



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**TRANSFORMAÇÃO DE *Nicotiana tabacum* L. VIA
Agrobacterium tumefaciens VISANDO À
PRODUÇÃO DE UMA VACINA
RECOMBINANTE CONTRA A PNEUMONIA
MICOPLÁSMICA SUÍNA**

Marina Borges Osorio

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Campus Universitário s/nº
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil

2007

Marina Borges Osorio

Transformação de *Nicotiana tabacum* L. via *Agrobacterium tumefaciens* visando à produção de uma vacina recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína

Monografia apresentada como um dos requisitos ao grau de Bacharel em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

ORIENTADORA:
PROF^a. Andréa da Silva Ramos Rocha
CO-ORIENTADOR:
PROF. Odir Antônio Dellagostin

Pelotas

Estado do Rio Grande do Sul – Brasil
Agosto de 2007.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres: Andréa, Luciano, Fabrício, prof. Peters e prof. Odir, pela atenção, orientação, sabedoria, amizade e paciência: sem vocês o desenvolvimento deste projeto não seria possível.

A todos os professores que facilitaram o desenvolvimento das minhas atividades no laboratório, por seus ensinamentos valiosos e assistência prestada.

A todos os amigos e colegas do Centro de Biotecnologia, do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela colaboração e por tornarem muito prazerosa a convivência por todo estes anos.

Aos meus queridos colegas da Biologia, que passaram comigo por milhares de experiências ao longo do curso, estas que nem sempre foram boas, mas que com certeza deixarão saudades... Obrigada por me “aturarem” por todo este tempo!

Finalmente, a Deus, por ter me dado extrema paciência para escrever um trabalho como este...

Muito Obrigada!

RESUMO

OSORIO, Marina Borges. Universidade Federal de Pelotas. **Transformação de *Nicotiana tabacum* L. via *Agrobacterium tumefaciens* visando à produção de uma vacina recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína. 2007. 47p. Monografia.**

Orientador: MSc. Andréa da Silva Ramos Rocha. Universidade Federal de Pelotas.

A utilização de plantas como biorreatoras para a produção de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico é, atualmente, alvo de muitas pesquisas, por apresentar diversas vantagens quando comparada a outros sistemas de produção. Através de técnicas de engenharia genética aliadas à cultura de tecidos vegetal, proteínas de grande importância podem ser produzidas em plantas, incluindo vacinas recombinantes. Estas são apontadas como uma alternativa viável no controle de várias doenças que dependem da utilização de bacterinas — que possuem elevado custo de produção e eficiência limitada. É o que ocorre com a pneumonia micoplásmica suína (PMS), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, uma das principais doenças de suínos que causa elevadas perdas econômicas em todo mundo, e tem, na tecnologia do DNA recombinante, uma alternativa de desenvolvimento de vacinas mais efetivas. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo a transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. via *Agrobacterium tumefaciens*, visando sua utilização como biorreatora na produção de uma vacina recombinante contra a PMS, composta pela região R1 da adesina P97 de *M. hyopneumoniae* fusionada à subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB-R1). A construção pGA643/*ltb-r1*, clonada em *E. coli*, foi transferida à linhagem desarmada de *A. tumefaciens* LBA4404 por eletroporação. Colônias recombinantes foram então co-cultivadas com entrenós de plântulas de *N. tabacum* var. K326 germinadas *in vitro*, ocorrendo desta maneira, a transferência do gene de interesse (*ltb-r1*) ao genoma vegetal. Uma vez transformados, os explantes vegetais foram transferidos para meios de indução de calos, regeneração de brotos, alongamento e enraizamento. O DNA transferido à planta possui também o gene *nptII*, conferindo aos transformantes resistência a canamicina, que foi utilizada em todas as etapas do cultivo *in vitro*, a 30 mg.L⁻¹, para inibir o crescimento de células não-transformadas. O DNA genômico dessas plantas foi extraído e submetido à PCR, na qual foi possível amplificar o gene *ltb-r1*. A detecção da transcrição deste gene foi realizada por RT-PCR. O nível de expressão da proteína recombinante foi verificado por Western Blot, no qual foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CT (para LTB) e F1B6 (para R1).

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum* L., pneumonia micoplásmica suína, transformação genética vegetal, vacinas recombinantes.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus celcius
µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
µmol: micromol
cDNA: DNA complementar
cm: centímetros
CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotídeos tri-fosfato
D.O.: densidade óptica
Ig: imunoglobulina
h: hora
Hg: mercúrio
kb: quilo bases
kDa: quilo Dalton
kg: quilogramas
LB: caldo de Luria Bertani
M: molar
mg: miligrama
min: minutos
mL: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
mRNA: RNA mensageiro
MS: Murashige & Skoog
ng: nanograma
pb: pares de bases
PBS: Tampão Fosfato Salina
PBS-T: Tampão Fosfato Salina-Tween
RNA: ácido ribonucléico
rpm: rotações por minuto
rRNA: RNA ribossômico
s: segundo
TBE: tampão tris-borato-EDTA
tRNA: RNA transportador
SDS: dodecil sulfato de sódio
TE: Tris-EDTA
UV: luz ultravioleta
YEB: “Yeast Extract Broth”
V: volts
var.: variedade
v/v: volume por volume
X: vezes

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Gel de agarose 0,8%. Extração de DNA plasmidial de clones recombinantes de *E. coli* Top10F.....26
- FIGURA 2.** Gel de agarose 0,8%. Amplificação do gene *ltb-r1* por PCR a partir da extração plasmidial.....27
- FIGURA 3.** Desenho esquemático da molécula recombinante pGA643/*ltb-r1*, gerado pelo software Vector NTI 8.0 Advance.....27
- FIGURA 4.** Gel de agarose 0,8%. Triagem das colônias recombinantes de *A. tumefaciens* por PCR de colônia.....28
- FIGURA 5.** Teste de susceptibilidade de entrenós de *N. tabacum* a diferentes concentrações de canamicina, após 20 dias de cultivo.....29
- FIGURA 6.** Regeneração de entrenós de *N. tabacum* após transformação via *A. tumefaciens*.....29
- FIGURA 7.** Aclimação em casa de vegetação de plântulas de *N. tabacum* var K326 contendo o gene *ltb-r1*.....30
- FIGURA 8.** Gel de agarose 0,8 %. Quantificação por intensidade de bandas da extração de DNA total de folhas de *N. tabacum*.....31
- FIGURA 9.** Gel de agarose 0,8%. Amplificação do gene *ltb-r1* por PCR a partir da extração de DNA de *N. tabacum*.....31
- FIGURA 10.** Gel de agarose 0,8%. Amostras de DNA genômico de *N. tabacum* após digestão.....32
- FIGURA 11.** Gel de agarose 0,8%. Quantificação por intensidade de bandas de *ltb-r1* purificada.....32
- FIGURA 12.** Gel de agarose 1%. Quantificação da extração de RNA de folhas de *N. tabacum*.....33
- FIGURA 13.** Gel de agarose 1%. Amplificação de transcritos por RT-PCR.....34
- FIGURA 14.** Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se apenas anti-CT.....34
- FIGURA 15.** Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se apenas anti-CT.....35
- FIGURA 16.** Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se anti-CT e F1B6.....36
- FIGURA 17.** Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se anti-CT e F1B6.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da PCR.....	11
Tabela 2. Programa para amplificação de <i>Itb-r1</i>	11
Tabela 3. Programa para amplificação da região do 18S.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	9
2.1 Geral	9
2.2 Específicos.....	9
3. METODOLOGIA.....	10
3.1 Obtenção da construção pGA643/ <i>ltb-r1</i>	10
3.1.1 Triagem dos clones recombinantes em <i>E. coli</i> Top10F	10
3.1.2 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> Top10F recombinante.....	11
3.1.3 PCR para confirmação da presença de <i>ltb-r1</i> no vetor.....	12
3.1.4 Digestão dos vetores recombinantes.....	12
3.2 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 com pGA643/ <i>ltb-r1</i>	12
3.2.1 Preparo de células competentes	12
3.2.2 Eletroporação	13
3.2.4 Conservação de <i>A. tumefaciens</i> transformado em glicerol.....	14
3.3 Cultivo e transformação de <i>N. tabacum</i>	14
3.3.1 Germinação de <i>N. tabacum</i>	14
3.3.2 Meio de cultivo específico para alongamento de entrenós.....	14
3.3.3 Verificação da resistência de <i>N. tabacum</i> ao antibiótico de seleção (canamicina).....	15
3.3.4 Protocolo de transformação de <i>N. tabacum</i> via <i>A. tumefaciens</i>	15
3.3.4.1 Co-cultivo	15
3.3.4.2 Indução de calos	16
3.3.4.3 Regeneração de brotos.....	16
3.3.4.4 Alongamento e enraizamento	16
3.3.4.5 Aclimatação em casa de vegetação.....	17
3.4 Técnicas para a detecção da transformação de <i>N. tabacum</i>	17
3.4.1 Extração de DNA total de folhas (método CTAB).....	17
3.4.2 Quantificação por eletroforese do DNA extraído	18
3.4.3 PCR para confirmação da transformação.....	18
3.4.4 Southern blot	18
3.4.4.1 Separação dos fragmentos de DNA.....	18
3.4.4.2 Transferência para a membrana de nitrocelulose	19
3.4.4.3 Preparação da sonda	20
3.4.4.4 Hibridização	20
3.4.4.5 Detecção quimioluminescente	20
3.4.5 Extração de RNA total de tecidos vegetais.....	20
3.4.6 Quantificação do RNA por espectrofotometria e eletroforese.....	21
3.4.7 Produção do cDNA a partir do RNA extraído.....	22
3.4.8 RT-PCR para detectar a transcrição do gene <i>ltb-r1</i>	22
3.4.9 Extração de proteínas.....	23
3.4.9.1 Concentração de proteínas por liofilização	24
3.4.9.2 Quantificação da extração de proteínas por espectrofotometria ..	24
3.4.10 Western blot.....	24
3.4.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page).....	24
3.4.10.2 Transferência para a membrana de nitrocelulose	25
3.4.10.3 Detecção imunológica	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Obtenção da construção pGA643/ <i>ltb-r1</i>	26
4.2 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com pGA643/ <i>ltb-r1</i>	27

4.3 Transformação de <i>N. tabacum</i> via <i>A. tumefaciens</i>	28
4.4 Técnicas para a detecção da transformação de <i>N. tabacum</i> (<i>ltb-r1</i>).....	30
4.4.1 DNA	30
4.4.2 RNA	33
4.4.3 Proteínas	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A pneumonia enzoótica ou pneumonia micoplásmica suína (PMS), causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma das principais doenças de suínos. Esta doença acomete animais de todas as idades, sendo a infecção freqüente em todas as regiões do mundo onde a suinocultura é desenvolvida, causando elevadas perdas econômicas. Esta bactéria adere-se aos cílios do epitélio respiratório provocando a sua destruição, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções secundárias. Zhang et al. (1995) identificaram e caracterizaram uma adesina de *M. hyopneumoniae* responsável pela ligação a receptores presentes nos cílios das células epiteliais da traquéia, brônquios e bronquíolos dos suínos. Esta adesina foi designada P97 e é um dos antígenos imunodominantes de *M. hyopneumoniae*. O gene que codifica a adesina P97 já foi clonado e seqüenciado (Hsu, et al., 1997). A P97 contém duas regiões repetitivas semelhantes dentro da porção C-terminal da seqüência de aminoácidos, designadas R1 e R2 (Jenkins, et al., 2006). A região R1 da adesina P97 é responsável pela aderência ao cílio, é composta por uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos (AAKPV/E) altamente imunogênica (Hsu e Minion, 1996, Hsu et al., 1997; Conceição et al., 2006). Anticorpos monoclonais (MAbs) F1B6 e F2G5 reconheceram a P97 em um immunoblotting e também bloquearam a aderência do *M. hyopneumoniae* a células ciliadas *in vitro*, o que indica que esta adesina possui papel fundamental na patogenia da PMS, tornando-a uma forte candidata a ser utilizada na produção de vacinas (Minion et al, 2000; Jenkins et al., 2006).

