

EXPRESSÃO DOS GENES MOSQUITOCIDAS *MTX1* E *MTX2* VISANDO A PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE INSETICIDAS BIOLÓGICOS PARA CONTROLE DE MOSQUITOS

KNABAH, Paula F.¹; ANTUNES, Tatiana², PINTO, Mariana³; LEITE, Fabio⁴; PINTO, Luciano⁴

¹ Bolsista PROBIC Universidade Federal de Pelotas Graduação em Ciências Biológicas; ² Universidade Federal de Pelotas Pós-doutoranda programa de pós graduação de Parasitologia; ³ Universidade Federal de Pelotas Graduação em Ciências Biológicas ⁴Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia.
paulaknabah@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O *Bacillus sphaericus* é uma bactéria patogênica para as larvas de mosquitos e foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma alternativa biológica potencial aos inseticidas químicos nos programas de controle do mosquito (PORTER *et al.*, 1993). Esta bactéria apresenta duas classes de toxinas inseticidas, a Toxina Binária (Bin) e as Toxinas Mosquicidas (Mtx), que são sintetizadas em diferentes fases do desenvolvimento da bactéria. Foram identificados três tipos de toxinas Mtx: a Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31,8 kDa) e Mtx3 (35,8 kDa). A Mtx1 é considerada uma protoxina, processada por proteinases intestinais em fragmentos menores de 27 e 70 kDa (THANABALU *et al.*, 1993). A identificação desta toxina foi realizada a partir da clonagem da cepa SSII-1, sendo que sua expressão ocorre durante a fase vegetativa de crescimento (THANABALU *et al.*, 1991).

Segundo Patridge e Berry (2002), à detecção de atividade larvicida da Mtx1 contra *Aedes aegypti*, é diferente da toxina Bin que atua principalmente contra *Culex quinquefasciatus*.

Pelo fato de serem produzidas durante a fase vegetativa, as toxinas Mtx são degradadas por proteases e pouco contribuem para a toxicidade final de culturas esporuladas do *B. sphaericus* (CHARLES *et al.*, 1996). Entretanto, quando expressas de forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx1 e Mtx2 possuem alta atividade larvicida para culicídeos quando atuam em sinergismo (WEI, *et al.*, 2006; WIRTH *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi isolar e clonar o gene *mtx1* e *mtx2* de *B. sphaericus* em vetores de expressão bacterianos para sua posterior utilização em bioensaios com larvas de mosquitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento do DNA de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*

A metodologia de extração de DNA utilizada seguiu a descrita por BRAVO *et al.*, 1998. As estirpes isoladas previamente de *B. sphaericus* foram cultivadas em meio ágar nutritivo a 30 °C por 16 horas. Uma amostra do cultivo (10 µl) foi ressuspensa em 100 µl de Água MilliQ estéril em um microtubo de 1,5 mL, previamente esterilizado. Em seguida, a amostra foi congelada a -20°C por 1 hora e submetida a 100°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C até sua utilização.

Amplificação por Reação de Polimerase em Cadeia

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L, contendo 300 ng de DNA com Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) utilizando oligo iniciadores específicos.

As condições de amplificação foram ajustadas para cada conjunto de primers utilizados. A amplificação do gene *mtx1* foi realizada usando os iniciadores Mtx1 F 5'-CTGCAGAGCTTCACCTAATTCTCC-3' e MTX1 Rev_5'-CCGGTACCCTATCTAGGTTCTACAC-3'. Os iniciadores foram construídos com sítios de clivagem para as enzimas *Pst*I e *Kpn*I, respectivamente. Já para a amplificação do gene *mtx2* foram utilizados os iniciadores MTX2 F e 5'-GGGGATCCGTTTGTAAACGGAAGTAT-3' e MTX2 R 5'-TAGGTACCTTATTTAAAAGAAATTTCTTTAACATCTATTA 3', com sítios de clivagem para as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente. Os locais de ligação dos iniciadores podem ser observados na figura 1. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

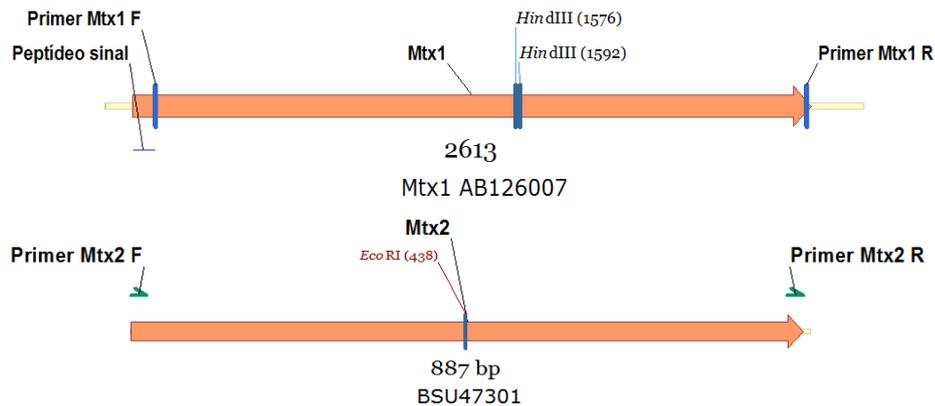


Figura 1: Representação esquemática das sequências dos genes *mtx1* e *mtx2* de *B. sphaericus* e dos sítios de anelamento dos iniciadores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração DNA genômico do *B. sphaericus* foi realizada com sucesso (Fig. 2). A amplificação dos genes *mtx1* e *mtx2* ocorreu com êxito (Fig. 3).

