. Clonagem. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Sluys, Marie-Anne Van, orient. III. Título.

CDD : 574.219125

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**Desenvolvimento de vetores para a expressão de diferentes proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à aplicação em estudos de patogênese**

Gabrielle de Oliveira Sanches Valerio Navarro

**Data da defesa:**

30/11/2017

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto.

Prof. Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Msc. Frederico Schmitt Kremer

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas diferentes oportunidades e bênçãos que o mesmo me concedeu ao longo de quatro anos de estudo na graduação. Onde deste modo, pude compreender da melhor forma possível as diversas variantes em que a vida pode resultar, contemplando a beleza de todos os momentos vividos.

À minha mãe, Marilene, e a minha irmã, Jacqueline, que nestes quatro anos me mostraram que sempre é possível dar um jeito para as coisas que enfrentamos, bem como pela paciência e pelo enorme incentivo durante minha jornada.

À minha família, Ivanilde, Osni, Marli e Marlene, que mesmo de longe me deram um suporte imensurável em minhas escolhas, e contavam as horas para o meu retorno para “casa”.

À minhas amigas, Gabriela, Amanda e Jessica, e tantos outros(as) colegas que dividiram risadas, tristezas, raivas e outras emoções durante nossas aulas, trabalhos e passeios. Sem vocês, a graduação não teria sido a mesma.

À todos os professores do curso de graduação de Biotecnologia - UFPel que ao longo da minha formação, contribuíram de alguma forma em meu crescimento acadêmico e pessoal.

À equipe do Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BioPro-Lab), em especial ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luciano da Silva Pinto, pela oportunidade do estágio e pelos conselhos acadêmicos e ao Msc. Frederico Schmitt Kremer, pelos ensinamentos de bioinformática ao longo do estágio e pela paciência para a realização dos mesmos.

À equipe do grupo Mural G-Biotec, em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Bicca Dode, pelas diferentes oportunidades de expressão do meu conhecimento científico, bem como, para o desenvolvimento de projetos que visam o disseminamento dos conhecimentos adquiridos na graduação.

E por fim, a toda equipe do GaTE Lab, em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marie-Anne Van Sluys, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e a Dr<sup>a</sup> Paula Turrini pelos ensinamentos da área de biologia molecular e bancada e pela paciência de execução dos mesmos.

“TODO MUNDO DEVERIA SER APLAUDIDO DE PÉ  
PELO MENOS UMA VEZ NA VIDA,  
PORQUE TODOS NÓS VENCEMOS O MUNDO”

AUGUST PULLMAN (EXTRAORDINÁRIO)

## RESUMO

NAVARRO, G. de O.S.V. **Desenvolvimento de vetores para a expressão de diferentes proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à aplicação em estudos de patogênese.** 2017. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, RS.

*Xanthomonas albilineans* é uma proteobactéria que possui a capacidade de invadir o xilema de plantas de cana-de-açúcar e causar a escaudadura das folhas. Esta bactéria é capaz de colonizar os vasos das plantas e mover-se através de seus tecidos vegetais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver linhagens de *X. albilineans* fluorescentes que irão servir de subsídios para projetos que visam monitorar e rastrear estes microrganismos em plantas de cana-de-açúcar, observar a colonização dos tecidos, a interação planta-patógeno e a competição. Para isso, primeiramente foi realizada a propagação dos plasmídeos contendo os genes que codificam proteínas fluorescentes, através da transformação e cultivo de *E. coli*. Em seguida, realizou-se a construção de um vetor no qual o promotor, a proteínas fluorescentes e o gene de resistência ao antibiótico (canamicina) foram imobilizados. Por fim, a transformação de *X. albilineans* e *E. coli* foi efetuada empregando-se a construção desenvolvida. As etapas que envolveram a obtenção de clones dos três plasmídeos contendo proteínas fluorescentes geraram uma adequada concentração e qualidade de DNA plasmidial; os processos de construção do vetor resultaram em uma composição funcional, no entanto, foi preciso realizar uma otimização de códons do gene que codifica a FP para que assim se observasse uma total fluorescência dos microrganismos, de forma que, após essa otimização observou-se em microscopia a integral fluorescência das *E. coli*. Concluindo-se que o projeto obteve êxito, uma vez que, se obteve uma construção fluorescente funcional.

**Palavras-chaves:** Proteobactéria, Fitopatógeno, Cana-de-Açúcar, Fluorescência, Clonagem, Transformação.

## ABSTRACT

NAVARRO, G. de O.S.V. **Development of vectors for expression of different fluorescent proteins in *Xanthomonas albilineans* for application in pathogenesis studies.** 2017. 54p. Course Completion Work - Graduation in Biotechnology, Technological Development Center, Federal University of Pelotas, RS.

*Xanthomonas albilineans* is a proteobacteria that has the ability to invade the xylem of sugarcane plants and cause scalding of the leaves. This bacterium is able to colonize plant pots and move through their plant tissues. The objective of this work was to develop *X. albilineans* fluorescent strains that will serve as subsidies for projects that aim to monitor and trace these microorganisms in sugarcane plants, to observe tissue colonization, plant-pathogen interaction and competition. For this purpose, the plasmids containing the genes encoding fluorescent proteins were first propagated by transformation and culture of *E. coli*. Then, a vector was constructed in which the promoter, fluorescent proteins and antibiotic resistance gene (kanamycin) were immobilized. Finally, the transformation of *X. albilineans* and *E. coli* was effected using the developed construct. The steps involved in obtaining clones of the three plasmids containing fluorescent proteins generated adequate concentration and quality of plasmid DNA; the vector construction processes resulted in a functional composition, however, it was necessary to perform a codon optimization of the gene encoding the FP so that a total fluorescence of the microorganisms was observed, so that, after this optimization, microscopy the integral fluorescence of *E. coli*. It was concluded that the project was successful, since a functional fluorescent construction was obtained.

**Key Words:** Proteobacteria, Phytopathogen, Sugarcane, Fluorescence, Cloning, Transformation.



## ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	<i>Activator, Elemento de transposição do milho;</i>
<b>CFP</b>	Proteína Ciano Fluorescente; do inglês, Cyano Fluorescent Protein;
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico;
<b>FP</b>	Proteínas Fluorescentes; do inglês, Fluorescent Proteins;
<b>GFP</b>	Proteína Verde Fluorescente; do inglês, Green Fluorescent Protein;
<b>GFP-like</b>	Proteínas Fluorescentes semelhantes a GFP; do inglês, Like Green Fluorescent Protein;
<b>IS</b>	Sequências de Inserção;
<b>Mb</b>	Milhões de pares de bases;
<b>MSC</b>	Sítio Múltiplo de Clonagem; do inglês: Multiple Cloning Site;
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>RFP</b>	Proteína Vermelha Fluorescente; do inglês, Red Fluorescent Protein;
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico;
<b>rpm</b>	Rotações Por Minuto
<b>sfGFP</b>	Superfolder Green Fluorescent Protein
<b>T</b>	Temperatura;
<b>TMTC</b>	Do inglês: Too many to count (Muitas para se contar);
<b>UFPeI</b>	Universidade Federal de Pelotas;
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Microscopia de <i>Xanthomonas oryzae</i>	14
<b>Figura 2</b>	- Representação do mapa genômico de <i>X. albilineans</i>	16
<b>Figura 3</b>	- Estrutura tridimensional da proteína verde fluorescente	18
<b>Figura 4</b>	- Representação de espécies de Hydrozoa e Anthozoa	19
<b>Figura 5</b>	- Espectro de diferentes proteínas fluorescentes	20
<b>Figura 6</b>	- Estrutura básica de um vetor de clonagem	21
<b>Figura 7</b>	- Esquema demonstrando as etapas de clonagem e transformação	24
<b>Figura 8</b>	- Mapa genômico do vetor pPROBE-GFP[ASV]	30
<b>Figura 9</b>	- Disposição estrutural do Operon <i>lac</i>	31
<b>Figura 10</b>	- Conjunto de iniciadores para amplificação dos genes empregados na reação de PCR	33
<b>Figura 11</b>	- Imagem gel de agarose 0,7%, após 2 h e 19 min de corrida	45
<b>Figura 12</b>	- Imagem gel de agarose 0,7%, após 3 h e 48 min de corrida	46
<b>Figura 13</b>	- Células de <i>E. coli</i> transformadas com pPROBE-lacII, este resultado indica a funcionalidade do vetor uma vez que se observa, mesmo em luz azul, a fluorescência	48
<b>Figura 14</b>	- Eletroforese em gel 1,5% dos produtos de PCR	49
<b>Figura 15</b>	- Células de <i>E. coli</i> transformadas após a otimização da FP	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Componentes usados no preparo do meio LB	27
<b>Tabela 2</b>	- Componentes usados no preparo do meio SOB	27
<b>Tabela 3</b>	- Componentes usados no preparo do meio SOC	28
<b>Tabela 4</b>	- Componentes e volumes usados na digestão dos plasmídeos plasmídeos pET21b-RL015A, pET21b-RL018A e pET21b-RL020A	29
<b>Tabela 5</b>	- Componentes e volumes utilizados na PCR	34
<b>Tabela 6</b>	- Reação termo cíclica empregada na PCR	34
<b>Tabela 7</b>	- Reações de PCR	35
<b>Tabela 8</b>	- Componentes e volumes usados na digestão dos fragmentos obtidos na PCR	36
<b>Tabela 9</b>	- Componentes e volumes usados na digestão do vetor (pPROBE-lacII)	37
<b>Tabela 10</b>	- Componentes e volumes usados na reação de ligação	37
<b>Tabela 11</b>	- Análise por espectrofotometria da qualidade da extração dos plasmídeos. Equipamento Nanodrop	39

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	12
2. Revisão de Literatura	
2.1 Gênero <i>Xanthomonas</i> .....	14
2.1.1 <i>Xanthomonas albilineans</i> .....	15
2.2 Proteínas fluorescentes.....	17
2.3 Vetores .....	21
2.4 Clonagem e Transformação de bactérias .....	22
3. Objetivos	
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
4. Materiais e Métodos	
4.1 Obtenção dos moldes das proteínas fluorescentes .....	26
4.1.1 Preparo de células competentes de <i>E.coli</i> .....	26
4.1.2 Transformação de <i>E.coli</i> .....	27
4.1.3 Extração dos plasmídeos contendo os genes das proteínas fluorescentes .....	28
4.1.4 Análise dos produtos obtidos na digestão .....	29
4.2 Desenvolvimento de <i>X. albilineans</i> fluorescentes .....	30
4.2.1 Planejamento da construção do plasmídeo .....	30
4.2.1.1 Escolha do vetor .....	30
4.2.1.2 Escolha do promotor .....	31
4.2.2 Amplificação e Clonagem .....	31

4.2.2.1	Transformação de <i>X. albilineans</i> .....	31
4.2.2.2	Otimização da sequência da proteína fluorescente .....	32
4.2.2.3	Desenho dos iniciadores para amplificação .....	32
4.2.2.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	33
4.2.2.5	Análise dos produtos de PCR .....	35
4.2.2.6	Purificação dos produtos de PCR .....	35
4.2.2.7	Digestão do vetor e dos genes de fluorescência .....	36
4.2.2.8	Ligação .....	37
4.2.3	Transformação de <i>E. coli</i> .....	38
5.	Resultados .....	39
6.	Discussão .....	45
7.	Conclusão .....	48
8.	Referências .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas*, que será discutido mais profundamente adiante no trabalho, abrange bactérias fitopatogênicas que acometem uma variedade de doenças em plantas de amplo interesse econômico e a elucidação de seu genoma ajuda a entender suas características, estratégias de patogenicidade além de propiciar a prospecção de genes de interesse para aplicações biotecnológicas (MARCUIZZO et al. 2009). *Xanthomonas albilineans* é um representante do gênero *Xanthomonas*, que estão associadas a plantas onde causam danos graves a centenas de espécies de plantas de interesse ornamental ou agrônomico; ao compartilhar inúmeras características fenotípicas, atualmente são reconhecidas pelo menos 27 espécies e mais de 120 patovares (variantes de patogênese) do gênero *Xanthomonas* (PIERETTI et al., 2015).