A vacinação parece ser a forma mais efetiva para controlar a PMS (Kavanagh, 1994), o que está gerando uma busca incessante por apresentações de vacinas mais potentes e menos dispendiosas do que as bacterinas hoje existentes, pois estas apenas têm demonstrado reduzir os sintomas clínicos e as lesões pulmonares associadas com a infecção pelo *M. hyopneumoniae* (Jensen et al., 2002), mas a proteção é freqüentemente incompleta, pois este tipo de vacina não impede a colonização nem o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que são praticamente incapazes de estimular uma adequada imunidade de mucosa, caracterizada pela produção de IgA secretora (IgAs) (Moreau et al., 2004). Neste sentido a tecnologia do DNA recombinante utilizando plantas como biorreatoras parece ser uma alternativa viável: a proteína de interesse é expressa no vetor

vegetal, podendo ser purificada e utilizada como vacina, ou então administrada por via oral, sem a necessidade de purificação. Porém, proteínas recombinantes não são suficientemente imunogênicas a ponto de conferir uma imunidade protetora, tornando-se indispensável à utilização de adjuvantes imunológicos. Dentre eles, a subunidade B da enterotoxina termolábel de *Escherichia coli* (LTB), tem sido amplamente utilizada como adjuvante da imunidade de mucosa. A LTB consiste de cinco peptídeos idênticos (pentâmero), cada monômero possui um domínio que apresenta alta afinidade pelo gangliosídeo GM1, um receptor de membrana presente em todas as células de mamíferos nucleadas e em maior quantidade nas células epiteliais das mucosas (Chikwamba et al., 2002). A atividade adjuvante da LTB parece estar relacionada com a capacidade de ligação ao GM1. Desse modo, a LTB recombinante, fusionada com antígenos heterólogos através de fusão genética ou conjugação química, pode representar uma nova alternativa no desenvolvimento de vacinas para combater patógenos que invadem o hospedeiro através das mucosas provocando uma imunidade protetora (Conceição et al., 2006).

Nos últimos anos a LTB já foi produzida e purificada a partir de várias espécies vegetais, como tabaco (Sala et al., 2003), milho (Tacket et al., 2004), batata (Streatfield, 2006) e alface (Kim et al., 2007), a após administração parenteral estimulou uma forte resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados (Verweij et al., 1998).

Sob esta perspectiva, Conceição et al. (2006) produziu em *E. coli* e purificou a LTB-R1 recombinante, que ao ser testada em camundongos via parenteral e nasal, induziu altos níveis de anticorpos sistêmicos e de mucosa (IgA) anti R1, que reconheceram a P97, sugerindo que esta estratégia possui grande potencial no desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína.

A transformação genética de plantas deixou de ser uma promessa e hoje é uma realidade. Desde os primeiros experimentos realizados na década de 70 até os dias atuais, centros de pesquisa públicos e privados têm desenvolvido inúmeras pesquisas nessa área, tanto que novas tecnologias e aplicações têm surgido em ritmo acelerado.

A “primeira geração” de plantas transformadas geneticamente visava basicamente interesses agrônômicos, deste modo surgiram plantas resistentes a pragas e a herbicidas utilizados nas lavouras. Esta tecnologia, apesar de ainda

controversa (tanto para a população em geral, quanto para a própria comunidade científica) já está sendo comercializada e cultivada em lavouras, inclusive brasileiras. Já o foco da “segunda geração” de plantas geneticamente modificadas é seu valor nutricional: tomates com maior teor de licopeno e arroz com altos níveis de vitamina A, são exemplos cujas aplicações abrangem desde propriedades farmacológicas (licopeno na prevenção do câncer, por exemplo) até o combate à desnutrição em países subdesenvolvidos (BASF, 2000; Serageldin e Persley, 2000; Silveira et al., 2004).

Finalmente, na metade da década de 80 estudos começaram a ser realizados com o que se denominou de “terceira geração” de plantas geneticamente modificadas. O foco voltou-se à produção de proteínas heterólogas em plantas, mais especificamente as de interesse farmacêutico. A primeira proteína de interesse farmacêutico produzida em plantas foi o hormônio do crescimento humano, expresso em tabaco transgênico em 1986 (Barta et al., 1986). Desde então, pesquisas realizadas mostram que uma gama enorme de proteínas com alto valor econômico pode ser expressa eficientemente em plantas, como proteínas do plasma, fatores de crescimento humanos, imunoglobulinas (até mesmo relativamente complexas, como moléculas de IgA secretória) e antígenos (como o HBsAg, LTB, glicoproteína do vírus da raiva e proteína do capsídeo do vírus Norwalk), todos estes induzindo a produção de IgG soro específico e IgA de mucosa (se administrados via oral), quando testados em animais (Koprowski e Yusibov, 2001; Ma et al., 2003).

São inúmeras as vantagens apresentadas pela utilização de plantas como biorreatoras na produção de proteínas de importância farmacêutica, quando comparada a outros sistemas de produção (fermentação microbiana; culturas celulares de insetos e mamíferos; animais transgênicos), que vêm sendo responsáveis pelo grande interesse e alto desenvolvimento tecnológico na área. Dentre elas, pode-se citar: a impossibilidade de contaminação por patógenos de mamíferos; a relativa facilidade de manipulação genética vegetal (em comparação à animal); a presença da maquinaria de modificações pós-traducionais (possibilitando a glicosilação e a formação de complexos protéicos associados, por exemplo), a qual não ocorre em células bacterianas; a economia e a facilidade da produção em larga escala (Koprowski e Yusibov, 2001; Ma et al., 2003; Schillberg et al., 2005). Além disso, as plantas podem servir com um veículo ideal para a administração oral

de antígenos, esta que pode ser realizada *in natura* ou mediante processamento (farinhas, rações). Desse modo, torna-se desnecessária a purificação da proteína, utilização de agulhas e seringas e conservação sob baixas temperaturas, tornando o processo de vacinação mais prático e barato (Streatfield et al., 2006). Além do mais, as células vegetais são envoltas por uma parede celular espessa, constituída principalmente por celulose, que protege o antígeno da degradação no trato gastrointestinal, o que garante que a administração oral possa ser utilizada (Koprowski e Yusibov, 2001).

A inserção de DNA exógeno nas espécies vegetais pode ser feita de várias maneiras, tanto por métodos diretos (biobalística, eletroporação de protoplastos) quanto por métodos indiretos (via *Agrobacterium tumefaciens* ou vetores virais). (Brasileiro et al., 1998). Cada método possui vantagens e desvantagens, e a escolha depende de uma combinação de fatores, incluindo a espécie vegetal a ser utilizada (Ma et al, 2003).

A biologia e a biotecnologia de *A. tumefaciens* tem sido o foco de inúmeros estudos nas últimas décadas, resultando no estabelecimento de muitas cepas, plasmídios e protocolos adaptados unicamente para a transformação genética de várias espécies vegetais (Tzfira e Citovsky, 2006). Desse modo, a alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional e a simplicidade dos protocolos, tornam o sistema via *A. tumefaciens* o mais utilizado (Brasileiro et al., 1998; Andrade et al., 2003). Além disso, estudos apontam este sistema como mais efetivo quando comparado à biobalística, pois proporciona poucos rearranjos gênicos, menor instabilidade através de gerações e um padrão de integração de poucas cópias (geralmente cópia única) do gene de interesse ao DNA vegetal. Este fator diminui a probabilidade de silenciamento gênico, que é freqüente no processo de biobalística, onde geralmente várias cópias gênicas são integradas ao genoma vegetal (Travella et al., 2005).

O gênero *Agrobacterium* é constituído de um grupo de microrganismos tipicamente do solo, aeróbios, gram-negativos e fitopatogênicos. A espécie *A. tumefaciens* é encontrada normalmente em estreita associação com raízes de plantas, sendo o agente etiológico da galha-da-coroa (“crown gall”) (Brasileiro et al., 1998). A formação de galhas induzidas por *A. tumefaciens* está diretamente associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado plasmídio Ti (“tumor inducing”), presente somente em linhagens

patogênicas de *Agrobacterium*, em baixo número de cópias, podendo ser transferido via conjugação à outras bactérias. Desse modo, a indução da galha é resultante de um processo natural de transferência de genes do plasmídeo Ti para o genoma da planta infectada, sendo identificadas duas regiões no plasmídeo envolvidas diretamente no processo de indução tumoral: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal (T-DNA), e a região de virulência (região *vir*), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência da região-T. No genoma vegetal, os genes presentes no T-DNA passam então a ser expressos, codificando enzimas envolvidas na via de biossíntese de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas). A expressão desses genes interfere no balanço hormonal das células transformadas, resultando na sua multiplicação descontrolada, levando assim à formação de um tumor (galha). Além disso, no T-DNA também são expressos genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são derivados de aminoácidos utilizados pela bactéria como fonte de energia, carbono e nitrogênio, sendo formado, dessa maneira, um nicho extremamente favorável à sobrevivência da bactéria (Brasileiro et al., 1998; Andrade et al., 2003; Tzfira e Citovsky, 2006).

Cepas de *A. tumefaciens* transformadas, nas quais o T-DNA nativo foi substituído por genes de interesse, são utilizadas para a produção de espécies de plantas transgênicas (Tzfira e Citovsky, 2006). Para isso, primeiramente é necessária a obtenção de uma linhagem desarmada da bactéria — como LBA4404 (Silva, 2005), EHA105 (Chaudhury et al., 2007), AGL1 (Leelavathi et al., 2004), GV2260 (Banerjee et al., 2006) e MOG101 (Brasileiro et al., 1998), na qual os genes presentes no T-DNA são deletados, com exceção de suas extremidades direita e esquerda (indispensáveis à transferência, juntamente com a região *vir*). A seguir, é necessária a preparação de um vetor binário (capaz de se replicar tanto em *E. coli* quanto em *A. tumefaciens*, e de se manter de forma independente do plasmídeo Ti). Plasmídios menores são geralmente utilizados para esta função, os quais deverão conter as extremidades do T-DNA, uma região de múltiplos sítios de clonagem — “polilinker” — na qual serão inseridos os genes de interesse, além de uma origem de replicação apropriada, um promotor constitutivo em planta, e um gene para seleção — em bactéria e em planta — geralmente de resistência a antibiótico. Uma vez obtido, o vetor deve ser transferido para a linhagem desarmada

de *Agrobacterium*, podendo a transferência ser realizada por conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico (Brasileiro et al., 1998).

