

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA POLIGALACTURONASE RECOMBINANTE DE MELÃO EM *Escherichia coli*

PEGORARO, Camila¹, DAL CERO, Joceani², SIMIONATTO, Simone³, MANICA-BERTO, Roberta⁴, ROMBALDI, Cesar Valmor⁵, SILVA, Jorge Adolfo⁶

¹Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeL - Bolsista CNPq, e-mail: camyagro@yahoo.com.br; ²Aluna de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM/UFPeL - Bolsista CAPES, e-mail: joceagro@yahoo.com.br; ³Bolsista PRODOC/Laboratório de Biologia Molecular/CENBIOT/UFPeL, e-mail: s_simionatto@yahoo.com.br; ⁴Aluna de doutorado em Agronomia, área de concentração: Fruticultura de Clima Temperado - Bolsista CAPES, e-mail: robertamanica@yahoo.com.br; ⁵Prof. Titular no DCTA/FAEM/UFPeL, e-mail: cesarvrf@ufpel.edu.br; ⁶Prof. Adjunto no DCTA/FAEM/UFPeL, e-mail: ctajorge@ufpel.edu.br.

1. INTRODUÇÃO

Devido às variações existentes na espécie de *Cucumis melo* L., existem meloeiros cujos frutos são classificados em climatérios e não climatérios, de acordo com a taxa respiratória e produção de etileno. As variedades climatéricas, em geral são mais preferidas pelos consumidores devido ao elevado conteúdo de compostos aromáticos, doçura, maciez e sabor. Entretanto, essas variedades se caracterizam pela alta produção de etileno e pelo curto período pós-colheita.

A maturação de melões caracteriza-se pelo amolecimento da polpa, resultante da solubilização da parede celular pela ação de enzimas como pectina metilesterases, pectato liases, expansinas e poligalacturonases (PG), as quais, na maioria das vezes, são etileno-dependentes. Em função disso, Ayub *et al* (1996) e Silva *et al* (2004) realizaram transformação genética da cultivar Cantaloupe com um clone da ACC oxidase em orientação antisense, resultando em frutos com menor produção de etileno e, conseqüentemente, com menor atividade da PG, conferindo maior preservação da firmeza de polpa.

Em melão foi detectada a expressão de seis genes de PG em diferentes tecidos. *MPG1*, *MPG2* e *MPG3* são expressos durante a maturação, mas com diferentes níveis de expressão mRNA acumulativo (HADFIELD, 1998), sendo *MPG1* o gene mais importante no processo de maturação. Os genes *MPG2* e *MPG3* também estão presentes nos frutos, porém não demonstram serem os responsáveis pelo amolecimento da polpa (Nishiyama *et al.*, 2007). O gene *MPG1* é totalmente dependente de etileno, enquanto que os genes *MPG2* e *PMG3* são parcialmente dependentes de etileno.

Até o presente momento, a maioria dos estudos realizados em melões transformados e não transformados avaliaram a expressão de mRNAs de PG, sem ter havido detecção da presença da respectiva proteína. Já é sabido que, em determinadas condições fisiológicas da célula pode ocorrer a não tradução de todos

mRNAs transcritos. Dessa forma, o estudo da expressão gênica se torna limitado, sendo necessária a utilização de técnicas que permitam a detecção da proteína.

Assim, esse trabalho teve por objetivo a realização da clonagem do gene *MPG1*, a expressão em *Escherichia coli* e a purificação da MPG1 recombinante visando à obtenção de anticorpos policlonais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção do fragmento de interesse utilizaram-se oligonucleotídeos selecionados a partir de sequências de melão depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para a seleção dos *primers*, utilizou-se o software *Vector™* (*Invitrogen*). Os oligonucleotídeos foram construídos contendo no *primer forward* o sítio de restrição para enzima *Bam*HI, e para *primer reverse* o sítio de restrição para a enzima *Kpn*I, além do *stop códon* TTA (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação em PCR do gene da *Poligalacturonase* (*MPG1*) com os respectivos sítios de restrição para *Bam*HI e *Kpn*I