Os plasmídeos, discutidos mais profundamente no item 2, irão conter genes de proteínas fluorescentes, estas proteínas foram primeiramente extraídas de águas-vivas e seus homólogos de diversos animais marinhos são amplamente utilizados como marcadores universais fluorescentes geneticamente codificados. A diversidade de proteínas fluorescentes atualmente disponíveis cobre quase todo o espectro visível, oferecendo inúmeras possibilidades alternativas para marcadores multicores e estudos de interações proteicas. As proteínas fluorescentes fotoativadas permitem o rastreamento de moléculas e células foto-marcadas no espaço e no tempo e também podem ser usadas para imagens de super-resolução. Os sensores codificados geneticamente permitem monitorar a atividade das enzimas e as concentrações de vários analitos. As proteínas fluorescentes de rápida maturação, relógios celulares e temporizadores expandem ainda mais as opções para estudos em tempo real em tecidos vivos (CHUDAKOV et al, 2010).

No entanto, para a inserção dos insertos de interesse é necessário realizar a etapa de clonagem que consiste no processo de construção de moléculas de DNA recombinante e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante, visto que a essência da tecnologia do DNA

recombinante é a preparação de um grande número de moléculas de DNA idênticas; e posteriormente a etapa de transformação que consiste em dar um choque (seja por exposição à alta temperatura, ou descarga elétrica) em células bacterianas competentes que as encoraja a incorporar DNA exógeno (LODISH et al, 2000, seção 7.1).

Posteriormente as etapas de clonagem e transformação que serão realizadas em *E.coli* e *X. albilineans* e a fim de se analisar a permanência dos plasmídeos repiques sequenciais serão sucedidos, e a análise da fluorescência será desenvolvida empregando-se microscopia de fluorescência e espectrofotometria. A avaliação dos sítios alvos para edição genômica será feita por genômica comparativa nas quatro linhagens (que já foram sequenciadas pelo GaTE Lab).

Desta maneira, visto a importância do gênero *Xantomonas* e mais especificamente de *X. albilineans* para a economia brasileira, onde a base da economia nacional é formada por agricultura pois somos um grande produtor e exportador de mercadorias de diversos tipos, principalmente commodities minerais, agrícolas e manufaturados. O monitoramento deste microrganismo empregando técnicas de biologia molecular e DNA recombinante se faz necessário visto que o Brasil produz 455 toneladas de cana-de-açúcar por ano, sendo o principal produtor mundial.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas*, compreende proteobactérias pertencentes a divisão gama, que abrange uma diversidade de bactérias fitopatogênicas que acometem uma variedade de doenças em plantas de amplo interesse econômico (RODRIGUEZ-R et al., 2012). Possuem forma bacilar, e variam de 0.4 – 1.0  $\mu\text{m}$  até 1.2 – 3.0  $\mu\text{m}$  de comprimento e sua motilidade decorre de um único flagelo polar (Figura 1).



**Figura 1** - Microscopia de *Xanthomonas oryzae*.

FONTE: National Institute of Informatics, Japão.

Foram primeiramente descrito em 1921 como *Bacterium vesicatorium* um agente causal da mancha bacteriana em pimenta e tomate e posteriormente reclassificado como *Xanthomonas campestris*. Inicialmente representadas como um gênero monotípico, e posteriormente dividido em dois grupos, A e B. Um estudo subsequente classificou 183 cepas relatadas em 20 espécies diferentes, principalmente com base em dados de hibridização DNA-DNA (VAUTERIN et al., 2012).

Estas bactérias danificam uma variedade de cultivos, incluindo *Citrus* spp. (lima, laranja, limão, pomelo, entre outros), *Oryza* spp. (arroz), crucíferas (alface, brócolis, couve-flor, rabanete e *Arabidopsis thaliana*) e *Manihot esculenta*



(mandioca), com membros individuais demonstrando um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro (NAUSHAD & GUPTA, 2013).

*Xanthomonas* é um dos poucos gêneros bacterianos em que grandes conjuntos de dados de hibridação DNA-DNA, RFLP e REP-PCR estão disponíveis e foram empregados para a resolução taxonômica do grupo. Além disso, a disponibilidade de genomas dentro do gênero permitiu estudos recentes de genômica comparativa e evolução do genoma (RADEMAKER et al., 2000).

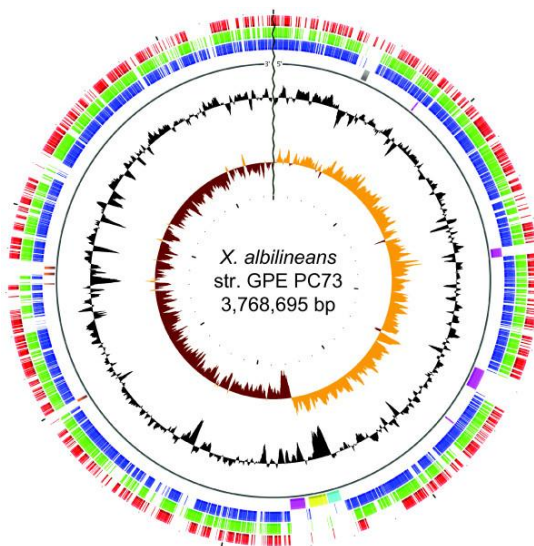
As abordagens para a obtenção de dados permitem identificar várias características interessantes na evolução de *Xanthomonas*, como por exemplo, eventos de transferência de genes laterais putativos, adaptação do códon, bem como, detectar evidências de uma tendência evolutiva para uma redução do tamanho do genoma em pelo menos dois clados do gênero (*Xanthomonas vasicola* e *Xanthomonas albilineans*) (RODRIGUEZ-R et al., 2012).

### **2.1.1 *Xanthomonas albilineans***

*Xanthomonas albilineans* possui a capacidade de invadir o xilema da cana-de-açúcar e causar a escaldadura das folhas, esta doença é capaz de colonizar os vasos das plantas e mover-se sistematicamente em seus tecidos vegetais. Se manifestando de forma distinta em localidades diferentes, ou seja, os sinais da doença variam de acordo com as condições do local e apresenta grande potencial destrutivo, sobretudo em variedades suscetíveis (ROSETTO & SANTIAGO, 2006).

Mas comumente, os sinais apresentados variam de uma única listra branca, estreita e de forma bem definida, para uma completa murchidão e necrose das folhas infectadas, levando à morte da planta. A disseminação de *X. albilineans* ocorre principalmente de forma mecânica através do uso de ferramentas de colheita contaminadas e pela distribuição e plantio de mudas infectadas. No entanto, a transmissão aérea e o potencial de sobrevivência epífita também foram relatados para esse patógeno (PIERETTI et al, 2015).

O genoma de *X. albilineans* consiste em um cromossomo circular de 3,768,695 pb (Figura 2) com um conteúdo G+C de 63%; Dispõe de 3208 genes de proteínas e 57 genes de RNA. Além de possuir três plasmídeos: *plasm I* (31.555 pb), *plasm II* (27.212 pb) e *plasm III* (24.837 pb).



**Figura 2** - Representação do mapa genômico de *X. albilineans*.

FONTE: PIERETTI *et al.* 2009.

A análise do genoma de *X. albilineans* revelou características incomuns em comparação com outras *Xanthomonas*, como por exemplo, o tamanho menor do genoma uma vez que, normalmente os genomas de outras espécies de *Xanthomonas*, como por exemplo *Xanthomonas citri*, possuem aproximadamente 5 Mb; Há um menor número de sequências de inserção (IS) no genoma destes microrganismos, apresentam a ausência do agrupamento de genes Hrp-T3SS (os genes Hrp-T3SS são responsáveis pelo sistema de secreção do tipo III pertencente a família de respostas de hipersensibilidade e patogenicidade (Hrp1 e Hrp2, respectivamente); Este sistema permite que os agentes patogênicos entreguem, nas células hospedeiras, proteínas (efetores de tipo III) que modulam a fisiologia e a imunidade das plantas em benefício do patógeno), e a ocorrência de erosão do genoma. Além disso, *X. albilineans* é a única *Xanthomonas* que produz a fitotoxina albicidina (um potente inibidor da DNA girase que bloqueia a diferenciação do

cloroplasto, resultando em sintomas de doença da escama da folha da cana-de-açúcar) (MARGUERETTAZ et al, 2015).

Embora a maioria dos *Xanthomonas* tenha fatores de patogenicidade, como por exemplo, genes de goma, T3SS Hrp e T6SS para sobrevivência, crescimento e propagação em plantas hospedeiras, *X. albilineans* não possuem esses fatores de patogenicidade, diminuindo de fato sua artilharia para contornar mecanismos de defesa da cana de açúcar e imunidade inata. Embora o ato de estar "desarmado" possa ser desvantajoso para um agente patogênico vascular, *X. albilineans* permanecem capazes de invadir e se espalhar na cana-de-açúcar, sugerindo que esta usa outras estratégias, por exemplo, sendo intrusivo na planta, para minimizar as respostas indutíveis de defesa do hospedeiro (PIERETTI et al, 2015).

Por outro lado, o genoma reduzido de *X. albilineans* tem características específicas que podem estar envolvidas na adaptação da bactéria para viver e se espalhar em vasos de xilema de cana-de-açúcar. Por exemplo, enzimas de degradação de parede celular (CWDEs) específicas e transportadores dependentes de TonB (TBDTs) as quais parecem estar otimizadas para a vida no ambiente de xilema de cana-de-açúcar pobre em nutrientes (ROTT et al, 2011).

A singularidade de *X. albilineans* reside também entre as cepas, uma vez que, um mesmo organismo gera diferentes níveis de sintomas nas plantas devido a regiões particulares presentes no genoma de cada uma das cepas, bem como na produção da fitotoxina e antibiótico albicidina. De acordo com as especificidades decorrentes das análises biológicas, bioquímicas, filogenéticas e genômicas descritas, pode-se dizer que *X. albilineans* são bastante singulares entre o gênero *Xanthomonas* (ROYER et al, 2003).