Após a inserção do vetor binário contendo genes de interesse em *A. tumefaciens*, a transformação genética da planta pode ser finalmente realizada. O método de co-cultivo *in vitro* de explantes vegetais com *A. tumefaciens* é o mais utilizado atualmente e resulta na integração estável do transgene no genoma vegetal (Gleba et al., 2005). Apesar das várias adaptações, os diversos protocolos já descritos baseiam-se essencialmente no método de co-cultivo de discos foliares de tabaco, descrito por Horsch et al., em 1985 (Brasileiro et al., 1998). Entretanto, a busca por métodos inovadores de transformação segue, dentre eles pode-se citar a “agro-infiltração” (Twyman et al., 2005) e a “magninfection” (Gleba et al., 2005), ambos mediados por *A. tumefaciens* e resultando na integração transiente do transgene no genoma vegetal. O método de co-cultivo consiste basicamente no cultivo de explantes vegetais (mantidos *in vitro*, sob condições assépticas) com a linhagem desarmada de *A. tumefaciens* portadora do gene de interesse. É muito importante que, com a ajuda de um bisturi, ferimentos sejam feitos nos explantes, antes ou durante o contato com a bactéria, pois as células feridas liberarão moléculas-sinal, que induzirão os genes da região *vir* de *Agrobacterium*, essenciais à transferência do DNA de interesse ao genoma vegetal. Após o período de co-cultivo, é necessário que um protocolo adequado de regeneração e cultura de tecidos seja estabelecido, uma vez que a transformação genética vegetal se baseia na capacidade das células vegetais se regenerarem formando uma nova planta (totipotência). Dessa forma, os explantes devem ser transferidos para meio de cultura apropriado à regeneração, contendo reguladores de crescimento e antibióticos, necessários à eliminação da bactéria (que se torna indesejável após a transferência genética). Além disso, normalmente utiliza-se um antibiótico para a seleção dos transformantes, sendo este responsável pela inibição da multiplicação das células vegetais não-transformadas. A resistência das células transformadas ao antibiótico de seleção ocorre porque, juntamente com o gene de interesse, um gene marcador de seleção também é transferido à planta. O gene marcador de seleção mais utilizado é o *nptII*, responsável pela produção da enzima neomicina fosfotransferase II (NPT II), que ao atuar confere resistência a doses letais de antibióticos aminoglicosilados, como a canamicina. Após algumas semanas, brotos regenerados, sem contaminação e resistentes ao antibiótico de seleção são

transferidos para meio de cultura apropriado ao seu desenvolvimento e enraizamento. Uma vez enraizados, os brotos podem ser aclimatados em casa de vegetação (Brasileiro et al., 1998).

Diversos fatores influem na eficiência do processo de transformação, por isso adaptações devem ser realizadas a fim de se obter um protocolo eficiente de acordo com as condições de cada estudo. Entre estes fatores, pode-se destacar: espécies e cultivares da planta escolhida; tipos de explantes — fragmentos foliares, entrenós, cotilédones, segmentos de caules ou raízes, entre outros; condições ambientais — temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa; utilização de processos que aumentem a infecção — pré-incubação, incubação com acetoseringona, reguladores de crescimento, etc.; tempo e condições do co-cultivo — horas/dias, luz/escuro, meio líquido/sólido e variações na temperatura; escolha dos antibióticos descontaminantes, sua efetividade contra a bactéria e seu nível de toxicidade contra a planta; escolha do antibiótico de seleção e determinação de sua dose mínima letal às células vegetais (Lin et al., 1995; Nauerby, 1997; Willy et al., 1997; Brasileiro et al., 1998; Sunilkumar et al., 1999; Barbosa, 2002; Silva et al., 2003; Ogawa e Mii, 2007; Shrawat et al., 2007).

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), espécie vegetal pertencente à família Solanaceae, possui um histórico estabelecido como planta-modelo para a transformação genética vegetal, e é a espécie mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico nas pesquisas em laboratório. Na maioria dos casos, as proteínas produzidas pela utilização de tabaco como biorreator são extraídas dos tecidos foliares. As maiores vantagens do tabaco incluem sua alta taxa de regeneração *in vitro*, seu genoma relativamente pequeno (o que facilita as manipulações moleculares), a tecnologia madura de transferência e expressão gênica, o alto rendimento de biomassa (mais de 100.000 kg por hectare), o potencial de produção rápida em larga-escala devido ao ciclo curto e à grande produção de sementes, e a disponibilidade de infra-estrutura para o processamento em larga-escala (Brasileiro et al., 1998; Ma et al., 2003; Twyman et al., 2005; Dung et al., 2006; Rommens, 2006).

A fim de se comprovar a integração e a expressão dos genes exógenos no genoma da planta, técnicas de análise molecular devem ser realizadas, como PCR (Polymerase Chain Reaction) e Southern Blot, em nível de DNA; RT-PCR (Reverse

Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) e Northern blot, em nível de RNA; e SDS - Page e Western blot em nível protéico.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Transformar *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*, visando à produção de uma vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína.

2.2 ESPECÍFICOS

- Transformar *A. tumefaciens* com o vetor de expressão em planta pGA643/l**tb**-r1, previamente clonado em *E. coli*.
- Transformar *N. tabacum* via *A. tumefaciens*, visando à utilização de plantas na produção de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico.
- Através de análises moleculares, verificar a integração do gene *l**tb**-r1* ao genoma vegetal, detectar sua transcrição e verificar a expressão da proteína recombinante produzida na planta.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção da construção pGA643/*ltb-r1*

O DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448, isolado de suíno com PMS, foi gentilmente cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA). O DNA genômico da cepa de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), isolada de suíno com diarreia, foi obtido no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

A região R1 do gene P97 e a subunidade B da toxina termolábel de ETEC foram amplificadas por PCR. Os primers para LTB e R1 foram desenhados baseados nas seqüências depositadas no GenBank™, cujos números de acesso são M17873 e U50901, respectivamente. Nos primers LTB “reverse” e R1 “forward” foi criado um sítio de restrição para *Bam*HI para manter a fase correta de leitura durante o processo de fusão da região 3’ final da LTB com a região 5’ inicial do R1. Para realizar a fusão os produtos de PCR foram purificados diretamente do gel de agarose usando o kit GFX Gel Band Purification™ (Amershan Biosciences), digeridos com *Bam*HI e ligados com T4 DNA ligase, resultando no híbrido *ltb-r1*. No primer LTB “forward” foi inserido um sítio de restrição para *Xba*I e no R1 “reverse” um para *Bgl*II. O vetor binário pGA643 e o gene híbrido *ltb-r1* foram digeridos com *Xba*I e *Bgl*II; após a digestão procedeu-se a ligação do inserto ao vetor de expressão em planta utilizando a enzima T4 DNA ligase, resultando na molécula recombinante pGA643/*ltb-r1*. Células competentes de *E. coli* TOP10F foram transformadas por eletroporação com o produto da ligação e os clones foram selecionados em meio LB contendo 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e 5 µg.mL⁻¹ de tetraciclina. O plasmídeo pGA643/*ltb-r1* foi caracterizado por PCR e seqüenciamento de DNA.

3.1.1 Triagem dos clones recombinantes em *E. coli* Top10F

Colônias isoladas que cresceram no meio de seleção foram submetidas à técnica de PCR de colônia: esta é uma técnica para detecção rápida de recombinantes, que pode ser aplicada a bactérias ou leveduras (Ward et al., 1992; Tsuchizaki et al., 2000). Com uma ponteira estéril, foram transferidas amostras de colônias isoladas diretamente ao “mix” da PCR, sem necessidade de purificação do DNA molde. Os componentes de cada reação, excetuando-se o DNA molde, foram

combinados como mostra a Tabela 1 com volume final de 25 μL . As amostras foram submetidas ao programa descrito na Tabela 2. Após, 10 μL do produto de cada reação, juntamente com 2 μL de tampão de amostra 6x foram aplicados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo a 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 0,5X a 130V por aproximadamente 40 minutos. A seguir, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV.

Tabela 1. Componentes da PCR.

COMPONENTES	Quantidade
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,25 μL
dNTPs (10mM)	0,75 μL
MgCl ₂	0,75 μL
Tampão de enzima 1X	2,5 μL
“primers” (300ng/ μL)	1 μL de cada
DNA molde	1 μL
Água Milli-Q	17,75 μL

Tabela 2. Programa para amplificação de *ltb-r1*.

Processo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95° C	3 min	1
Desnaturação	95° C	45 s	30
Anelamento	57° C	45 s	30
Extensão	72° C	1 min	30
Extensão final	72° C	5 min	1

3.1.2 Extração de DNA plasmidial de *E. coli* Top10F recombinante

Cepas de *E.coli* Top10F recombinantes (contendo a construção pGA643/*ltb-r1*) foram cultivadas overnight a 37°C sob agitação de 150 rpm em 10 ml de meio LB líquido contendo os antibióticos de seleção, canamicina (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e tetraciclina (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Uma alíquota de 1,5 mL foi retirada e submetida à extração de DNA plasmidial, realizada seguindo as instruções do GFX *Micro* Plasmid Prep Kit™ (Amersham Biosciences).

3.1.3 PCR para confirmação da presença de *ltb-r1* no vetor

O produto da extração de DNA plasmidial de *E.coli* foi a seguir, submetido à técnica de PCR para amplificação da seqüência de *ltb-r1*. Para isso, os primers “forward” LTBR1/Tab-F (5' GAGTCTAGATCCATGGCTCCCCAG 3') e “reverse” LTBR1/Tab-R (5' GGAAGATCTTCAATGGTGATGGTG 3') foram utilizados. Os componentes de cada reação foram combinados como mostra a Tabela 1, com volume final de 25 µL por reação. As amostras foram submetidas ao programa descrito na Tabela 2. A seguir, realizou-se análise em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese.

3.1.4 Digestão dos vetores recombinantes

A fim de se confirmar a ligação correta do inserto no plasmídio, 6µl do produto da extração de DNA plasmidial foi digerido por 1 hora em banho-maria a 37°C com as enzimas de restrição que liberam o inserto: *Xba*I (0,5µL) e *Bgl*II (0,5µL), numa reação final de 20µL. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese.

3.2 Transformação de *A. tumefaciens* LBA4404 com pGA643/*ltb-r1*

A inserção de pGA643/*ltb-r1* em *A. tumefaciens* foi realizada por técnica de eletroporação, segundo protocolo presente em Brasileiro et al., 1998, descrito a seguir:

3.2.1 Preparo de células competentes

- Células de uma linhagem de *A. tumefaciens* desarmada (LBA4404) foram previamente cultivadas overnight em estufa a 28°C, em meio YEB sólido contendo o antibiótico rifampicina a 50 µg.mL⁻¹, utilizado para a seleção.
- Uma colônia isolada desse cultivo foi então transferida para 3 mL de meio YEB líquido com rifampicina e incubada por 36 horas (D.O. ₆₀₀ entre 0,5 e 1), a 28°C com agitação de 150 rpm; a cultura foi então dividida em dois tubos de microcentrifuga (1,5 mL cada) e centrifugada a 12.000 rpm, por 1 minuto.
- O meio de cultura foi descartado e as células ressuspendidas delicadamente em 0,5 mL de HEPES/KOH 1 mM, mantido a 4°C, sendo logo após centrifugadas a

12.000 rpm por 1 minuto. A fim de retirar o máximo de impurezas (restos de meio de cultura, restos celulares), esta etapa foi repetida duas vezes.