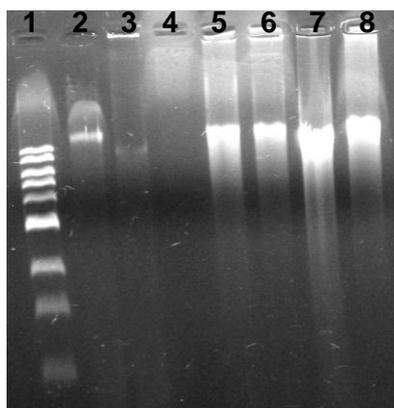


Figura 2: Extração do DNA genômico de *B. Sphaericus*. 1- Marcador 1 kb, 2 ao 8- DNA genômico de *B. Sphaericus*.

Para a amplificação dos genes, o primeiro procedimento de amplificação foi realizada com 30 ciclos a 55 °C, e obtivemos bons resultados com a amplificação da *mtx2*, porém com a *mtx1* não houve amplificação de forma satisfatória. Como mostra a figura 3.

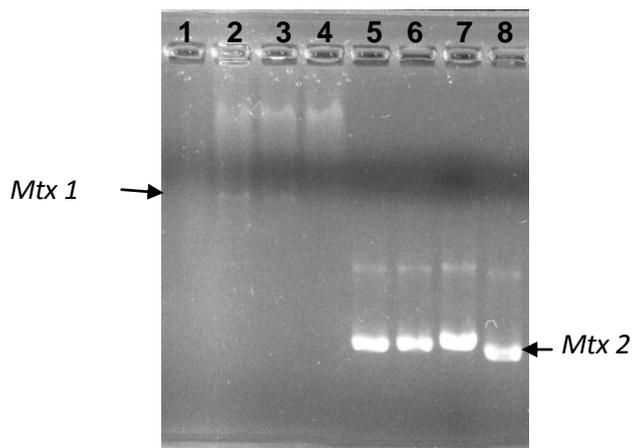


Figura 3: Amplificação dos genes *mtx1* e *mtx2*. 1- Controle negativo da *mtx1*; 2 ao 4- amostras de *mtx1*; 6 ao 8- amostras *mtx2*.

No entanto, uma nova reação com cinco ciclos a 55°C e 25 ciclos a 63°C demonstrou resultados satisfatórios na amplificação do gene *mtx1*, de acordo com a figura 4.

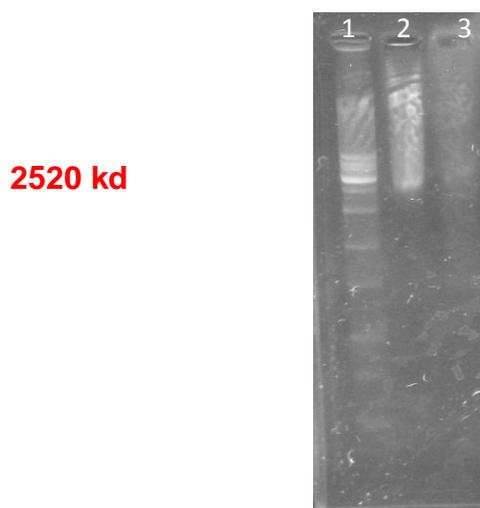


Figura 4: PCR da *mtx1* e *mtx2*. 1- Marcador 1 kb; 2- *mtx1*; 3- *mtx1*;

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as etapas para o isolamento e amplificação do gene *mtx1* e *mtx2* de *B. sphaericus* foram realizadas com sucesso. Verificou-se que o número de ciclos e temperatura da amplificação por PCR das duas toxinas são diferentes. Com os resultados é possível prever a posterior clonagem nos vetores de expressão em bactérias para futuros testes da atividade larvicida dos clones.

Apoio
CAPES, FAPERGS

5 REFERÊNCIAS

CHARLES, J-F.; NIELSEN-LEROUX, C & DELÉCLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action. **Annual Reviews of Entomology**, vol.41, s.n.p. 451-572, 1996.

GARCÊS, S. P. S. and LIMA, A.O. S. Desenho e Validação in silico de Primers Intragenéricos. **II Workshop de Tecn. da Inf. Aplicada ao Meio Ambiente – CBComp**, 2004.

PORTER, A.G.; DAVIDSON, E.W. & LIU, J.W. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiology Reviews**, vol. 57, n.4, p. 838-861, 1993.

THANABALU, T.; BERRY, C. & HINDLEY, J. Cytotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27- and 70-kilodalton peptides. **The Journal of Biotechnology**, vol.175, n.8, p. 2314-2320, 1993.

WEI, S.; CAI, Q.; YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.