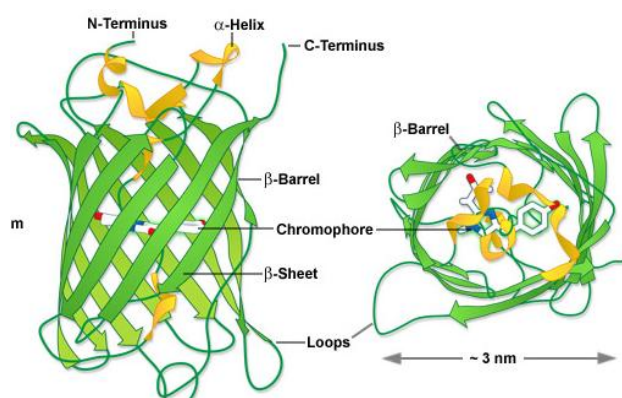
## **2.2 Proteínas Fluorescentes**

As proteínas fluorescentes são membros de uma classe estruturalmente homóloga de proteínas que compartilham a propriedade única de serem auto-suficientes para formar um cromóforo de comprimento de onda visível a partir de

uma sequência de 3 aminoácidos dentro de sua própria sequência polipeptídica (CAMPBELL, 2008).

A descoberta e o desenvolvimento da proteína verde fluorescente (GFP) mudaram radicalmente a agenda científica. As variantes melhoradas das proteínas GFP e GFP-*like* em sinergia com microscópios de alta resolução, técnicas computacionais e poderosas abordagens teóricas estão alimentando uma revolução científica focada em análises quantitativas de sistemas biológicos complexos (The Nobel Prize in Chemistry, 2008).

Ao todo, a estrutura da proteína fluorescente (Figura 3) possui 238 resíduos de aminoácidos (~27 kiloDalton), estes são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de sua fluorescência. É notável que o princípio da fluorescência deriva-se de um tripleto de aminoácidos adjacentes: os resíduos de serina, tirosina e glicina nas localizações 65, 66 e 67 (referidos respectivamente como Ser65, Tyr66 e Gly67). Embora este motivo de aminoácido simples seja comumente encontrado em toda a natureza, geralmente não resulta em fluorescência; o que é exclusivo da proteína fluorescente é que a localização deste tripleto peptídico reside no centro de uma estrutura de barril notavelmente estável, constituída por 11 folhas beta dobradas em um tubo (MICROSCOPYU, 2017).

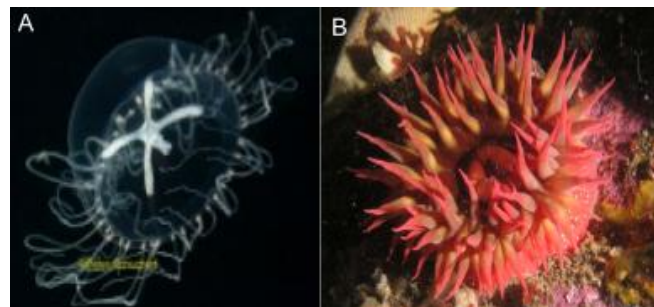


**Figura 3** - Estrutura tridimensional da proteína verde fluorescente.

FONTE: ZEISS.

Há alguns anos uma série de proteínas semelhantes à GFP (GFP-*like*) foram descobertas em espécies de Hydrozoa e Anthozoa bioluminescentes (Figura 4) sendo estes organismos pertencentes ao filo Cnidaria, representado pelas hidras, medusas, anêmonas-do-mar, caravelas e corais, animais diblásticos e aquáticos,

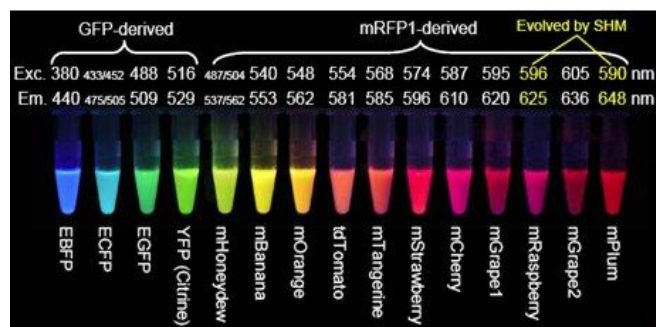
sendo que a maioria habita regiões marinhas, no qual as proteínas fluorescentes (FP) podem re-emitir luz durante a transferência de energia de ressonância bioluminescente (BRET) (CHUDAKOV *et al*, 2010). As FPs geralmente são divididos em seis classes espectrais com base em suas máximas de emissão, que incluem espectros que emitem no azul (BFPs; 440-470 nm), ciano (CFPs; 471-500 nm), verde (GFPs; 501-520 nm), amarelo (YFPs; 521-550 nm), laranja (OFPs; 551-575 nm) e vermelha (RFPs; 576-610 nm) (SAMPLE & NEWMAN & ZHANG, 2009).



**Figura 4** - Representação de espécies de Hydrozoa e Anthozoa. Imagem A refere-se a *Odessia maeotica*, pertencente a classe Hydrozoa e a imagem B refere-se a *Urticina lofotensis*, pertencente a classe Anthozoa.

FONTE: World Register of Marine Species, 2009.

Atualmente, a GFP e suas variantes e homólogas de diferentes cores (Figura 5) são usadas em uma variedade de aplicações, que visam estudar a organização e a função dos sistemas vivos. As FPs codificadas como marcadores juntamente com proteínas de interesse torna possível observar a localização, movimento, volume de expressão e até mesmo "envelhecimento" (ou seja, decorrer do tempo da síntese protéica) destas proteínas. Os ácidos nucleicos também podem ser marcados através de domínios de proteína de ligação ao RNA ou ao DNA. As FPs direcionadas para organelas celulares por sinais específicos de localização de proteínas permitem a visualização de sua morfologia, fusão e fissão, segregação durante a divisão celular, etc (CHUDAKOV *et al*, 2010).



**Figura 5** - Espectro de diferentes proteínas fluorescentes.

FONTE: The Nobel Prize in Chemistry, 2008.

As FPs revolucionaram o estudo da biologia celular. Em seu trabalho Sample, Ample, Newman & Zhang (publicado em 2009) elucidam os grandes progressos que foram feitos relacionado à compreensão dos princípios que regem as diversas propriedades bioquímicas e fotofísicas dos membros dessa família única; Estes incluem muitos fatores, como os mecanismos moleculares que conduzem a formação de cromóforos e a modulação das propriedades fotofísicas do cromóforo maduro, dessa forma com o conhecimento adquirido a partir dos estudo de FPs, como a compreensão da química de cromóforos, uma coleção diversificada das estruturas cristalizadas de FPs e várias estratégias bem estabelecidas para refinar as propriedades fluorescentes de FPs, a paleta de cores permite as mais diversas aplicações.

Desta forma, as FPs são ferramentas essenciais para a marcação individual de células e para a marcação do tecido vegetal para visualizar a morfologia, localização, movimento, estádios mitóticos e muitas outras características celulares importantes. Sendo assim, organismos inteiros podem ser marcados com FPs para discriminar entre indivíduos transgênicos e de tipo selvagem, bem como para entretenimento, ou seja, criação de peixes de aquário excepcionalmente coloridos e outros animais de estimação (CHUDAKOV *et al*, 2010).

Como demonstrado por Sabuquillo *et al.*, em 2016, o uso de vetores contendo genes de proteínas fluorescentes é uma importante ferramenta para uma vez que demonstrou-se a validação do uso de cepas transgênicas de espécies *Agrobacterium* e *Xanthomonas*, transformadas para expressar constitutivamente duas proteínas GFP, para avaliar o comportamento das bactérias nas plantas, excluindo erros suspeitos de localização, colonização e estudos de sobrevivência

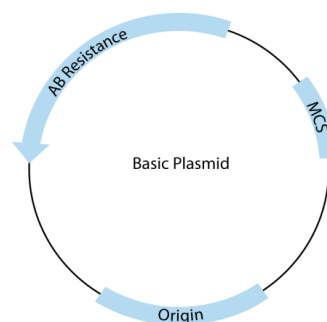
devido ao negativo efeito da introdução da GFP ou relacionado à instabilidade do plasmídeo inserido.

## 2.3 Vetores

Os vetores destinados à clonagem são usualmente genomas que podem aceitar o DNA alvo e aumentar o número de cópias através de sua própria replicação autônoma (PELLEY, 2012), no entanto, esses vetores só são úteis para armazenar uma sequência genética, uma vez que, por si só, eles são incapazes de permitir a transcrição e a tradução do gene para um produto proteico funcional (CARTER & SHIEH, 2015).

Os vetores de clonagem podem ser divididos em (a) Plasmídeos, (b) Bacteriófago, (c) Cosmídeos, (d) Cromossomo artificial bacteriano (BAC) e (e) Cromossomo artificial de levedura (YAC). Os vetores de clonagem geralmente são selecionados com base em diferenças em sua capacidade para o tamanho do DNA da inserção (PELLEY, 2012).

Plasmídeos (Figura 6) são fragmentos de DNA de fita dupla que tipicamente carregam genes e podem se replicar independentemente do DNA cromossômico. Embora possam ser encontrados em arqueas e eucariotos, eles desempenham o papel biológico mais importante nas bactérias, onde podem ser passados de uma bactéria para outra por transferência de genes horizontal (conjugação), geralmente fornecendo um benefício para o hospedeiro, como resistência a antibióticos (ADDGENE, 2017).



**Figura 6** - Estrutura básica de um vetor de clonagem.

FONTE: Biology - Stack Exchange, 2016.

Os vetores estão entre as ferramentas essenciais para a clonagem de genes e são mais úteis se eles também codificam algum tipo de gene marcador que codifique uma molécula de bioindicador que pode ser medida em uma avaliação biológica para assegurar sua inserção e expressão no organismo hospedeiro (PHILLIPS, 2017).

Como descrito por Miller et al, em 2000, para serem de grande utilidade, os vetores devem (i) ser funcionais em tantas taxas quanto possível, (ii) mostrar um alto grau de sensibilidade para detectar promotores de força fraca a moderada e (iii) seja suficientemente estável para ser usado *in vivo* sem seleção de antibióticos; de forma que os vetores plasmidiais pPROBE-GFP, utilizados neste trabalho seguem todas as características acima descritas como demonstrado por Han et al em 2008, quando empregou o uso destes vetores para descrever um sistema de marcação fluorescente para estudar virulência e patogenicidade de *X. oryzae* pv. *oryzae*.

## **2.4 Clonagem e Transformação de Bactérias**

A clonagem molecular refere-se ao procedimento de isolamento de uma sequência de DNA definida e subsequentemente à obtenção de múltiplas cópias do mesmo *in vitro*. Embora a clonagem seja usualmente utilizada para amplificar fragmentos de DNA contendo genes, pode ser utilizada para amplificar qualquer sequência de DNA tal como promotores, sequências não codificantes, oligonucleotídeos sintetizados quimicamente e DNA fragmentado aleatoriamente. A clonagem é amplamente utilizada em experiências biológicas e aplicações tecnológicas, como a produção comercial de antígenos recombinantes, citocinas e proteínas (SHARMA *et al.*, 2015).