- As células foram então ressuspensas delicadamente em 0,5 mL de glicerol 10% mantido a 4°C; e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram mais uma vez ressuspensas em glicerol 10% a 4°C, dessa vez em volume menor (20 µL em cada tubo), sendo o conteúdo dos dois tubos misturado (total de 40 µL), armazenando-se a -20°C.

3.2.2 Eletroporação

- Adicionou-se aproximadamente 1 µg do DNA plasmidial purificado à suspensão de células competentes e incubou-se o tubo no gelo por 2 minutos.
- Em seguida, a suspensão (40 µL) foi transferida para uma cuveta de eletroporação, mantida em gelo. A cuveta foi posicionada no eletroporador (BioRad Gene Pulser II) e o pulso elétrico (400 Ω a 2,5 kV) foi aplicado.
- Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio SOC, sendo a suspensão transferida para um tubo de microcentrífuga e incubada a 28°C, por 4 horas.

Após o processo, as células de *A. tumefaciens* submetidas à eletroporação foram cultivadas por 48 horas em estufa a 28°C, em meio YEB sólido com os antibióticos adequados à seleção: 50 µg.mL⁻¹ de rifampicina (resistência cromossomal), 50 µg.mL⁻¹ de canamicina (resistência no T-DNA) e 2,5 µg.mL⁻¹ de tetraciclina (resistência no plasmídeo).

3.2.3 PCR de colônia

A fim de se fazer uma triagem dos transformantes, colônias isoladas de *A. tumefaciens* que cresceram em meio YEB seletivo foram submetidas à PCR de colônia. Os componentes de cada reação, excetuando-se o DNA molde, foram combinados como mostra a Tabela 1, com volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas ao programa descrito na Tabela 2. A seguir, realizou-se análise em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese.

3.2.4 Conservação de *A. tumefaciens* transformado em glicerol

Colônias que apresentaram resultado positivo na PCR de colônia foram cultivadas por 36 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm, em meio YEB líquido com os antibióticos de seleção. Logo após, a 1 mL de cada colônia foram adicionados 350 µL de glicerol 80%, resultando em concentração final de 20% de glicerol para conservação dos transformantes a -20°C.

3.3 Cultivo e transformação de *N. tabacum*

3.3.1 Germinação de *N. tabacum*

Sementes de *N. tabacum* variedade K326 adquiridas no Departamento de Botânica/UFPel foram desinfestadas através de imersões sucessivas (sob agitação), em etanol 70% por 2 minutos, tween 20 a 10% por 2 minutos e hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos; sendo a seguir, lavadas três vezes em água destilada estéril e transferidas para meio MS sólido, acrescido de vitaminas (1 mg.L⁻¹ de tiamina, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico) e sacarose a 3%. O cultivo *in vitro* do material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 23 ± 1°C; sendo manipulado apenas em fluxo laminar horizontal, para manter as condições adequadas de assepsia. Após a germinação, as plântulas foram periodicamente transferidas para meio novo a fim de obterem bom desenvolvimento.

3.3.2 Meio de cultivo específico para alongamento de entrenós

A variedade de tabaco utilizada não produz entrenós muito alongados, portanto o meio de cultivo foi acrescido do fitorregulador GA₃ (ácido giberélico) a uma concentração de 0,5 mg.L⁻¹, que possibilitou o alongamento de entrenós.

3.3.3 Verificação da resistência de *N. tabacum* ao antibiótico de seleção (canamicina)

A construção pGA643/*tb-r1* possui a seqüência do gene *nptII* no fragmento de DNA a ser transferido para a planta, o que confere resistência à canamicina. Deste modo, previamente à transformação, foi necessário submeter o material vegetal a experimento com diferentes concentrações de canamicina, a fim de se estabelecer a concentração mínima do antibiótico à qual explantes não transformados sejam suscetíveis (dose letal mínima), para a posterior seleção dos transformantes. As concentrações testadas foram: 0, 30 e 50 mg.L⁻¹.

3.3.4 Protocolo de transformação de *N. tabacum* via *A. tumefaciens*

A partir da análise de material já publicado sobre o assunto (An, 1985; An et al., 1986; Lin et al., 1995; Brasileiro et al., 1998; Ferreira et al., 1998; Ghosh et al., 2002; Wei et al., 2006; Zhang et al., 2006), foi possível estabelecer-se um protocolo de transformação genética via *A. tumefaciens* adaptado à variedade em estudo (*N. tabacum* var. K326), sendo este descrito a seguir:

3.3.4.1 Co-cultivo

- Colônias de *A. tumefaciens* contendo a construção pGA643/*tb-r1* estocadas em glicerol foram previamente cultivadas por 48 a 72 horas em estufa a 28°C, em meio YEB sólido com os antibióticos adequados. A seguir, colônias isoladas foram cultivadas a 28°C sob agitação de 150 rpm por 36 horas (até obter D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 1,0), em 10mL de meio YEB líquido com antibióticos de seleção.
- A cultura foi então distribuída em diversos tubos de 1,5 mL, sendo centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet (células bacterianas) ressuspendido em 10mL de NaCl 0,85%. A suspensão bacteriana foi mantida à temperatura ambiente até o momento do co-cultivo.
- Plântulas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* que apresentavam em média 7 cm de comprimento e entrenós de 2 a 3 mm de diâmetro, foram utilizadas como material para excisão dos explantes (entrenós). Os entrenós foram mantidos em meio MS líquido até o momento do co-cultivo.
- A seguir os explantes foram transferidos para uma placa de Petri com 10 mL da suspensão bacteriana, sendo o co-cultivo incubado por 15 minutos a

temperatura ambiente sob leve agitação. Explantes também foram incubados em placa com solução de NaCl apenas (sem células bacterianas), sendo estes utilizados como controle negativo.

- Logo após os explantes foram transferidos para placas com meio MS sólido para co-cultivo no escuro por aproximadamente 60 horas, a $23\pm 1^\circ\text{C}$; sendo então imersos por 15 minutos em água destilada estéril contendo 100 mg.L^{-1} de cefotaxima e 250 mg.L^{-1} de carbenicilina para lavagem e inibição da agrobactéria.

3.3.4.2 Indução de calos

Após a lavagem, os entrenós de *N. tabacum* foram secos em papel filtro estéril e transferidos para meio de indução de calos: MS contendo 100 mg.L^{-1} de cefotaxima, 250 mg.L^{-1} de carbenicilina, 30 mg.L^{-1} de canamicina e $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, incubados em câmara de crescimento (condições já descritas). Como controle negativo, meios de cultivo sem os antibióticos e sem o fitorregulador também foram utilizados. A cada 15 dias os explantes eram transferidos para novo meio de cultivo, a fim de conservar a ação dos antibióticos e do fitorregulador.

3.3.4.3 Regeneração de brotos

Após o aparecimento dos primeiros calos (30 a 45 dias), estes foram excisados e transferidos para meio de regeneração de brotos: MS contendo 100 mg.L^{-1} de cefotaxima, 30 mg.L^{-1} de canamicina e $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

3.3.4.4 Alongamento e enraizamento

Os brotos regenerados foram excisados e transferidos para meio de alongamento e enraizamento, apenas na presença do antibiótico de seleção (30 mg.L^{-1} de canamicina), havendo diminuição na concentração de BAP ($0,2\text{ mg.L}^{-1}$). Para a extração de DNA, utilizou-se material foliar obtido de plântulas bem desenvolvidas e resistentes ao antibiótico de seleção.

3.3.4.5 Aclimação em casa de vegetação

Após o desenvolvimento *in vitro* das plântulas resistentes, estas foram transferidas para aclimação em casa de vegetação, sob condições controladas de cultivo.

3.4 Técnicas para a detecção da transformação de *N. tabacum*

- **DNA**

3.4.1 Extração de DNA total de folhas (método CTAB)

O DNA total de folhas foi extraído de plântulas oriundas do cultivo *in vitro*. A extração foi realizada através do método CTAB adaptado (Foster e Twell, 1996), utilizando plântulas transformadas e não transformadas (controle). Os procedimentos foram realizados em capela de exaustão a fim de evitar a inalação de reagentes tóxicos. A técnica encontra-se descrita a seguir:

- Folhas de *N. tabacum* foram pesadas (200 mg) e maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido.
- Após a maceração, adicionou-se 700 μ L de tampão CTAB 2X. A mistura foi homogeneizada e transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Adicionou-se à solução 0,4% v/v de β -mercaptoetanol (2,8 μ L).
- O tubo foi encubado por 2h-3h em banho-maria a 60°C, sendo agitado periodicamente.
- Adicionou-se 700 μ L de clorofórmio: álcool isoamil (24:1 v/v), homogeneizou-se com vórtex.
- A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm; após recuperou-se a fase aquosa (~300 μ L) em um novo tubo.
- O DNA presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 360 μ L de isopropanol gelado, homogeneizando-se delicadamente 30 vezes.
- Deixou-se o tubo por 1 hora a -70°C para precipitação do DNA.
- A solução foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm.

- O sobrenadante foi desprezado, sendo adicionado ao tubo 1mL de etanol 70% para lavagem.
- A solução foi mais uma vez centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm.
- O sobrenadante foi desprezado, deixou-se o “pellet” (DNA) secar em capela de exaustão por 10 minutos.
- O DNA foi ressuspendido em TE, o volume variou de acordo com a quantidade de DNA extraído (de 30 a 70 μ L de TE). O produto da extração foi conservado a -20°C.

3.4.2 Quantificação por eletroforese do DNA extraído

Vinte e quatro horas após a extração, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese. A quantificação ocorreu por comparação de intensidade de bandas, sendo λ *Hind* III (Invitrogen) o marcador utilizado como base.

3.4.3 PCR para confirmação da transformação

O produto da extração de DNA genômico de *N. tabacum* foi então submetido à reação de PCR com “primers” específicos (LTBR1/TabF e LTBR1/TabR) para confirmar a integração do gene *ltb-r1* ao genoma vegetal. A análise da amplificação foi realizada em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese.

3.4.4 Southern blot

A fim de se detectar o número de cópias de *ltb-r1* que foram inseridas no genoma vegetal, a técnica de hibridização de DNA denominada Southern blot foi realizada. O protocolo utilizado é descrito a seguir:

3.4.4.1 Separação dos fragmentos de DNA

- Ao DNA genômico de *N. tabacum* devidamente extraído e quantificado (recomenda-se a utilização de 4 a 5 μ g de DNA), aplicou-se solução de RNase (1 μ L para cada 90 μ L de DNA), deixando-a agir por 15 minutos a temperatura ambiente, para degradação do RNA presente nas amostras.

- A seguir, o DNA foi digerido por 8 horas em banho-maria a 37°C, com as seguintes enzimas, separadamente: *Xba*I e *Bgl*II (corte freqüente), além de *Kpn*I (corte raro).
- Após a digestão, um gel de agarose 0,8% de 14 x 14 cm (volume de 150 mL) foi preparado e 40 µL de cada amostra digerida foi submetida à eletroforese “overnight” a 30 V. A construção pGA643//*tb-r1* foi também submetida à eletroforese, sendo utilizada como controle positivo.