Forward	5' TAGGATCCTGGGCTCGTGC 3'
Reverse	3' GATTAACGAATGATATCCCATGGCC 5'

A extração de RNA foi feita utilizando-se o reagente *Trizol™* (*Invitrogen*), segundo recomendações do fabricante. Os RNAs extraídos foram digerido com *DNase I™* (*Invitrogen*). Para construção do cDNA foi utilizado o *kit SuperScript™* (*Invitrogen*). O cDNA foi submetido à técnica de PCR para amplificação do fragmento com utilização do *kit Taq DNA polymerase™* (*Invitrogen*). Após amplificação e purificação o produto foi clonado no vetor *TOPO TA cloning kit™* (*Invitrogen*), o qual foi inserido em células competentes por eletroporação.

A extração de DNA plasmidial das células transformadas foi feita com o *kit GFX Micro Plasmid Prep™* (*GE Healthcare*). O DNA foi clivado com as respectivas enzimas de restrição, e o fragmento liberado foi ligado no vetor de expressão pAE, com o auxílio da enzima *T4 DNA ligase* (*Invitrogen*). Este plasmídeo transformado foi inserido em células competentes de *E. coli*. A seleção de bactérias recombinantes foi feita a partir da extração rápida de DNA com a utilização de fenol clorofórmio álcool isoamílico. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformação de células de expressão *BL21(DE3) pLysS*. As células de expressão contendo os plasmídeos foram induzidas com a adição de IPTG (isopropiltio-b -D-galactosídeo). Em seguida foi realizado o teste de solubilidade das proteínas recombinantes. Para a purificação das proteínas utilizou-se soluções com uréia e imidazole. As proteínas foram submetidas à cromatografia de afinidade pelo sistema de purificação automatizado *Akta-Prime™* (*Amershan Biosciences*), com utilização de coluna '*His Trap™*' (*GE Healthcare*), carregada com níquel.

Após purificação, a proteína recombinante, juntamente com hidróxido de alumínio, foi inoculada em camundongos para produção de anticorpos. As coletas foram feitas a cada vinte e um dias e o soro foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de RNA assim como a amplificação da região do gene *MPG1* foi obtida com sucesso (Figura 1A e 1B). A presença do fragmento codificante da MPG1 no vetor recombinante foi confirmada pela coloração branca (1C) das colônias, pois o vetor utilizado contém o gene *Lac Z* que expressa a β-galactosidase.

Foi adicionado um múltiplo sítio de clonagem no gene da β -galactosidase que visa à identificação dos possíveis recombinantes quando na presença de um substrato cromogênico o *X-gal* (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) ou *Bluogal* (5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactosídeo) e o indutor IPTG. Quando o vetor está intacto (não recombinante, sem o inserto), a enzima é funcional e, frente ao substrato cromogênico, este é clivado produzindo colônias de cor azul. Por outro lado, quando um fragmento de DNA é inserido no múltiplo sitio de clonagem, interrompendo o gene, a expressão da enzima é suprimida, portanto as células são incapazes de metabolizar o substrato cromogênico, formando assim colônias brancas, o que pode ser observado na Figura 1C. O IPTG funciona inativando o repressor do promotor presente no vetor, ou seja, sem o IPTG o repressor está ativo impedindo que a enzima β -galactosidase seja sintetizada. Com o IPTG o repressor é inativado, e a enzima β -galactosidase é sintetizada.

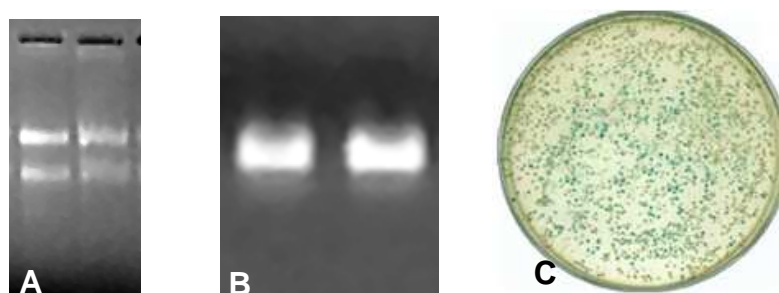


Figura 1. A) RNAs totais; B) amplificação do gene *MPG1*; C) colônias transformadas e D) teste de solubilidade.