Em 1928, Dr. Frederick Griffith mostrou que as bactérias eram capazes de transferir suas informações genéticas por um processo que ele chamava de transformação, isso significava que as cepas bacterianas não tinham propriedades fixas e não intercambiáveis, o que era o pensamento na época. Eles foram capazes de se transformar e esta era uma clara indicação de transferência de genes. Frederick Griffith não foi, no entanto, capaz de descobrir como essa transformação

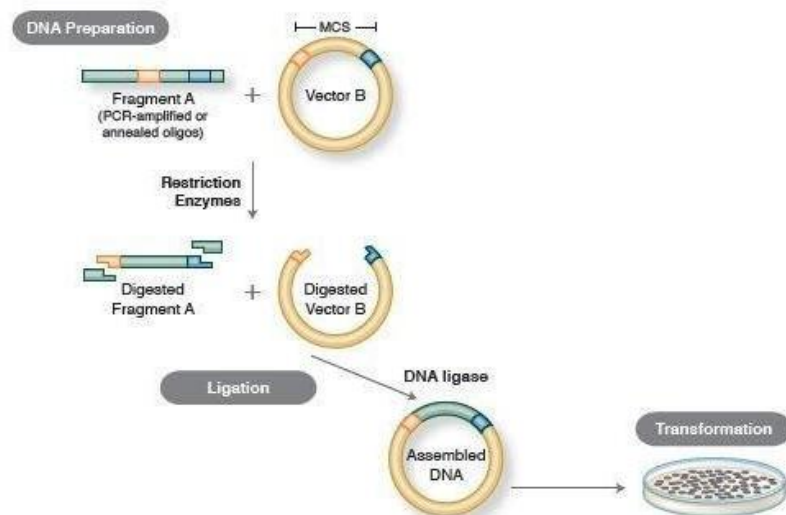


ocorreu; ele sabia sobre os cromossomos e sobre a nucleína (DNA e RNA) que Frederick Miescher detectou em 1869, mas ninguém sabia com certeza se a informação genética estava contida em ácidos nucleicos ou proteínas (PANSE, 2017).

Mas somente no final da década de 1960 que a tecnologia de DNA recombinante surgiu, com a descoberta de enzimas que poderiam cortar e unir moléculas de DNA de cadeia dupla especificamente. De fato, já em 1952, dois grupos observaram de forma independente que as bactérias codificam um "fator de restrição" que impediu que os bacteriófagos crescessem dentro de certos hospedeiros. Mas a natureza desse fator não foi descoberta até 1968, quando Arber e Linn conseguiram isolar uma enzima, denominada fator de restrição, que corta seletivamente DNA exógeno, mas não DNA bacteriano. Pouco depois da descoberta de Arber e Linn, Hamilton O. Smith estendeu e confirmou esses estudos isolando uma enzima de restrição de *Haemophilus influenzae*, levando-o a ganhar o Prêmio Nobel em Medicina ou Fisiologia em 1978 pela descoberta das enzimas de restrição e sua aplicação a problemas de genética molecular, uma vez que foi capaz de mostrar que a enzima de restrição cliva a molécula de DNA no meio de uma seqüência simétrica de nucleotídeos (CHIAL, 2017).

Ele demonstrou que a enzima cortou seletivamente o DNA no meio de um trecho específico de 6 pares de bases; uma característica de certas enzimas de restrição é a sua propensão para cortar o substrato de DNA em ou perto de seqüências específicas, geralmente palindrômicas, de "reconhecimento" (PRAY, 2017).

Durante o processo de clonagem (Figura 7), as extremidades do DNA de interesse e do vetor devem ser modificadas para torná-los compatíveis entre si e assim se unirem através da ação de uma ligase de DNA, recombinase ou um mecanismo de reparo de DNA *in vivo*. Estas etapas normalmente utilizam enzimas tais como nucleases, fosfatases, quinases e/ou ligases. Muitas metodologias de clonagem e, mais recentemente, kits foram desenvolvidos para simplificar e padronizar esses processos (NEB, 2016).



**Figura 7** - Esquema demonstrando as etapas de clonagem e transformação.

FONTE: NEB, 2017.

Normalmente este processo, emprega a abordagem clássica de restrição e ligação, depende essencialmente de quatro etapas invariáveis, (1) fragmentação de DNA com endonucleases de restrição, (2) ligação de fragmentos de DNA a um vetor, (3) transfecção e (4) seleção (SHARMA *et al.*, 2015).

Nos últimos 40 anos, a clonagem molecular progrediu de isolar arduamente e reunir dois pedaços de DNA, seguido de rastreamento intensivo de clones potenciais, para montar de forma perfeita até 10 fragmentos de DNA com uma eficiência notável em apenas algumas horas, ou projetar moléculas de DNA *in silico* e sintetizando-os *in vitro*. Juntos, todas essas tecnologias permitem explorar, manipular e aproveitar o DNA, que ampliará ainda mais os horizontes da ciência (NEB, 2017).

Assim, a busca por uma solução de monitoramento dos microrganismos (*X.albilineans*) em plantas de cana-de-açúcar através da utilização de vetores contendo fluorescência criam uma oportunidade de rastreamento deste microrganismo nas lavouras.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver vetores para a expressão de diferentes proteínas fluorescentes em *Xanthomonas albilineans* visando à aplicação em projetos que destinam-se a monitorar e rastrear estes microrganismos em plantas de cana-de-açúcar a fim de se observar a colonização dos tecidos, a interação planta-patógeno bem como se há preferência por algum tecido.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar a etapa de construção do vetor, que contenha o gene da proteína fluorescente;
- Realizar a etapa de clonagem dos insertos referentes as proteínas fluorescentes;
- Realizar a transformação em *E. coli* e *X. albilineans*;
- Obter linhagens de *Xanthomonas albilineans* que manifestem a fluorescência nas quatro cores desejadas (verde, azul, amarelo e vermelho).

## 4. Materiais e Métodos

O trabalho final de conclusão de curso foi realizado na Universidade de São Paulo - Campus Butantã e trata-se de um projeto desenvolvido no GaTE Lab, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marie-Anne Van Sluys e co-orientação da Dr<sup>a</sup> Paula Turrini (pesquisadora com bolsa PNPd).

### 4.1 Obtenção dos moldes de proteínas fluorescentes

#### 4.1.1 Preparo de células competentes de *E.coli*

Para este preparo empregou-se células de *E.coli* cepa DH10B (projetadas para a propagação de grandes clones de insertos de DNA) e seguiu-se o protocolo descrito: Estriou-se uma placa de LB Agar, com estreptomicina 12,5 µg/mL e incubou-se a mesma à 37°C, ao mesmo tempo autoclavou-se 3 a 4 litros de água milli-Q. Seguiu-se a inoculação de uma colônia isolada da estria recém feita em 5 mL de meio Lurian-Bertani (LB; Tabela 1) contendo estreptomicina 12,5 µg/mL (ou seja, em um falcon de 50 mL: 5 mL LB + 1,25 µL de estreptomicina 50 mg/mL); e incubou-se por 18 horas à 37° C sob agitação de 200 rpm; Retirou-se 4 mL e inoculou-se em 400 mL de meio Super Optimal Broth (SOB; Tabela 2) à 37°C sem strepto e deixou-se por 2 horas à 37°C sob agitação de 200 rpm. Ao atingir a OD desejada, dividiu-se os 400 mL em 8 falcons de 50 mL; incubou-se em gelo por 20 minutos; e posteriormente centrifugamos por 5 minutos a 7000 G; descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se cada um dos pellets em 50 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada e gelada; centrifugou-se por 05 minutos a 7000 G e descartou-se o sobrenadante; posteriormente realizamos a resuspensão de cada um dos pellets em 25 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q autoclavada e gelada; juntou-se dois falcons em um, somando quatro tubos; e centrifugamos por 5 minutos a 7000 G e descartamos o sobrenadante; e ressuspendemos um dos quatro pellets em 08 mL de glicerol 10% autoclavado e gelado, enquanto os outros três pellets ficavam no gelo, de modo que ressuspendemos os demais pellets na mesma solução, um de cada vez juntando todas as células no final; centrifugamos novamente por 5 minutos a 7000 G e descartamos o sobrenadante; por fim ressuspendemos em 1,2 - 1,6 mL de glicerol

10% autoclavado e gelado; fizemos alíquotas de 50  $\mu$ L e congelamos imediatamente em N<sub>2</sub> líquido; e estocamos os tubos em freezer -80°C.

**Tabela 1** – Componentes usados no preparo do meio LB

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Triptona	1 g
Extrato de levedura	0,5 g
NaCl	1 g
H <sub>2</sub> O	Até o volume final (100 mL)

**Tabela 2** – Componentes usados no preparo do meio SOB

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Triptona	20 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
MgCl <sub>2</sub>	0,952 g
MgSO <sub>4</sub>	2,467 g
H <sub>2</sub> O	Até o volume final (1 L)

#### **4.1.2 Transformação de *E.coli***

Empregou-se nesta transformação, o equipamento MicroPulser (BIORAD), alíquotas de células competentes: *E.coli* cepa DH10b e os três vetores plasmidiais, disponíveis no laboratório e que foram comprados da AddGene, sendo respectivamente, pET21b-RL015A (contendo os genes das FPs: sfGFP e mCherry), pET21b-RL018A (contendo os genes das FPs: mCerulean e mCherry) e pET21b-RL020A (contendo os genes das FPs: mVenus e mCherry). E seguiu-se o protocolo descrito: misturamos 45 mL de meio LB + 45  $\mu$ L de antibiótico (neste caso utilizou-se ampicilina: 100  $\mu$ L/mL ) e vertemos em placas de Petri, deixando solidificar dentro do fluxo, estas placas foram posteriormente armazenadas na geladeira. No gelo, dispomos as alíquotas de células competentes (para descongelar), as cubetas de

eletroporação (0,2 cm) e os tubos contendo os plasmídeos; após descongeladas, misturamos 1 µL de DNA plasmidial no tubo contendo as células competentes e transferimos o conteúdo do tubo para a cubeta de eletroporação; submetemos as células ao pulso elétrico, nas condições já pré-estabelecidas pelo equipamento (Configuração: Ec 2); imediatamente após o pulso, adicionamos 950 µL de meio Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC; Tabela 3) na cubeta para a remoção dessas células; transferimos todo o conteúdo da cubeta para um novo tubo estéril e incubamos a 37°C por 1 hora, sob agitação; após o período de incubação, plaquemos 50 µL das células transformadas nas placas que foram previamente produzidas; e por fim incubamos a 37°C em estufa as placas até a obtenção de colônias (aproximadamente 16 horas).