3.4.4.2 Transferência para a membrana de nitrocelulose

- O aparato para a transferência foi lavado (com água destilada e SDS 10%) e montado. O gel foi encaixado ao suporte e suas bordas foram vedadas com agarose. A tampa plástica foi encaixada, fechando o aparato. A bomba de pressão foi ligada.
- A transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond-N membrane / Amersham-Pharmacia Biotech) iniciou-se com a adição da solução de depurinação sobre o gel, por 10 minutos a 5 mmHg de pressão.
- A solução de depurinação foi removida e a transferência prosseguiu com a adição da solução de desnaturação por 10 minutos a 5 mmHg de pressão. Após a remoção da solução de desnaturação, adicionou-se a solução de neutralização por 10 minutos a 5 mmHg de pressão.
- Após sua remoção, adicionou-se a solução SSC 20X, prosseguindo-se a transferência por 40 minutos a 5mmHg de pressão e por mais 10 minutos a 10 mmHg.
- A solução foi removida, sendo a membrana de nitrocelulose retirada e lavada com solução SSC 6X por 5 minutos a temperatura ambiente, sob agitação.
- O excesso de solução foi drenado e a membrana foi envolta por papel filtro formando um “envelope”, sendo este fechado por um “clipe” de papel.
- O DNA foi então fixado à membrana em estufa à temperatura de 120°C por 30 minutos. Após a fixação, a membrana permaneceu a temperatura ambiente até o momento da hibridização.

3.4.4.3 Preparação da sonda

- A seqüência para *ltb-r1* foi amplificada por PCR, purificada utilizando o kit DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), quantificada (em gel de agarose 0,8%) e diluída (à concentração de 10 ng/μL).
- A seqüência *ltb-r1* na concentração de 10 ng/μL foi utilizada como sonda. A O kit ECL[®] Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Biosciences) foi utilizado para a marcação da sonda. A sonda e o tampão de hibridização foram preparados seguindo as instruções do fabricante.

3.4.4.4 Hibridização

- Previamente à hibridização, realizou-se uma pré-hibridização, onde a membrana foi colocada em contato com o tampão de hibridização em um frasco, sob agitação, a 42°C, por 45 minutos.
- Após este período, a sonda marcada foi adicionada ao frasco, que permaneceu a 42°C “overnight” para sua hibridização com os fragmentos de DNA presentes na membrana.
- Após a hibridização, a membrana foi lavada com 500ml de “Wash Solution I” (previamente incubada overnight a 55°C) por 20 minutos a 55°C, sob agitação.
- A “Wash Solution I” foi removida e 500ml de “Wash Solution II” foram adicionados à membrana, que permaneceu nesta solução por 5 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana permaneceu nesta solução por no máximo 30 minutos, até o momento da detecção.

3.4.4.5 Detecção quimioluminescente

A detecção foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (kit ECL[®] /Amersham Biosciences), utilizando-se filme de raios-X (Kodak).

- **RNA**

3.4.5 Extração de RNA total de tecidos vegetais

Folhas de *N. tabacum* foram excisadas de plântulas transformadas e não transformadas (controle) ainda no cultivo *in vitro*. Seu RNA total foi extraído utilizando-se Trizol. Os procedimentos foram realizados em capela de exaustão a

fim de evitar a inalação de reagentes tóxicos. O protocolo de extração de RNA é descrito a seguir:

- As folhas de *N. tabacum*, após excisadas, foram mantidas no gelo para evitar oxidação. Foram então maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até virarem pó.
- Aproximadamente 100 mg do macerado foi pesado e adicionado a um tubo de microcentrífuga (de 1,5 mL), ao qual se adicionou 800 µL de Trizol. A reação permaneceu por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionou-se 140 µL de clorofórmio à reação, sendo homogeneizada e permanecendo a temperatura ambiente por 3 minutos.
- O tubo foi então centrifugado a 11.700 rpm por 13 minutos, sob refrigeração (4°C).
- A fase aquosa (~400 µL) foi recuperada em novo tubo, sendo a ela adicionados 400 µL de isopropanol gelado. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos.
- O tubo foi novamente centrifugado a 11.700 rpm por 13 minutos, sob refrigeração (4°C).
- O sobrenadante foi desprezado, sendo adicionado ao tubo 800 µL de etanol 75% para lavagem. Este foi centrifugado a 9.300 rpm por 5 minutos.
- O sobrenadante foi novamente desprezado e deixou-se o “pellet” (RNA) secar em capela de exaustão por 10 minutos.
- O “pellet” foi então ressuscitado em 30 a 50 µl de água ultrapura estéril (o volume variou de acordo com o tamanho do “pellet”).

3.4.6 Quantificação do RNA por espectrofotometria e eletroforese

Sendo o RNA extremamente vulnerável à degradação, a quantificação da extração foi realizada logo em seguida, por eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotometria. A análise da absorbância em A_{260} determinou a concentração de RNA presente na amostra, em A_{280} o nível de contaminação, e a razão entre A_{260} e A_{280} determinou a qualidade dessa amostra. Após a extração, as amostras de RNA foram conservadas a -20°C para uso imediato.

3.4.7 Produção do cDNA a partir do RNA extraído

O RNA vegetal foi extraído com a finalidade de verificar a transcrição do gene inserido na planta. Mas como já foi mencionado, a fita de RNA não é muito estável. Desse modo, previamente à amplificação do transcrito por PCR, deve-se produzir o cDNA a partir do RNA de interesse. A técnica utilizada para a produção do cDNA é baseada na utilização da enzima transcriptase reversa, sendo descrita a seguir:

- Após a quantificação do RNA, calculou-se o volume necessário para obter-se uma concentração de $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.
- Este volume de RNA foi colocado em um tubo de microcentrifuga de 200 μL . Ao tubo adicionou-se 150 ng de “random primers” e 1 μL (10 mM) de dNTPs.
- A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos, no gelo por 1 minuto e centrifugada por 30s.
- Após adicionou-se à reação tampão 5X, DTT 0,1M, RNase “out” 40 UI/ μL e completou-se com água livre de RNase para um volume de 20 μL .
- A reação foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos.
- A seguir, adicionou-se a enzima transcriptase reversa a 200 UI/ μL .
- A reação foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo a seguir incubada por 50 minutos a 42°C . Após este período, o cDNA produzido deve ser conservado a -20°C .

3.4.8 RT-PCR para detectar a transcrição do gene *ltb-r1*

A reação de RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction), nada mais é do que uma técnica utilizada para a amplificação de transcritos específicos do cDNA, sendo este produzido a partir de amostras de RNA pela utilização da transcriptase reversa. Deste modo, realizou-se a técnica com o intuito de verificar a transcrição do gene *ltb-r1*. Além de reações com “primers” específicos para *ltb-r1* (LTBR1/Tab-F e LTBR1/Tab-R), reações com “primers” para transcritos constitutivos do genoma vegetal (subunidade 18S e região intergênica) foram realizadas, sendo estas utilizadas como controle positivo da reação de PCR. Como

cada conjunto de “primers” possui seu programa específico, as reações foram realizadas em dois termocicladores diferentes, simultaneamente. Os programas utilizados estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 3. Programa para amplificação da região do 18S.

Processo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação Inicial	95° C	3 min	1
Desnaturação	95° C	1 min	37
Anelamento	56° C	1 min	37
Extensão	72° C	1 min	37
Extensão final	72° C	10 min	1

- **Proteínas**

3.4.9 Extração de proteínas

A extração de proteínas de folhas de *N. tabacum* foi realizada segundo método apresentado em Brasileiro et al., 1998. As amostras utilizadas foram excisadas de plantas transformadas e não transformadas (controle) aclimatadas em casa de vegetação. O protocolo utilizado é descrito a seguir:

- Aproximadamente 200 mg de folha foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido.
- O macerado foi transferido para um tubo de microcentrífuga, onde se adicionou 0,5 mL de tampão de extração II.
- O tubo foi encubado por 1 hora e 30 minutos, sob agitação, a 4°C.
- Após este período, o tubo foi posto em microcentrífuga a 10.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (proteínas extraídas) foi então transferido para um novo tubo e conservado a -20°C.

3.4.9.1 Concentração de proteínas por liofilização

A fim de se obter um bom resultado na detecção da expressão de LTB-R1, as proteínas extraídas (~400 µL) a partir do material vegetal foram concentradas em liofilizador (Micro Modulyo Edwards®) por uma hora, sendo logo após ressuspendidas em volume menor de TE (60 µL), resultando em concentração sete vezes maior.

3.4.9.2 Quantificação da extração de proteínas por espectrofotometria

A quantificação das amostras de proteínas foi realizada através de leitura da absorbância a A_{280} , sendo então realizado cálculo para a padronização das amostras a serem utilizadas no Western blot.

3.4.10 Western blot

A técnica de hibridização de proteínas denominada Western blot foi utilizada visando detectar-se a expressão de LTB-R1. O método utilizado é descrito a seguir:

3.4.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)

As amostras de proteínas devidamente quantificadas foram desnaturadas (por 7 minutos a 99°C) na presença de tampão de amostra de SDS-Page (com β -mercaptoetanol), sendo então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, em cuba vertical (Bio-Rad). A mesma seqüência de amostras foi aplicação em ambas as metades do gel, pois uma metade foi corada e a outra transferida. A proteína LTB-R1 purificada e concentrada foi utilizada como controle positivo em ambas as metades do gel, e o marcador pré-corado (Prestained Benchmark / Invitrogen) foi aplicado apenas na metade a ser transferida. A voltagem inicial à qual as amostras foram submetidas foi 60 V, sendo alterada para 140 V após a saída do gel de empilhamento. Após a eletroforese, corou-se metade do gel com solução corante Comassie Blue, deixando esta reagir por 30 minutos, sendo descorada utilizando-se água quente repetidas vezes até a visualização das bandas.

3.4.10.2 Transferência para a membrana de nitrocelulose

Foi montado um “sanduíche” com a seguinte ordem (esponja-papel filtro-membrana-papel filtro-esponja). Este foi então inserido no “blotter” (Bio-Rad Trans-Blot Cell), e procedeu-se a transferência a 30 V “overnight”. Após este período, a membrana foi corada com a solução corante Ponceau S, para se visualizar a transferência das proteínas, sendo a seguir descorada com água. A membrana utilizada foi a de nitrocelulose Hybond™ HCL™ (Amersham Pharmacia Biotech). Utilizou-se também tampão de transferência.

3.4.10.3 Detecção imunológica

Previamente a detecção, a membrana foi bloqueada por incubação em solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado por uma hora e 30 minutos. A seguir, a membrana foi lavada quatro vezes com PBS-T e incubada por uma hora e 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação, com solução de PBS-T acrescida dos anticorpos primários: anti-CT (para a detecção de LTB) e F1B6 (para a detecção de R1), ambos na diluição de 1:2.500. A seguir a membrana foi lavada quatro vezes com PBS-T e incubada por uma hora e 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação, com solução de PBS-T acrescida dos anticorpos secundários conjugados com peroxidase: anti-coelho (para LTB) e anti-camundongo (para R1), ambos a diluição de 1:2.500. Ao final, a membrana foi lavada mais quatro vezes com PBS-T, sendo a seguir realizada a detecção colorimétrica utilizando o reagente DAB (diaminobenzidina).