O teste de solubilidade indicou que a *MPG1* é uma proteína insolúvel, sendo necessária a adição de uréia durante o processo de purificação. Proteínas recombinantes, na forma insolúvel, formam agregados intracelulares, e isto dificulta sua purificação. Neste trabalho a purificação foi realizada com sucesso (Figura 2A e 2B), obtendo-se bandas protéicas bem definidas com peso molecular previsto (37 KDa).

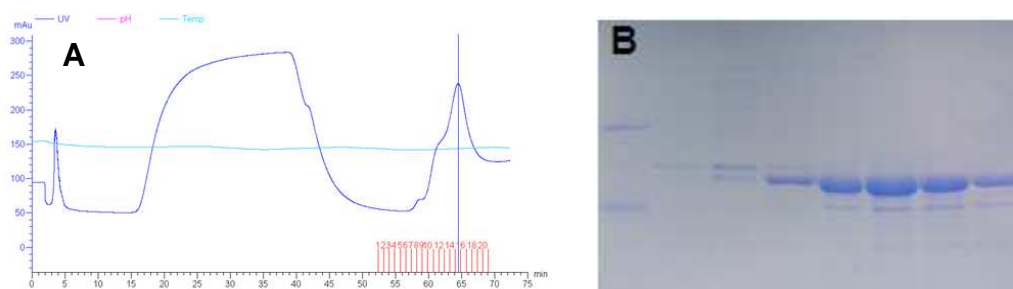


Figura 2. A) Gráfico de purificação da *MPG1* recombinante em Akta-Prime (Amersham Biosciences®); B) Proteína purificada em gel de acrilamida.

Os anticorpos policlonais obtidos foram capazes de detectar a proteína recombinante e a proteína *MPG1* proveniente de extratos de melão, em testes preliminares. (dados não mostrados).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o método empregado para a obtenção da *MPG1* recombinante foi eficaz. Assim, os anticorpos policlonais produzidos contra esta proteína possibilitarão estudos aprofundados do

comportamento da MPG1 em diferentes condições pós-colheita de melões transformados e não transformados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYUB, R., GUIZ, M., BEN-AMOR, M., GILLOT, L., ROUSTAN, J-P., LATCHÉ, A., BOUZAYEN, M., PECH, J-C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. **Nat Biotech**, 14, 862–866, 1996.

SILVA, J. A., DA COSTA, T. S., LUCCHETTA, L., MARINI, L. J., ZANUZO, M. R., NORA, L., NORA, F. R., TWYMAN, R. M., ROMBALDI, C. V. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple. **Postharvest Biol. Technol.**, v.32, 263–268, p. 2004.

NISHIYAMA, K., GUIZ, M., ROSE, J. K. C., KUBO, Y., BENNETT, K. A., WANGJIN, L., KATO, K., USHIJIMA, K., NAKANO, R., INABA, A., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A., PECH, J., BENNETT, A. B. Ethylene regulation of fruits softening and cell wall disassembly in Charentais melon. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 1281-1290, 2007.

SINGH, P.; DWIVED, U. N. Purification and characterization of multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) fruit. **Food Chemistry**, v. 111 p.345-349, 2008.

HADFIEL, K. A., ROSE, J. K. C., YAVER, D. S., BERKA, R. M., BENNETT, A. B., Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 363-373, 1998.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudo de iniciação científica, de mestrado e de doutorado e pelo auxílio à pesquisa. Ao Laboratório de Biologia Molecular do centro de Biotecnologia da UFPel.