**Tabela 3** – Componentes usados no preparo do meio SOC

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Triptona	20 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
MgCl <sub>2</sub>	0,952 g
MgSO <sub>4</sub>	2,467 g
Glicose	3,603 g
H <sub>2</sub> O	Até o volume final (1 L)

### **4.1.3 Extração dos plasmídeos contendo os genes das proteínas fluorescentes**

Essa etapa foi realizada respeitando o protocolo de purificação de DNA plasmidial empregando o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), que é relatado a seguir: Inoculou-se 1 colônia de *E. coli* DH10B transformada em 15 mL de meio LB acrescido do 15 µL do antibiótico Ampicilina (solução uso 50 µg/mL), a 37° C overnight sob agitação (250 rpm). Transferimos 4,5 mL da cultura para um tubo

Eppendorf e centrifugamos a 12.000 G por 30 segundos a 4°C; ressuspendemos as células bacterianas sedimentadas em 250 µl de tampão P1, adicionamos 300 µl de tampão P2 e misturamos invertendo o tubo de 4-6 vezes; depois adicionamos 400 µl de tampão N3 e misturamos imediatamente invertendo o tubo de 4-6 vezes; depois centrifugamos durante 10 minutos a 13.000 rpm (~ 17.900x G) em uma microcentrífuga de mesa; aplicamos o sobrenadante do passo acima para a coluna de rotação QIAprep 2.0 por pipetagem e centrifugamos por 60 segundos e descartamos o fluxo contínuo; posteriormente lavamos a coluna de rotação QIAprep 2.0 adicionando 750 µl de tampão PE e centrifugamos por 60 segundos e descartamos o fluxo contínuo e centrifugamos por mais 1 minuto para remover o tampão de lavagem residual. Por fim colocamos a coluna QIAprep 2.0 em um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml e eluímos o DNA, adicionando 60 µl de H<sub>2</sub>O ao centro de cada coluna, deixando repousar durante 1 minuto e após centrifugamos por 1 minuto. A partir da solução de DNA plasmidial obtida da miniprep, medimos a concentração de plasmídeos utilizando o nanodrop; e procedemos a digestão, a fim de se confirmar os plasmídeos trabalhados, seguindo a ordem, mostrada na tabela 4 e o procolo, onde homogeneizamos os componentes da digestão em um tubo e incubamos a reação a 37° C por 1 hora.

**Tabela 4** - Componentes e volumes usados na digestão dos plasmídeos pET21b-RL015A, pET21b-RL018A e pET21b-RL020A.

Componentes	Volume
H <sub>2</sub> O	23 µl
Tampão 3.1 (10X)	3 µL
Plasmídeo	3 µL
Enzima <i>EcoRV</i> (10 U)	1 µL

#### 4.1.4 Análise dos produtos obtidos na digestão

A eletroforese dos produtos obtidos na etapa de digestão foi realizada empregando-se: 100 mL de Gel (Agarose 0,7% + 100 mL Tampão TAE 1x); 7,5 µL

de corante SYBR Safe; Marcadores: 1 kb DNA Ladder (0,5 µg) e Lambda DNA/*HindIII* Marker (0,5 µg); 10 µL de amostra de DNA plasmidial não digerido; e 10 µL de amostra de DNA plasmidial digerido.

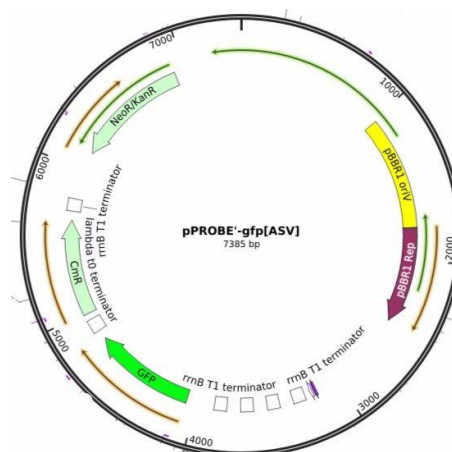
## 4.2 Desenvolvimento de *X. albilineans* fluorescentes

### 4.2.1 Planejamento da construção

A construção do vetor foi desenvolvida, visando a expressão das FPs, portanto, foi realizado um estudo sobre as características de todos os componentes utilizados durante a construção.

#### 4.2.1.1 Escolha do vetor

O vetor escolhido para a transformação das linhagens de *Xanthomonas albilineans* foi o 'pPROBE-GFP[ASV]' (Figura 8), devido às suas características de interesse, sendo respectivamente, sua ampla gama de hospedeiros e sua construção, ou seja, dos componentes já presentes neste vetor.



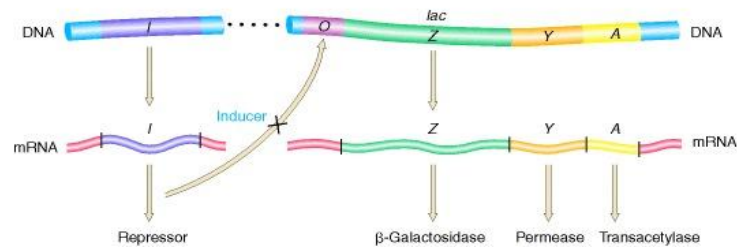
**Figura 8** - Mapa do vetor pPROBE-GFP[ASV]. Observa-se neste vetor sua origem de replicação (representada pela seta amarela/roxa), sua região MSC (representada pelo bloco em azul claro), GFP (representada pela seta em verde fluorescente), o gene de resistência ao antibiótico (representada pela seta verde clara) e as enzimas de restrição demarcadas ao redor do vetor.

FONTE: Addgene, 2017.



### 4.2.1.2 Escolha do promotor

A fim de promover a expressão, adicionou-se neste vetor - em sua região de clonagem mais comumente conhecida como Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) -, o promotor Operon *lac* (Figura 9) que fora previamente modificado, em que a região do operador foi “quebrada”, ou seja, o gene que codifica o operador ao inserido no vetor foi inserido pela metade de forma que o repressor não interaja com o operador tornando a expressão da FP constitutiva e não regulada.



**Figura 9** - Disposição estrutural do Operon *lac*, este é composto pelo repressor (gene I), operador (gene O) e os genes Z, Y e A. O produto do gene I bloqueia a expressão dos genes Z, Y e A ao interagir com o operador (O). O indutor pode inativar o repressor, evitando assim a interação com o operador. Quando isso acontece, o operão é totalmente expresso.

FONTE: An Introduction to Genetic Analysis, 7<sup>th</sup> edition, 2000.

## 4.2.2 Amplificação e Clonagem

### 4.2.2.1 Transformação de *Xanthomonas albilineans*

Empregou-se nesta transformação, o equipamento MicroPulser (BIORAD), alíquotas de células competentes de *X. albilineans* isolado 11 e o plasmídeo pPROBE-lacII. A transformação de *X. albilineans* com a construção foi realizada seguindo o protocolo descrito a seguir: Misturou-se 40 mL de meio Xantho + 8 µL de antibiótico (neste caso utilizou-se canamicina), e verteu-se o meio em duas placas de Petri, deixando solidificar dentro do fluxo. No gelo, dispomos as

alíquotas de células competentes, a cubeta de eletroporação (0,1 cm) e o tubo contendo a construção; após descongeladas, misturamos 1 µL da construção no tubo contendo as células competentes e transferimos o conteúdo do tubo para a cubeta de eletroporação; submetemos as células ao pulso elétrico, nas condições já pré-estabelecidas pelo equipamento (Configuração: Ec 1); imediatamente após o pulso, adicionamos 950 µL de meio Xantho na cubeta para a remoção dessas células e transferimos todo o conteúdo da cubeta para um novo tubo estéril e incubamos a 28°C por 3 horas, sob agitação; após o período de incubação, plaqueamos as células transformadas nas placas que foram previamente produzidas; e por fim incubamos a 28°C em estufa as placas até a obtenção de colônias.

#### **4.2.2.2 Otimização da sequência da proteína fluorescente**

Devido aos resultados apresentados na etapa de transformação de *X. albilineans*, realizamos a análise e otimização da sequência do gene que codifica para a FP eGFP e da sequência do gene que codifica para a FP sfGFP. Para isso, utilizamos a plataforma online ATGme (disponível em: <http://atgme.org/>), onde inserimos a sequência referente a proteína fluorescente, eGFP e posteriormente a sfGFP, e a tabela referente ao uso de códons em *X. albilineans*.

#### **4.2.2.3 Desenho dos iniciadores para amplificação dos genes**

A fim de se introduzir os genes das FP no referido vetor, desenhou-se pares de iniciadores para amplificação dos genes para cada FP diferente de forma que cada reação de PCR pudesse ser realizada. Assim, pode-se

observar abaixo o conjunto de iniciadores para amplificação dos genes desenvolvidos (Figura 10):

sfGFP  
Iniciador F - 5' GGTCCGGC**GAATTC**TCTAGAAATAATTTT 3'  
Iniciador R - 5' CATTGATA**AAGCCT**AGTCATTATTTGTACAGTTCA 3'

**Figura 10** - Conjunto de iniciadores para amplificação dos genes empregados na reação de PCR. A sequência sinalizada em amarelo refere-se ao sítio de reconhecimento da enzima de restrição *EcoRI* e a sequência sinalizada em azul refere-se ao sítio de reconhecimento da enzima de restrição *StuI*.

FONTE: Autora, 2017.

#### 4.2.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Esta etapa do projeto visou obter as sequências referentes às proteínas fluorescentes, para que posteriormente seja viável a clonagem destas no vetor que já fora previamente descrito. A PCR foi realizada seguindo o protocolo de execução da PCR, onde estabelecemos a reação (Tabela 5) em gelo e um microtubo, depois transferimos os tubos contendo a reação de PCR do gelo para uma máquina de PCR com o bloco pré-aquecido a 95 °C e iniciamos a reação com as condições previamente estabelecidas (Tabela 6).

**Tabela 5** - Componentes e volumes utilizados na PCR.

Componentes	Volume final	Concentração final
5X Green GoTaq Flexi Buffer	5 µl	1X
Solução de MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2 µl	2 mM
PCR Nucleotide Mix, 10 mM cada	0,5 µl	10 mM
Primer F	1 µl	10 µM
Primer R	1 µl	10 µM
GoTaq DNA Polimerase	0.125 µl	(5U/ µl)
DNA modelo	1 µl	20 ng/µl
Água livre de nucleases	to 25 µl	--

**Tabela 6** - Reação termo cíclica empregada na PCR.

Passos	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95°C	45 segundos	35 ciclos
Anelamento	51-63°C	20 segundos	
Extensão	72°C	1 minuto/kb	
Extensão final	72°C	5 minutos	1 ciclo
<i>Hold</i>	10°C	Indefinido	1 ciclo

Para a execução deste protocolo, empregou-se o conjunto de iniciadores para amplificação acima descrito e do modelo da proteína fluorescente pET21b-RL015A > sfGFP. Ao todo, foram feitas 6 reações de PCR sendo respectivamente: Tubo 1 (Controle negativo = 57,0°C), Tubo 2 (Média da temperatura mais 6°C = 63°C), Tubo 3 (Média da temperatura mais 3°C = 60°C),

Tubo 4 (Média da temperatura = 57°C), Tubo 5 (Média da temperatura menos 3°C = 54°C) e Tubo 6 (Média da temperatura menos 6°C = 51°C); estas reações tinham como objetivo amplificar o fragmento do gene que codifica para a sfGFP.