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção da construção pGA643/*ltb-r1*

A região R1 do gene P97 e a subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli* foram amplificadas por PCR e resultaram em fragmentos de 270 e 320 pb, respectivamente. A obtenção do híbrido *ltb-r1* após a digestão e a ligação dos fragmentos foi eficiente, pois resultou em um produto de aproximadamente 700 pb, confirmado em gel de agarose 0,8%. O resultado do seqüenciamento de DNA mostrou que a seqüência estava em fase, comprovando a identidade da proteína a ser expressa. Colônias isoladas de *E. coli* cresceram no meio de seleção e obtiveram resultado positivo quando submetidas à PCR de colônia. A extração de plasmídeo destas colônias com kit GFX *Micro* Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) foi bem sucedida, como se pode observar na Figura 1, que mostra o fragmento de aproximadamente 12 kb extraído. Na Figura 1 pode-se observar a amplificação do inserto: *ltb-r1* + primers (aprox. 700 pb) a partir do produto da extração. Pela digestão foi possível confirmar que os plasmídios extraídos eram recombinantes, pois houve a liberação de um fragmento de aproximadamente 700 pb, condizentes com o tamanho do inserto.

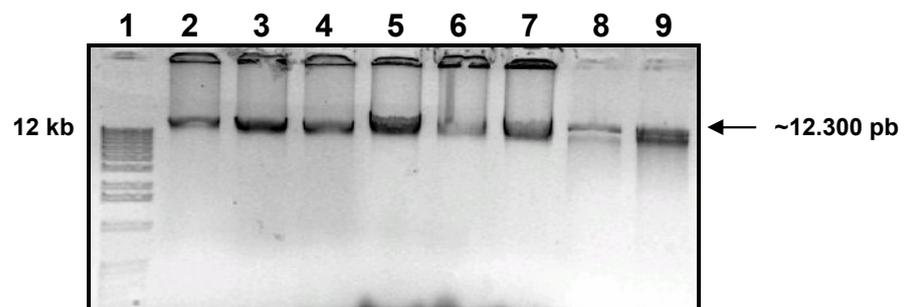


FIGURA 1. Gel de agarose 0,8%. Extração de DNA plasmidial de clones recombinantes de *E. coli* Top10F. 1. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); 2 a 9. DNA plasmidial extraído (~12 kb).

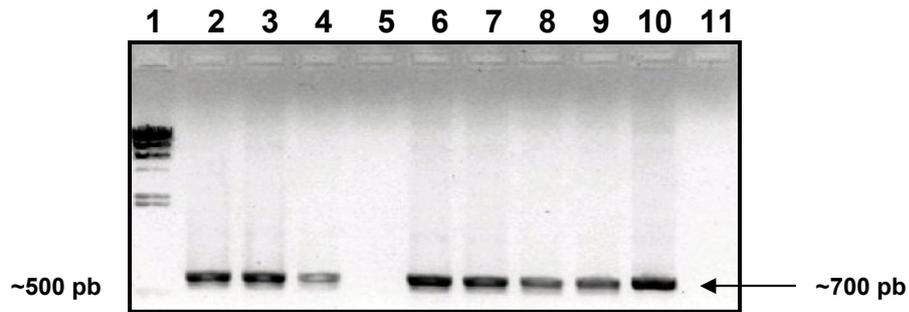


FIGURA 2. Gel de agarose 0,8%. Amplificação do gene *ltb-r1* por PCR a partir da extração plasmidial. 1. Marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen); 2. Controle positivo; 3 e 4. recombinantes; 5. não recombinante; 6 a 10. recombinante; 11. Controle negativo.

4.2 Transformação de *A. tumefaciens* com pGA643/*ltb-r1*

A inserção de pGA643/*ltb-r1* (Figura 3) em células de *A. tumefaciens* por eletroporação foi realizada com sucesso, como se pôde observar através da triagem das colônias recombinantes (Figura 4). Ao serem cultivadas, estas colônias se mostraram resistentes aos antibióticos de seleção (canamicina e tetraciclina), o que não ocorreu com colônias de *A. tumefaciens* sem o vetor de expressão em planta.

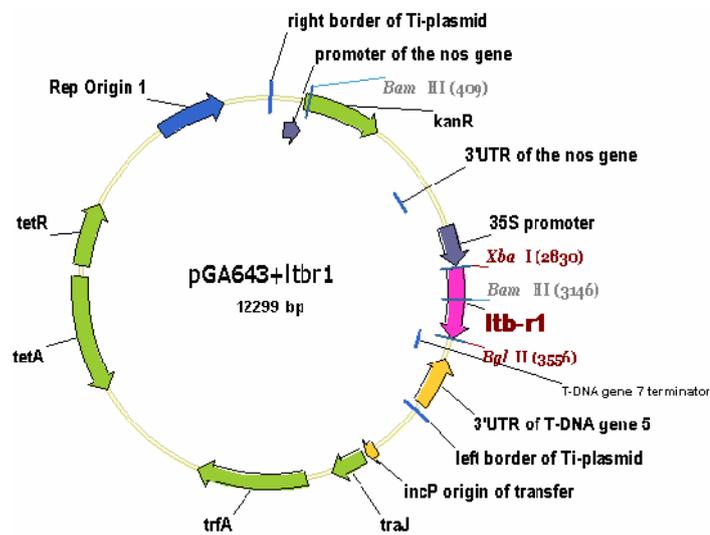


FIGURA 3. Desenho esquemático da molécula recombinante pGA643/*ltb-r1*, gerado pelo software Vector NTI 8.0 Advanced.

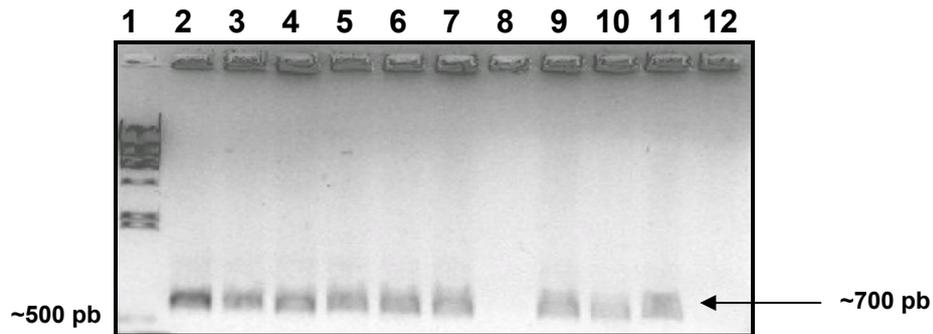


FIGURA 4. Gel de agarose 0,8%. Triagem das colônias recombinantes de *A. tumefaciens* por PCR de colônia. 1. Marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen); 2. Controle positivo; 3 a 7 e 9 a 11. Colônias recombinantes; 8. Colônia não-recombinante; 12. Controle negativo.

4.3 Transformação de *N. tabacum* via *A. tumefaciens*

No experimento realizado previamente à transformação, visando o estabelecimento da dose mínima do antibiótico de seleção (canamicina) à qual explantes não transformados sejam susceptíveis, a concentração estabelecida foi de 30 mg.L^{-1} (Figura 5). Noventa explantes de *N. tabacum* passaram pelo protocolo de transformação (Figura 6.A), sendo que destes, apenas 10 poderiam formar possíveis transformantes, e os outros 80 eram apenas grupos-controle diversos. Dos 10 possíveis transformantes, apenas três de fato regeneraram (Figura 6.B), formando três diferentes linhagens de clones que foram transferidas para os meios subsequentes de regeneração de brotos, alongamento e enraizamento. Das três linhagens obtidas, brotos de apenas duas obtiveram bom desenvolvimento ao longo do processo, sendo estes repicados sucessivamente *in vitro* (Figura 6.C) — sempre na presença do antibiótico de seleção — para a obtenção de material para as análises moleculares. Uma vez enraizadas e bem desenvolvidas *in vitro*, as plântulas foram aclimatadas com sucesso em casa de vegetação, sob condições controladas de cultivo (Figura 7). Análises moleculares também foram realizadas com este material.



FIGURA 5. Teste de susceptibilidade de entrenós de *N. tabacum* a diferentes concentrações de canamicina, após 20 dias de cultivo. A. Controle, 0 mg.L⁻¹; B. 30 mg.L⁻¹; C. 50 mg.L⁻¹.



FIGURA 6. Regeneração de entrenós de *N. tabacum* após transformação via *A. tumefaciens*. A. Explantes imediatamente após o co-cultivo; B. Regeneração de brotos (setas), 30 dias após o co-cultivo; C. Alongamento e enraizamento de plântula regenerada.



FIGURA 7. Acimatação em casa de vegetação de plântulas de *N. tabacum* var K326 contendo o gene *ltb-r1*.

4.4 Técnicas para a detecção da transformação de *N. tabacum* (*ltb-r1*)

4.4.1 DNA

O DNA genômico de *N. tabacum* foi extraído tanto de plântulas submetidas ao processo de transformação genética, quanto daquelas que não foram submetidas (controle), utilizando-se o tampão CTAB. A quantificação em gel de agarose 0,8% do DNA extraído pode ser visualizada na Figura 8. A Figura 9 apresenta a amplificação por PCR do gene *ltb-r1* (apenas nos transformantes) a partir de 1 μ L do produto da extração, o que confirma a integração do gene de interesse ao genoma vegetal. Amostras diluídas a 1:10 também foram submetidas à PCR.

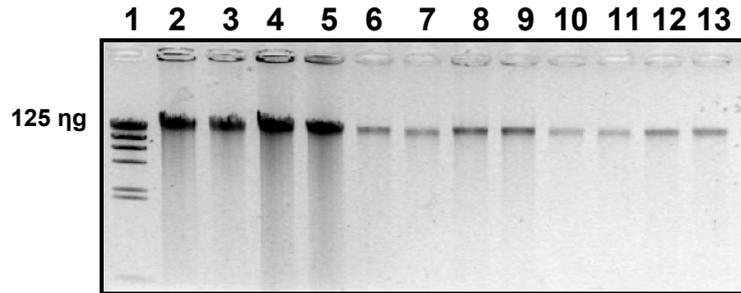


FIGURA 8. Gel de agarose 0,8 %. Quantificação por intensidade de bandas da extração de DNA total de folhas de *N. tabacum*. 1. Marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen), a primeira banda representa 125 η g de DNA; 2. amostra de 1 μ L de DNA controle; 3 a 5. amostras de 1 μ L de DNA recombinante; 6 a 9. Mesmo material, diluição de 1:5; 10 a 13. Mesmo material, diluição de 1:10.

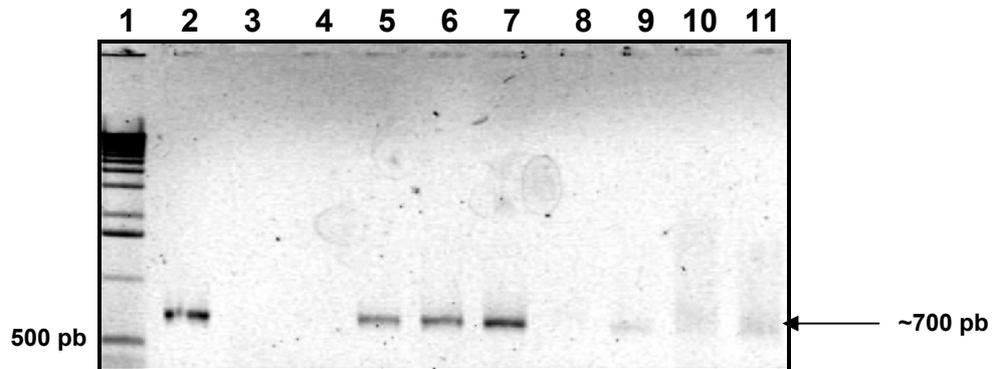


FIGURA 9. Gel de agarose 0,8%. Amplificação do gene *Itb-r1* por PCR a partir da extração de DNA de *N. tabacum*. 1. Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen); 2. Controle positivo; 3. Controle negativo; 4. DNA controle (não-recombinante); 5 a 7. DNA recombinante. 8 a 11. Mesmo material das colunas 4 a 7, na diluição 1:10.

Posteriormente, realizou-se Southern blot visando a detecção do número de cópias de *Itb-r1* inseridas no DNA genômico de *N. tabacum*. A Figura 10 apresenta as amostras de DNA genômico de tabaco digeridas, em gel de agarose 0,8 %, submetidas à eletroforese “overnight”. Aplicou-se ao gel o marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen), e a construção pGA643/*Itb-r1* como controle positivo para a hibridização. A transferência das amostras do gel para a membrana de nitrocelulose foi bem sucedida, pois após a transferência procedeu-se a visualização deste sob luz UV, e observou-se que não havia mais bandas. A sonda para a hibridização foi preparada com a seqüência *Itb-r1*, sendo esta amplificada,

purificada e quantificada em gel de agarose 0,8% (Figura 11). Infelizmente, a hibridização não foi bem sucedida, devido a problemas nos componentes do kit utilizado. Desta forma, a detecção quimioluminescente também não apresentou resultados.

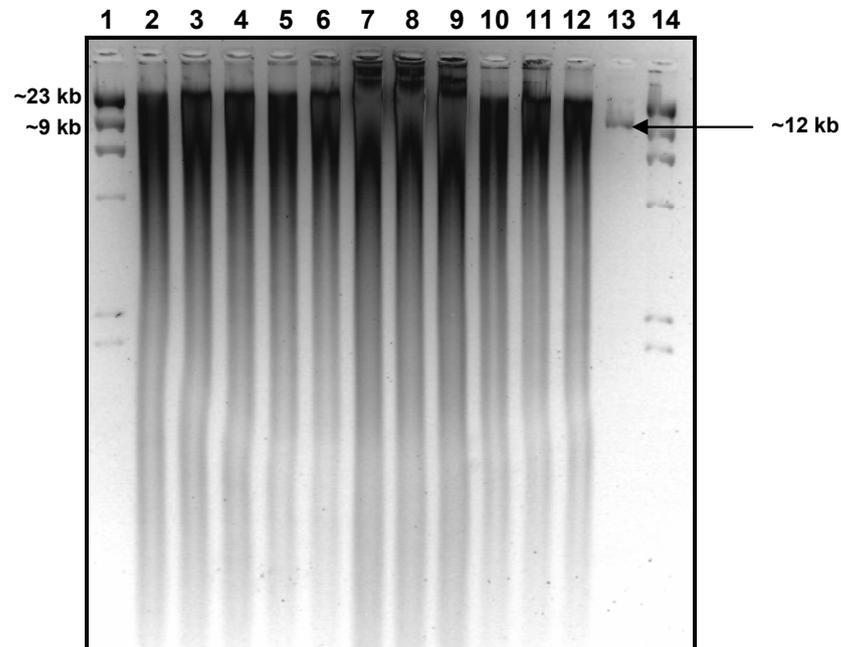


FIGURA 10. Gel de agarose 0,8%. Amostras de DNA genômico de *N. tabacum* após digestão. 1 e 14. Marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen); 2. Amostra controle digerida com *Xba*I; 3 a 5. Amostras recombinantes digeridas com *Xba*I; 6. Amostra controle digerida com *Bgl*II; 7 a 9. Amostras recombinantes digeridas com *Bgl*II; 10. Amostra controle digerida com *Kpn*I; 11 e 12. Amostras recombinantes digeridas com *Kpn*I; 13. Vetor recombinante pGA643/*Itb-r1* não digerido (controle positivo).

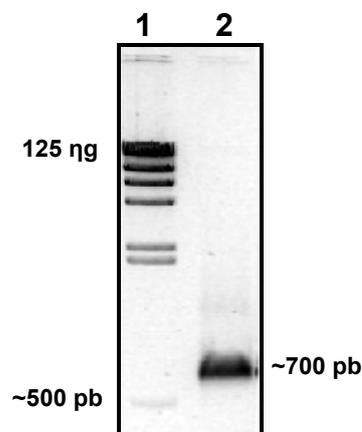


FIGURA 11. Gel de agarose 0,8%. Quantificação por intensidade de bandas de *Itb-r1* purificada. 1. Marcador de peso molecular λ *Hind* III (Invitrogen), a primeira banda representa 125 ng; 2. 4 μ L de *Itb-r1* purificada.

4.4.2 RNA

Para se detectar a transcrição de *Itb-r1* através da técnica de RT-PCR, o RNA total de folhas de *N. tabacum* foi extraído utilizando-se Trizol. A quantificação do produto da extração realizada em gel de agarose 1% pode ser observada na Figura 12. A análise em espectrofotômetro confirmou a qualidade das amostras de RNA ("ratio" entre 1.8 e 2.2, na razão entre A_{260} e A_{280}), e a partir da análise da absorbância em A_{260} calculou-se a quantidade de RNA a ser utilizada na produção do cDNA (4 μ L da amostra 1 e 3 μ L da amostra 2, para concentração final de 5 μ g/ml de RNA). O resultado obtido na RT-PCR pode ser observado na Figura 13. A seqüência de "primers" para a subunidade 18S resultou em produto amplificado (de aprox. 300pb) em ambas as amostras, o que certifica o funcionamento da reação. A seqüência de "primers" para a região intergênica não apresentou ampliações, devido a problemas na combinação dos "primers". Já a seqüência de "primers" para *Itb-r1* resultou em produto de aproximadamente 600pb; apenas na amostra do material vegetal transformado; o que confirma que o gene de interesse está sendo transcrito.

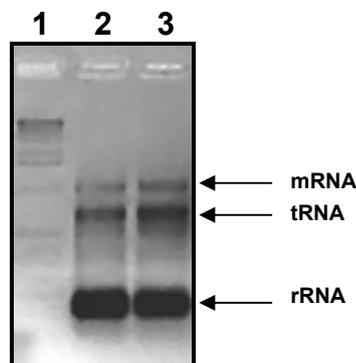


FIGURA 12. Gel de agarose 1%. Quantificação da extração de RNA total de folhas de *N. tabacum*. 1. Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen); 2. RNA de planta controle (não transformada); 3. RNA de planta transformada.

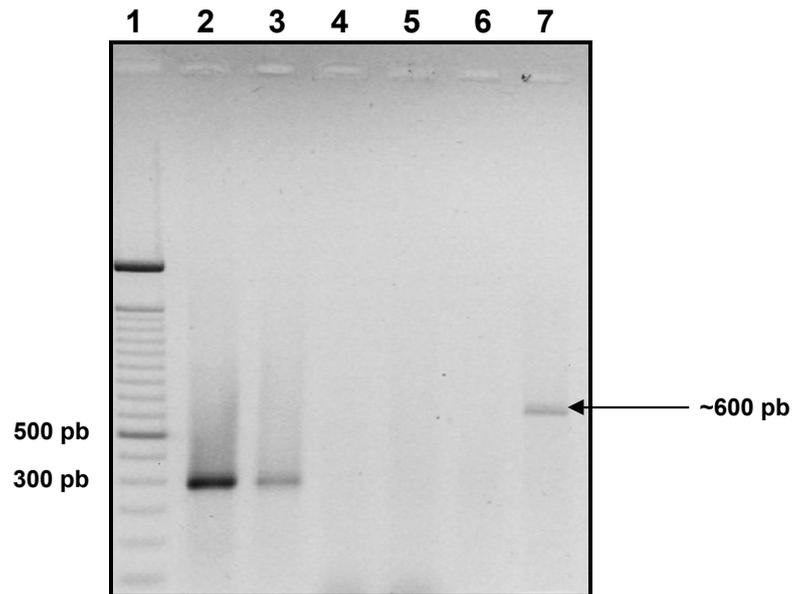


FIGURA 13. Gel de agarose 1%. Amplificação de transcritos por RT-PCR. 1. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); 2 e 3. Controles positivos: região constitutiva de 18S (~300pb), amplificados a partir de planta controle e transformada, respectivamente. 4 e 5. Controles positivos: região intergênica (não houve amplificação); 6. Planta controle (não transformada); 7. amplificação de *ltb-r1* (~600pb), planta transformada.

4.4.3 Proteínas

Depois de submetidas ao SDS-Page e coradas com Comassie Blue, as proteínas extraídas a partir de folhas de tabaco puderam ser visualizadas, confirmando o sucesso da extração. A transferência destas proteínas para a membrana de nitrocelulose pôde ser observada pela coloração com Ponceau. Na detecção imunológica, foram utilizados, primeiramente, apenas os anticorpos para LTB (anti CT e anti-coelho). Mas estes não pareceram suficientes para demonstrar os níveis de expressão da proteína LTB-R1 (Figura 14). Desse modo, passou-se a concentrar as proteínas após a extração (Figura 15), e a utilizar anticorpos para R1 (F1B6 e anti-camundongo), juntamente com os anticorpos para LTB. Ligações inespecíficas passaram a se formar com a utilização de ambos os anticorpos (Figura 16), o que impossibilitou a detecção precisa dos níveis de expressão de LTB-R1. Ainda assim, pode-se observar na Figura 17 a formação de uma banda fraca na altura da proteína LTB-R1 (aproximadamente 30 kDa), presente apenas na amostra correspondente à planta transformada, dando indícios de que o gene *ltb-r1* está sendo expresso no vegetal.

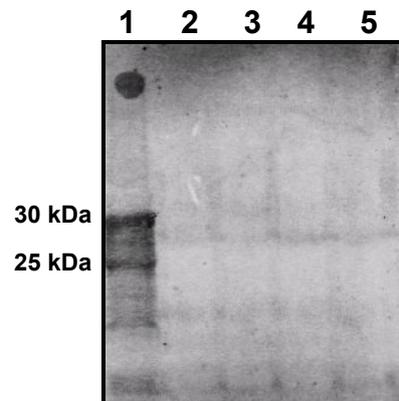


FIGURA 14. Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se apenas anti-CT. 1. Controle positivo, proteína rLTB-R1; 2. Proteína da planta não-transformada; 3 a 5. Proteína das plantas transformadas.