**Tabela 7** – Reações de PCR

<b>Reação</b>	<b>Temperatura</b>
Tubo 1 (Controle negativo)	57° C
Tubo 2 (Média da T + 6° C)	63° C
Tubo 3 (Média da T + 3° C)	60° C
Tubo 4 (Média da T)	57° C
Tubo 5 (Média da T - 3° C)	54° C
Tubo 6 (Média da T - 6° C)	51° C

#### **4.2.2.5 Análise dos produtos de PCR**

Para a análise dos produtos obtidos após o término da reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% (30 mL de Gel constituído de Agarose 1,5% + 30 mL Tampão TAE 1x). Cada amostra aplicada corresponde a 05 µL de cada reação e 1,5 µL de corante SYBR Safe. Como controle utilizamos 05 µL de amostra sem o molde da FP e o controle de tamanho da amplificação foi realizada por comparação com o Marcador - 100 pb DNA Ladder.

#### **4.2.2.6 Purificação dos produtos de PCR**

A purificação dos produtos resultantes da reação de PCR, foram realizados seguindo o protocolo do kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), o qual é descrito a seguir: Ajustamos o volume das amostras da reação para 100 µL, em seguida misturamos 1 volume (100 µL) da amostra com 2 volumes (200 µL) de tampão NTI diluído (1 volume de NTI para 5 volumes de água); colocamos a coluna em um tubo de coleta (2 mL) e pipetamos a mistura feita na coluna, centrifugamos por 30 segundos a 11,000x G e descartamos o fluxo.

Adicionamos 700 µL do tampão NT3 na coluna, centrifugamos por 30 segundos a 11,000x G e descartamos o fluxo. Centrifugamos durante 1 minuto a 11,000x G para remover o tampão NT3 completamente e colocamos a coluna em um novo tubo (1,5 mL), adicionamos 40 µL de tampão NE e incubamos em temperatura ambiente (de 18 a 25°C) por 1 minuto, por fim centrifugamos por 30 segundos a 11,000x G.

#### 4.2.2.7 Digestão do vetor e dos genes de fluorescência

Ambas as digestões empregaram enzimas de restrição *EcoRI* e *StuI* e foram realizadas seguindo o protocolo descrito abaixo, para a digestão do fragmento quanto para a digestão do vetor. Assim, procedeu-se a digestão, seguindo a ordem, mostrada na Tabela 8 para a digestão do fragmento e na Tabela 9 para a digestão do vetor, onde homogeneizamos os componentes da digestão em um tubo (1,5 mL) e incubamos à temperatura de 37°C por 1 hora.

**Tabela 8** - Componentes e volumes usados na digestão dos insertos obtidos na PCR.

Componentes	Volume	Concentração
H <sub>2</sub> O	0 µl	--
Tampão CutSmart	3 µL	10 X
Inserto	25 µL	5,9 ng/ µL
Enzima <i>EcoRI</i>	1 µL	10 U
Enzima <i>StuI</i>	1 µL	10 U

**Tabela 9** - Componentes e volumes usados na digestão do vetor (pPROBE-lacII).

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentração</b>
H <sub>2</sub> O	17,5 µl	--
Tampão CutSmart	3 µL	10 X
Vetor	7,5 µL	99,6 ng/ µL
Enzima EcoRI	1 µL	10 U
Enzima Stul	1 µL	10 U

#### 4.2.2.8 Ligação

A ligação do fragmento do gene da sfGFP gerado na PCR ao vetor (pPROBE-lacII), foi realizada seguindo o protocolo descrito. No gelo, prosseguimos a reação de ligação ao adicionar todos os reagentes (Tabela 10) em um tubo e incubamos no termociclador a 22°C por duas horas e depois a 16°C *overnight*.

**Tabela 10** - Componentes e volumes usados na reação de ligação.

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentração</b>
H <sub>2</sub> O	5 µl	--
Tampão DNA T4 Ligase	2 µL	10 X
Vetor	8,5 µL	50 ng
Inserto	1,5 µL	15 ng
T4 DNA Ligase	1 µL	10 U
PEG 4000	2 µL	50 %

### **4.2.3 Transformação de *E. coli***

Empregou-se nesta transformação, o equipamento MicroPulser (BIORAD), alíquotas de células competentes de *E. coli* e a construção. Esta transformação seguiu o mesmo protocolo previamente descrito.



## 5. Resultados

O preparo de células competentes de *E.coli* realizado seguindo o protocolo previamente descrito, mostrou-se eficiente no resultado final, uma vez que um número satisfatório de células estavam aptas a receber o DNA exógeno. Deste modo, o objetivo da transformação celular foi clonar os plasmídeos (pET21b-RL015A, pET21b-RL018A e pET21b-RL020A) que serviram de template para a amplificação das proteínas fluorescentes, ou seja, ter uma fonte inesgotável de template. Deste modo, as linhagens transformadas sucederam DH10b-RL015A, DH10b-RL018A e DH10b-RL020A.

No entanto, os resultados da eletroporação das bactérias DH10b após a incubação final se caracterizou como 'Too many to count' (TMTTC), todavia, seguimos utilizando estas células nas etapas de extração e digestão. No 1º dia do protocolo de extração (descrito anteriormente), inoculou-se ao todo 06 inóculos sendo respectivamente: DH10b/RL015A, DH10b/RL018A, DH10b/RL020A, BL21/RL015A, BL21/RL018A e BL21/RL020A e 01 controle - contendo apenas o meio + ampicilina).

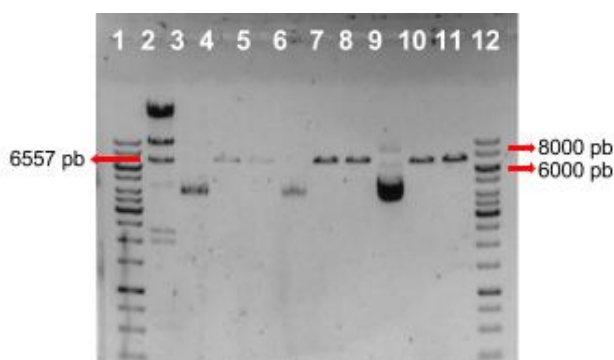
A incubação, tanto do controle quanto dos inóculos, apresentou resultados positivos, uma vez que observou-se crescimento bacteriano nos inóculos e nenhum crescimento no controle. Dessa forma, continuou-se o protocolo e mediu-se com o NanoDrop as concentrações plasmidiais, que pode ser observada na tabela abaixo:

**Tabela 11** – Análise por espectrofotometria da qualidade da extração dos plasmídeos. Equipamento Nanodrop.

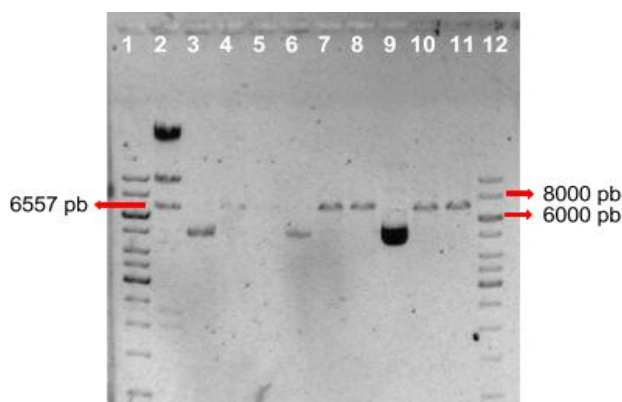
Plasmídeo	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230	Rendimento
pET21b-RL015A	96,4	1,92	1,76	5,784 ng
pET21b-RL018A	109,4	1,93	1,97	6,564 ng
pET21b-RL020A	112,6	1,93	1,90	6,756 ng

Seguiu-se a reação de digestão, empregou-se nesta reação a enzima *EcoRV*, visto que esta enzima poderia ser utilizada para a digestão de todos os plasmídeos e a região de clivagem neste momento não é significativa, dado que o objetivo desta digestão é comprovar se o plasmídeo que estamos trabalhando corresponde às características esperadas do mesmo.

Decorreu-se posteriormente a eletroforese em gel de agarose 0,7% + TAE. O resultado da eletroforese pode ser visto nas imagens abaixo:



**Figura 11** - Imagem do gel de agarose 0,7%, após 2 h e 19 min de corrida. Pode-se observar que os plasmídeos digeridos, colunas 4/5 (pET21b-RL015A), 7/8 (pET21b-RL018A) e 10/11 (pET21b-RL020A), correspondem ao esperado uma vez que as bandas condizem com os tamanhos dos plasmídeos (pET21b-RL015A -> 6844 pb; pET21b-RL018A -> 6818 pb; pET21b-RL020A -> 6816 pb).  
As colunas 3, 6 e 9 correspondem aos plasmídeos não digeridos.



**Figura 12** - Imagem gel de agarose 0,7%, após 3 h e 48 min de corrida. Nesta segunda captura pode-se observar que os plasmídeos digeridos, colunas 4/5 - 7/8 - 10/11, correspondem ao esperado uma vez que as bandas condizem com os tamanhos dos plasmídeos (pET21b-RL015A -> 6844 pb; pET21b-RL018A -> 6818 pb; pET21b-RL020A -> 6816 pb).

De forma que a construção do vetor foi positiva, este foi inserido em células competentes de *X. albilineans* cepa 11 através da transformação por eletroporação. Confirmou-se com a incubação que as células haviam sido transformadas (ou seja, o plasmídeo tinha sido integrado ao organismo da bactéria) pois estas estavam crescendo em meio seletivo com antibiótico, no entanto, em um primeiro momento não se observou a fluorescência das células que tinham sido previamente transformadas com o vetor contendo o promotor e a FP.

Optou-se por realizar pequenos inóculos de 09 colônias presentes na placa, a fim de entender o que poderia ter acontecido. Estes inóculos foram deixados em um shaker a 28°C e a 90 rpm por 12 dias consecutivos. No oitavo dia de cultivo, observou-se nos inóculos das colônias 4, 5 e 9 crescimento celular e o restante dos inóculos não foi observado nenhum crescimento. No décimo segundo dia, observou-se nos inóculos das colônias 2, 4, 5 e 9 crescimento celular, nos inóculos das colônias 1 e 6 apresentaram contaminação e no restante dos inóculos não foi observado nenhum crescimento celular.

De acordo com os resultados observado nestes cultivos, trabalhou-se com as seguintes hipóteses para explicar o que poderia estar acontecendo: (1) baixa rotação no período de recuperação das células após a transformação; (2) o antibiótico poderia estar envelhecido e assim qualquer célula poderia crescer no meio; (3) o pH do meio utilizado para o cultivo poderia estar abaixo do essencial; e (4) o vetor construído poderia estar inativo.

Isto posto, experimentos foram realizados a fim de se testar as hipóteses acima descritas, onde (1) realizou-se uma nova transformação de mesma cepa de *X. albilineans*, e neste caso empregou-se uma maior rotação no tempo de recuperação destas células, onde ao invés de se utilizar 90 rpm (padrão) utilizou-se 180 rpm pelo mesmo período de tempo (03 horas); (2) um novo estoque de antibiótico foi feito e usado para cultivar novamente *X. albilineans*; (3) o pH de todos os meios disponíveis foram medidos com o equipamento de pHmetro; e (4) o vetor foi inserido em outros organismos, *E. coli* e *A. tumefaciens*, para testar a atividade do plasmídeo.

De forma que observou-se nestes experimentos o mesmo resultado visto na primeira transformação com *X. albilineans*, ou seja, as células não apresentaram fluorescência na luz azul (luz com baixa sensibilidade) mesmo após a mudança na rotação por minuto, na preparação de um novo estoque de antibiótico e na medição do pH dos meios utilizados nos experimentos. Assim de forma a se comprovar a funcionalidade e viabilidade do vetor este foi inserido em *E. coli*, de modo que o resultado pode ser visto na figura 13 onde mesmo no transiluminador de luz azul observa-se a fluorescência das células transformadas.



**Figura 13** - Células de *E. coli* transformadas com pPROBE-lacII, este resultado indica a funcionalidade do vetor uma vez que se observa, mesmo em luz azul, a fluorescência.

Esse resultado nos conduziu a outra hipótese que poderia explicar a “não” fluorescência destes microrganismos, isto é a transcrição do gene neste microrganismo poderia estar ocorrendo de forma errada e assim a FP não estaria sendo transcrita em sua forma funcional.

De forma a se avaliar esta hipótese realizou-se a busca pelo codon usage da eGFP em *X. albilineans* e também o codon usage da sfGFP neste mesmo organismo, através da ferramenta ATGme; essa busca mostrou que para ambas as FPs *X. albilineans* faz o uso de códon raros para a transcrição desse gene, no entanto o codon usage para sfGFP é melhor do que para GFP (Figura 14). Assim em

decorrência das análises, realizou-se a encomenda do par de iniciadores para amplificação do gene da sfGFP, posteriormente realizou-se a PCR onde se obteve um bom rendimento da amplificação (Figura 15) e seguiu-se as digestões do fragmento e do vetor com as enzimas de restrição, esta etapa foi eficiente uma vez que se observa na eletroforese bandas referentes aos segmentos esperados (ou seja, na eletroforese do vetor observa-se uma banda referente ao vetor e outra referente a parte excisada; e na eletroforese do fragmento observa-se uma banda referente ao inserto).

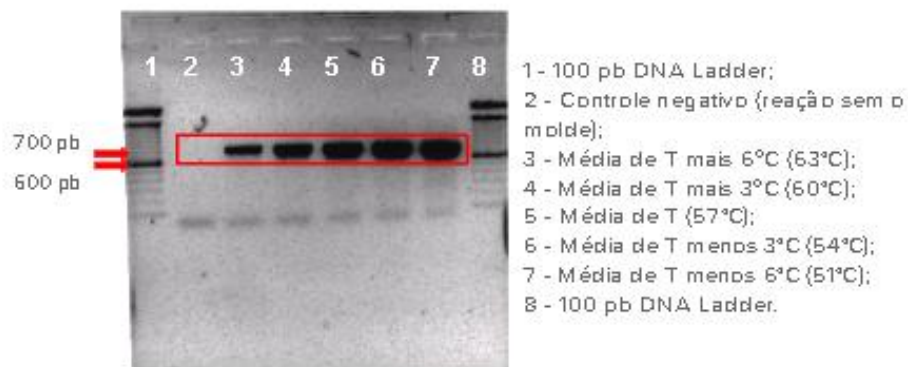
```

ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC AGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCA ACA TAC GGA AAA CTT ACC CTT AAA TTT
ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CGT GTT CCA TGG CCA ACA CTT GTC ACT ACT TTG ACT TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCA AGA TAC CCA GAT CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT
GTA CAG GAA AGA ACT ATA TTT TTC AAA GAT GAC GGG AAC TAC AAG ACA CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT AAT AGA ATC GAG TTA AAA GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA
CAC AAA TTG GAA TAC AAC TAT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA ATC AAA GTT AAC TTC AAA ATT AGA CAC AAC ATT GAA GAT GGA AGC GTT CAA CTA GCA GAC CAT TAT CAA CAA
AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC CTG TCC ACA CAA TCT GCC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG AGA GAC CAC ATG GTC CTT CTT GAG TTT GTA ACA GCT GGT GGG ATT AGA
CAT GGC ATG GAT GAA CTA TAC AAA AGG CCT GCA GCA AAC GAC GAA AAC TAC GCT GCA TGA GTT TAA

ATG CGT AAA GGC GAA GAG CTG TTC ACT GGT GTC GTC CCT ATT CTG GTG GAA CTG GAT GGT GAT GTC AAC GGT CAT AAG TTT TCC GTG CGT GGC GAG GGT GAA GGT GAC GCA ACT AAT GGT AAA CTG ACG CTG AAG TTC
ATC TGT ACT ACT GGT AAA CTG CCG GTA CCT TGG CCG ACT CTG GTA ACG ACG CTG ACT TAT GGT GTT CAG TGC TTT GCT GAT TAT CCG GAC CAT ATG AAG CAG CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGC TAT
GTG CAG GAA CGC ACG ATT TCC TTT AAG GAT GAC GGC ACG TAC AAA ACG CGT GCG GAA GTG AAA TTT GAA GGC GAT ACC CTG GTA AAC CGC ATT GAG CTG AAA GGC ATT GAC TTT AAA GAA GAC GGC AAT ATC CTG GGC
CAT AAG CTG GAA TAC AAT TTT AAC AGC CAC AAT GTT TAC ATC ACC GCC GAT AAA CAA AAA AAT GGC ATT AAA GCG AAT TTT AAA ATT CSC CAC AAC GTG GAG GAT GGC AGC GTG CAG CTG GCT GAT CAC TAC CAG CAA
AAC ACT CCA ATC GGT GAT GGT CCT GTT CTG CTG CCA GAC AAT CAC TAT CTG AGC ACG CAA AGC GTT CTG TCT AAA GAT CCG AAC GAG AAA CGC GAT CAT ATG GTT CTG CTG GAG TTC GTA ACC GCA GCG GGC ATC ACG
CAT GGT ATG GAT GAA CTG TAC AAA TAA

```

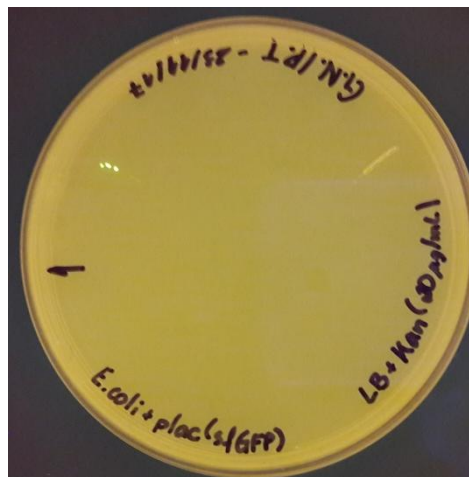
**Figura 14** – Resultado obtidos na análise da sequência das proteínas pelo ATGme. Na imagem observa-se a análise da eGFP (superior) e a análise da sfGFP (inferior).



**Figura 15** - Eletroforese em gel 1,5% dos produtos de PCR. As bandas delimitadas pelo retângulo vermelho referem-se aos produtos, sfGFP, amplificados na PCR e as colunas 1 e 8 referem-se aos marcadores de 100 pb. Observa-se que as temperaturas usadas nas reações das colunas 5, 6 e 7 geraram um melhor rendimento da PCR.

Após a etapa de digestão, a reação de ligação foi realizada. A ligação foi bem sucedida de forma que realizou a purificação destes produtos e por fim realizou-se a transformação em *E.coli* para atestar a viabilidade desta nova construção.

A transformação realizada resultou em células de *E. coli* fluorescentes, vistas tanto da luz azul quanto em microscopia de fluorescência (Figura 15).



**Figura 15** - Células de *E. coli* transformadas após a otimização da FP; este resultado indica a funcionalidade do vetor uma vez que se observa, mesmo em luz azul, a fluorescência.

## 6. Discussão

A identificação de microrganismos por procedimentos fenotípicos convencionais baseados em morfologia e nos testes bioquímicos são demorados e envolvem uma grande quantidade de reagentes e geralmente não é possível discriminar microrganismos quanto a classificação cepas. O desenvolvimento recente de métodos moleculares tem sido particularmente proveitoso para a diferenciação de microrganismos ao nível das espécies, onde a microscopia de fluorescência é uma técnica cuja teoria e metodologia são amplamente exploradas para estudos de estrutura molecular e função em química e bioquímica (LEBLANC & DUFOUR, 2002).

Portanto, o uso de FPs é uma ferramenta poderosa para estudos de biologia celular, pois oferece a capacidade de visualizar, rastrear e quantificar alvos em diferentes ambientes. FPs modificadas foram utilizadas para avaliar o crescimento do patógeno, para assim facilitar a observação da infecção e colonização de plantas suscetíveis e não susceptíveis e para visualizar o momento ou a localização da expressão do gene dos patógenos (SABUQUILLO et al, 2016).

Diante do exposto acima, utilizou-se plasmídeos contendo genes de FPs para a análise de *X. albilineans* e pode-se concluir com as figuras 13 e 14 que o DNA plasmidial, presente nas colunas 4-5, 7-8 e 10-11, corrido corresponde ao tamanho esperado aos dos plasmídeos, RL015A - 6849 bp, RL018A - 6818 bp e RL020A - 6816 bp, respectivamente, como demonstrado por Lentini et al. (2013).

As etapas que visavam o desenvolvimento de *X. albilineans* que expressam FPS, tiveram alguns contratemplos uma vez que as células transformadas não apresentavam fluorescência. As hipóteses para explicar o que possa ter levado a este resultado, basearam-se: na baixa rotação no período de recuperação das células após a transformação; o antibiótico usado poderia ser antigo e assim qualquer célula e/ou microrganismo poderia crescer no meio; o pH do meio utilizado para o cultivo poderia estar abaixo do essencial (pH 6,8); o vetor construído poderia estar inativo; e a transcrição da FP poderia estar ocorrendo de maneira errada.

O trabalho com estas hipóteses foram os principais pontos de controle encontrados e que poderiam estar de alguma forma estar influenciando a transformação e desenvolvimento destes microrganismos, como relatado por Kumar et al em 1991.

Posto que o vetor (pPROBE-GFP[ASV]), relatado por Miller et al. em 2000, possui as características de: (i) ser funcional em inúmeros táxons possíveis, (ii) mostrar um alto grau de sensibilidade para detectar promotores de força fraca à moderada e (iii) ficar estável o suficiente para ser usado *in vivo* sem seleção de antibiótico, este mostrou-se a partir dos resultados dos experimentos intermediários não ser o problema que estava impedindo a fluorescência das células já que em outros microrganismos se observava a emissão de fluorescência, como mostrado.

Portanto, analisou-se o uso de códons de *X. albilineans* para a GFP. O código genético é degenerado, isto é, o mesmo amino ácido pode ser codificado por vários códons. Apesar de codificarem o mesmo amino ácido, estes códons sinônimos não são utilizados da mesma forma em genomas diferentes, e mesmo em um único genoma o padrão de uso dos códons sinônimos pode variar muito entre os genes, ou ainda ao longo de um único gene. Com a recente introdução de sequências genômicas completas as razões destes desvios no uso de códons estão começando a ser entendidas (SALIM & CAVALCANTI, 2008).

Uma vez que a tradução demanda muita energia, uma tradução ineficiente e imprecisa desperdiça recursos celulares limitados. Assim ao longo da evolução dos genomas, as mutações que reduzem a energia necessária para a tradução foram favorecidas. O fenômeno do codon usage é, portanto, explicado pela seleção para a otimização de tradução (SALIM & CAVALCANTI, 2008).

Além disso, o uso de códons desempenha um papel importante no controle de uma multiplicidade de processos celulares, que vão desde a produção diferencial de proteínas até o dobramento da proteína (QUAX et al, 2015). Estas hipóteses afirmam que o uso de códons ótimos podem aumentar a eficiência e a precisão da tradução, no entanto *X. albilineans* faz o uso de códons raros para a transcrição do gene que codifica para a FP GFP.



Portanto se fez necessário uma nova transformação visando à otimização do uso de códons para as FPs em *X. albilineans*. Devido ao curto tempo de estágio e as alterações necessárias realizadas ao longo dos experimentos, a transformação foi realizada apenas com a otimização feita de uma cor de FP, sendo respectivamente sfGFP, isto posto foram feitas as seguintes projeções: otimização das sequências referentes às outras fluorescências, bem como o desenvolvimento de *X. albilineans* expressando estas cores.

## 7. Conclusão

A partir dos resultados é possível concluir que a obtenção dos plasmídeos que contêm o gene que codifica para as proteínas fluorescentes foi eficiente uma vez que o produto final (os plasmídeos pET21b-RL015A, pET21b-RL018A e pET21b-RL020A) possuem bom rendimento e permitiram a construção de um estoque e uma fonte inesgotável de moldes.

De forma que se identificou a necessidade de adaptação da FP em *X. albilineans*, apenas uma cor de fluorescência foi trabalhada ao longo do projeto - verde respectivamente; assim as etapas para a construção de um novo vetor foram realizadas e obteve-se por fim um vetor funcional.

A partir da obtenção do vetor contendo a FP, conclui-se com a transformação realizada em *E.coli* que a construção otimizada é operacional, visto que se observou a fluorescência da sfGFP no transiluminador de luz.

Deste modo, dentre os próximos passos estão a transformação de *X. albilineans* com a construção otimizada, bem como o desenvolvimento da construção otimizada visando a obtenção das outras fluorescências.

Assim por fazer parte de um projeto maior do grupo GaTE Lab, os contratempos encontrados nas etapas que visavam o desenvolvimento de *X. albilineans* que expressam fluorescência distintas, bem como os resultados obtidos permitiram um melhor desenho experimental uma vez que identificou-se ao longo deste projeto os pontos chave para o sucesso e bom andamento do projeto de este faz parte.

## 8. Referências

BIO RAD. **Micro Pulser™ - Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide.** Disponível em: <<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006174B.pdf>>. Acessado em: 15/09/2017.

Biology - Stack Exchange. **Plasmid: Empty Backbone?**. Disponível em: <<https://biology.stackexchange.com/questions/34573/plasmid-empty-backbone>>. Acessado em: 25/10/2017.

BODNAR *et al.* **Complete Genome Sequences of Three *Xanthomonas citri* Strains from Texas.** *Genome Announcements*, v.5 (28), p.1-2, 2017.

BOGDANOVA, *et al.* **Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp.** *J. Bacteriol.*, v.193 (19), p. 5450-5464, 2011.

CAMPBELL, R.E. **Fluorescent Proteins.** Disponível em: <[http://www.scholarpedia.org/article/Fluorescent\\_proteins](http://www.scholarpedia.org/article/Fluorescent_proteins)>. Acessado em: 03/10/2017.

CARTER, M. & SHIEH, J. **Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology.** *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, v.2, p.219-237, 2015.

CHIAL, H. **Restriction Enzymes.** Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/spotlight/restriction-enzymes-18458113>>. Acessado em: 01/12/2017.

CHUDAKOV, D.M.; MATZ, M.V; LUKYANOV, S; LUKYANOV, K.A. **Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues.** *Physiological Reviews*, v. 90 (3), p.1103-1263, 2010.

EHRENBERG, M. **The green fluorescent protein: discovery, expression and development.** *The Royal Swedish Academy of Sciences*, v.?, p.1-18, 2008.

GRIFFITHS, A.J.F. & MILLER, J.H. & SUZUKI, D.T. & LEWONTIN, R.C. & GELBART, W.M. **An Introduction to Genetic Analysis - Discovery of the lac system: negative control.** 7ª Edição. Nova York: W. H. Greeman, 2000. 800p.

HAN, S-W.; PARK, C-J.; LEE, S-W.; RONALD, P.C. **An efficient method for visualization and growth of fluorescent *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in planta.** *BMC Microbiology*, v.8(164), p. 1-9, 2008.

IFRJ - Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2010. **Extração de DNA genômico e Minipreparação de plasmídeo.** Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfRXUAH/extracao-dna-micropreparacao-plasmideo-relatorio>>. Acessado em: 15/09/2017.

KUMAR, P.K.R.; MASCHKE, H.E.; FRIEHS, K.; SCHIIGED, K. **Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.** *Trends Biotechnol.*, v.9(8), p.279-284, 1991.

LEE, *et al.* **The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice.** *Nucleic Acids Res.* v.33 (2), p. 577-586, 2005.

LEE, P.Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C-Y.; KIM, Y.H. **Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.** *J. Vis. Exp.*, v.62, p. e3923, 2012.

LIMA, L. M. de. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular.** *Embrapa - Documento 191*, v.1, p.1-27, 2008.

LIU *et al.* **Complete Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain 17 from Taiwan.** *Genome Announcements*, v.3 (6), p.1, 2015.

LODISH, H. *et al.* **Molecular Cell Biology.** 4ª Edição. Nova York: W. H. Freeman, 2000.

MARCUZZO, L.L. **Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*.** *Ágora: R. Divulg. Cient.*, v.16(1), p.13-19, 2009.

MARGUERETTAZ, M.; PIERETTI, I.; GAYRAL, P.; PUIG, J.; BRIN, C.; COCIANCICH, S.; POUSSIER, S.; ROTT, P.; ROYER, M. **Genomic and Evolutionary Features of the SPI-1 Type III Secretion System That Is Present in *Xanthomonas albilineans* but Is Not Essential for Xylem Colonization and Symptom Development of Sugarcane Leaf Scald.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.24(2), p.246-259, 2011.

MicroscopyU. **Introduction to Fluorescent Proteins.** Disponível em: <<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>>. Acessado em: 13/09/2017.

MILLER, W.G.; LEVEAU, J.H.; LINDOW, S.E. **Improved gfp and inaZ Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors.** *MPMI*, v 13(11), p.1243-1250, 2000.

NAUSHAD, H. S. & GUPTA, R. S. **Phylogenomics and molecular signatures for species from the plant pathogen-containing order Xanthomonadales.** *PLoS ONE*, v.8 (2), p.1-19, 2013.

NAVARRO, G. de O.S.V; GUIMARÃES, A.M.; KREMER, F.S.; PINTO, L. da S. **Estudo de genes ortólogos em pangenoma de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*.** In: V SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA: O POTENCIAL DA INTEGRAÇÃO ACADÊMICA e I MOSTRA ACADÊMICA, 2017, Pelotas. Resumos, Pelotas: Curso de Biotecnologia, 2017. 90p.

PELLEY, J.W. **Recombinant DNA and Biotechnology.** *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, v.2, p.161–169, 2012.

PHILLIPS, T. **Learn About Gene Cloning and Vectors.** Disponível em: <<https://www.thebalance.com/gene-cloning-and-vectors-definition-and-major-types-375681>>. Acessado em 12/09/2017.

PIERETTI *et al.* **The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae.** *BMC Genomics*, v.10 (616), p. 1-15, 2009.

PIERETTI *et al.* **What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads?.** *Frontiers in Plant Science*, v.6 (289), p.1-7, 2012.

PRAY, L.A. **Restriction Enzymes.** Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/restriction-enzymes-545>>. Acessado em: 01/12/2017.

QUAX, T.E.F.; CLAASSENS, N.J.; SOLL, D.; OOST, J.V.D. **Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression.** *Mol Cell.*, v. 59(2), p. 149-161, 2015.

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F.J. **Comparison of AFLP and repPCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.665-677, 2000.

RODRIGUEZ-R *et al.* **Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*.** *BMC Microbiology*, v.12 (43), p.1-14, 2012.

ROSSETTO, R. & SANTIAGO, A. **Doenças bacterianas.** Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_78\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_78_22122006154841.html)>. Acessado em: 11/09/2017.

ROTT, P.; FLEITES, L.; MARLOW, G.; ROYER, M.; GABRIEL, D.W. **Identification of New Candidate Pathogenicity Factors in the Xylem-Invading Pathogen *Xanthomonas albilineans* by Transposon Mutagenesis.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.24(5), p.594–605, 2011.

ROYER, M. *et al.* **Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large pks and nrps genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes.** *MPMI*, v.17(4), p.414-427, 2004.

SABUQUILLO, P.; GEA, A.; MATAS, I.M.; RAMOS, C.; CUBERO, J. **The use of stable and unstable green fluorescent proteins for studies in two bacterial models: *Agrobacterium tumefaciens* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *Arch Microbiol.*, v.199(4), p.581-590, 2017.

SALIM, H.M.W & CAVALCANTI, A.R.O. **Factors Influencing Codon Usage Bias in Genomes.** *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 19 (2), p.257-262, 2008.

SAMPLE, V. & NEWMAN, R.H. & ZHANG, J. **The structure and function of fluorescent proteins.** *Chemical Society Reviews*, v.38, p.2852–2864, 2009.

SERWER, P. **Agarose gels: Properties and use for electrophoresis.** *Electrophoresis*, v.4, p.375-382, 1983.

SESTITO, G.C.; MARCHETTO, G.Q; SILVA, J.; SILVA, K.S.; CREPALDI, L.S. **Relatório de Biologia Molecular.** Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/46322680/Relatorio-Celulas-Competentes-e-Transformacao-Bacteriana>>. Acessado em: 14/09/2017.

SHARMA, K.; AJAY KUMAR MISHRAB, A.K.; MEHRAJC, V.; DURAISAMY, G.S. **Advances and applications of molecular cloning in clinical microbiology.** *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 30 (1), p.65–78, 2015.

TSIEN, R.Y. **Nobel Prize.** Disponível em: <[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/tsien-slides.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/tsien-slides.pdf)>. Acessado em: 13/09/2017.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. **Reclassification of *Xanthomonas*.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.45, p.472-489, 1995.

VEDOVELI, N.C.P.S. & CASTRO, V.P. **Manual para a construção de vetores de expressão.** *FUNDHERP*, v.1, p.1-48, 2016.

World Register of Marine Species. **Taxon details.** Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1337>>. Acessado em: 28/10/2017.

ZEISS. ***Aequorea victoria* Fluorescent Proteins.** Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>>. Acessado em: 13/09/2017.