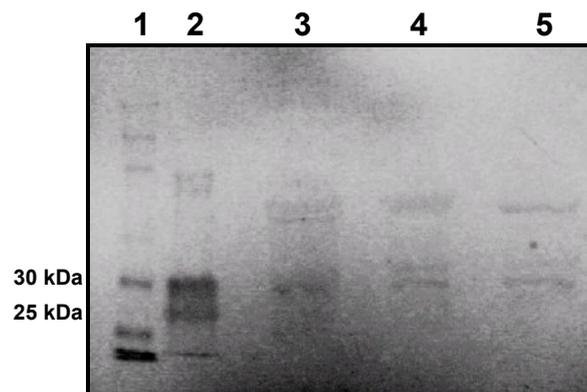


FIGURA 15. Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se apenas anti-CT. 1. Marcador pré-corado Prestained Benchmark (Invitrogen); 2. Controle positivo, proteína rLTB-R1; 3. Proteína da planta não-transformada concentrada 7x; 4 e 5. Proteína das plantas transformadas, concentradas 7x.

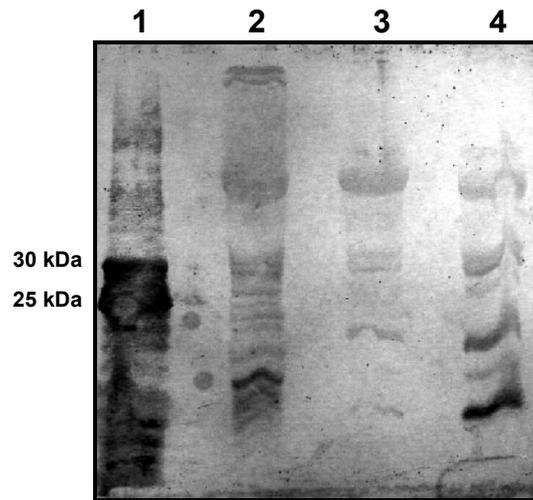


FIGURA 16. Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se anti-CT e F1B6. 1. Controle positivo, proteína rLTB-R1; 2. Amostra de planta não-transformada concentrada 7x; 3 e 4. Amostras de plantas transformadas concentradas 7x.

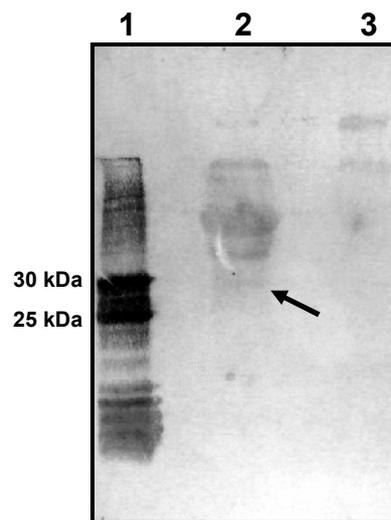


FIGURA 17. Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (Western blot), utilizando-se anti-CT e F1B6. 1. Controle positivo, proteína rLTB-R1; 2. Amostra de planta transformada concentrada 7x; 3. Amostras de planta não-transformada concentrada 7x.

5. DISCUSSÃO

De acordo com Conceição et al., 2006, a LTB-R1 recombinante expressa em *E. coli* possui grande potencial ao ser utilizada como vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína, pois testes em camundongos levaram a obtenção de anticorpos específicos contra R1. Além disso, a utilização de plantas como vetores de expressão de proteínas é uma alternativa que vêm sendo muito explorada hoje em dia, uma vez que apresenta diversas vantagens em relação a outros sistemas de produção utilizados, como as próprias bactérias, leveduras, culturas celulares e animais transgênicos (Koprowski e Yusibov, 2001; Ma et al., 2003; Schillberga et al., 2005; Streatfield et al., 2006). Sob esta perspectiva, o presente trabalho teve por objetivo a transformação genética de *N. tabacum* via *A. tumefaciens*, visando a utilização da planta como biorreatora para a produção de LTB-R1 recombinante, para ser usada como vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia micoplásmica suína.

O vetor binário escolhido foi o pGA643 (An et al., 1988), por apresentar em seu cassete de expressão um promotor constitutivo forte (35SCaMV – 35S do vírus do mosaico da couve-flor), e o gene *nptII*, responsável pela resistência à canamicina. Na construção utilizada o gene *ltb-r1* havia sido inserido no sítio “polilinker”, entre enzimas de restrição *XbaI* e *BglII*. A construção pGA643/*ltb-r1* estava clonada em *E. coli*, assim, através de PCR de colônia realizou-se a triagem de colônias recombinantes, já que esta é uma técnica rápida de detecção de seqüências específicas, amplamente aplicada a bactérias e leveduras (Ward et al., 1992; Tsuchizaki et al., 2000).

Uma vez obtido o vetor, era necessário transferi-lo para *A. tumefaciens*. Para isso, três métodos têm sido mais utilizados: conjugação triparental, eletroporação e choque térmico, sendo que a escolha do método a ser empregado depende basicamente dos recursos disponíveis no laboratório (Brasileiro et al., 1998). O método escolhido foi a eletroporação, pela disponibilidade do aparelho, facilidade da técnica e boa eficiência de transformação apresentada. De fato, uma alta taxa de transformantes foi obtida entre as colônias de *A. tumefaciens*.

A transformação genética de plantas, para ser bem sucedida, ainda depende de muitas variáveis. Algumas espécies vegetais como o tabaco, a batata e a *Arabidopsis*, são utilizadas como plantas-modelo na transformação, uma vez que

sua cultura *in vitro* já está bem estabelecida, e que possuem características que facilitam o processo, como facilidade de germinação e de regeneração, ciclo curto e ampla produção de sementes. A escolha do vetor binário a ser utilizado para a transferência também é ponto importante, uma vez que o promotor 35SCaMV, apesar de ser amplamente utilizado em dicotiledôneas, parece não apresentar os mesmos resultados em monocotiledôneas, onde promotores mais específicos, como o da álcool desidrogenase do arroz (*Adh1*) ou da ubiquitina do milho (*Ubi1*) são utilizados (Brasileiro et al., 1998).

Além disso, a escolha da dose letal do antibiótico de seleção (à qual explantes não transformados são susceptíveis) é muito importante para que “escapes” sejam evitados no processo de regeneração dos transformantes. Por isso, o experimento realizado previamente à transformação testando-se diversas doses de canamicina às quais os explantes eram susceptíveis foi muito útil, já que após a transformação não ocorreu a regeneração de nenhum explante de grupos controles (não-transformados). A escolha do antibiótico descontaminante e sua dose a ser utilizada também é crucial, pois estes não devem ser tóxicos às plantas, impedindo seu desenvolvimento (Ogawa e Mii, 2007).

Outro fator limitante é o balanço hormonal (auxinas/citocininas) utilizado no meio de cultivo após a regeneração. No protocolo desenvolvido neste trabalho, não foram utilizadas doses de auxina, mas mesmo assim obteve-se boa regeneração dos transformantes. Isto pode ser explicado, segundo Lin et al., 1995, pelo fato de que a carbenicilina (um dos antibióticos descontaminantes utilizados), parece ter efeito similar à utilização de auxinas, devido à similaridade de estruturas químicas presentes em ambos. Ainda, a utilização da carbenicilina juntamente com uma auxina parece ter efeito negativo sobre os explantes, talvez devido a um desbalanço hormonal gerado pelo excesso de auxinas.

Além do mais, de acordo com análise de outros experimentos de transformação já realizados, como Ferreira et al., 1998; Chaudhury et al., 2007; Kim et al., 2007; Shrawat et al., 2007, o aumento da taxa de transformantes ocorre pelo aumento dos eventos de transformação, ou seja, quanto mais explantes forem submetidos ao processo, maior será a quantidade de transformantes, o que de fato explica o baixo número de transformantes obtidos neste trabalho. Além destes, muitos outros fatores podem estar relacionados ao sucesso ou ao fracasso de um

protocolo de transformação de plantas, de forma que, a boa estruturação deste é parte chave do sucesso da transformação.

Após a regeneração de explantes transformados, diversas análises moleculares foram realizadas, visando verificar a integração do gene *ltb-r1* ao genoma vegetal, detectar sua transcrição e verificar a expressão da proteína recombinante produzida na planta. Tanto a PCR quanto a RT-PCR apresentaram resultado positivo, pressupondo-se, a partir delas, que o gene *ltb-r1* foi inserido no genoma vegetal e está sendo transcrito. Apesar disso, os níveis de expressão da proteína LTB-R1 recombinante, até o momento, não puderam ser detectados com precisão. Isto pode ser justificado pelo fato de que, conforme é descrito na literatura (Koprowski e Yusibov, 2001; Ma et al., 2003; Sala et al., 2003; Twyman et al., 2003; Tacket et al., 2004; Schillberg et al., 2005; Kim et al., 2007), a expressão de genes exógenos inseridos em plantas é muitas vezes baixa, representando apenas 0,1 a 1% do total de proteínas solúveis produzidas no vegetal. A fim de aumentar este índice, técnicas estão sendo aprimoradas, e a expressão transiente desses genes, através de transformação por vetores virais pode ser uma alternativa eficiente (Gleba et al., 2005). Além do mais, segundo Twyman et al., 2003, para espécies com alto rendimento de biomassa, mesmo uma expressão com esses níveis se torna vantajosa, se comparada a outros sistemas de produção. Além disso, a estabilidade da proteína parece ser o fator mais importante na limitação da expressão gênica, podendo ser superado através do direcionamento apropriado desta através dos compartimentos sub-celulares: anticorpos recombinantes, por exemplo, que têm sua expressão direcionada ao sistema secretório, geralmente são expressos em níveis muito maiores do que aqueles sintetizados no citosol, e o rendimento cresce ainda mais quando estes são retidos no retículo endoplasmático ao invés de serem secretados para o apoplasto (Schillberg et al., 2005). O direcionamento da expressão para tecidos específicos da planta também podem aumentar o rendimento da proteína produzida: em cereais a produção pode ser direcionada às sementes, o poder secretório de folhas e raízes também pode ser explorado, em uma produção de pequena escala (Twyman et al., 2003).

Muitos outros fatores podem influenciar na expressão gênica, de maneira que é difícil determinar a causa exata do problema apresentado com o desenvolver deste trabalho. Espera-se que este sirva como exemplo do grande potencial teórico e, principalmente prático que a utilização de plantas como biorreatoras possui, e

que experimentos futuros acabem por elucidar questões problemáticas ao longo do processo, possibilitando que se tire o máximo proveito desta técnica.

6. CONCLUSÃO

A transformação de *N. tabacum* via *A. tumefaciens* foi realizada com sucesso. Foi possível detectar a transcrição do gene *ltb-r1*. A expressão da proteína recombinante LTB-R1 não pôde ser detectada com precisão, porém experimentos continuarão a ser realizados, visando aperfeiçoar tanto a detecção quanto a própria expressão da proteína.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G.; SARTORETTO, L.; BRASILEIRO, A. Molecular biology of the infection process by *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 28 (5), 2003.
- AN, G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. **Plant Physiology**, 79, 568-570, 1985.
- AN, G.; WATSON, B.; CHIANG, C. Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. **Plant Physiology**, 81, 301-305, 1986.
- AN, G.; EBERT, P.; MITRA, A.; ITA, S. Binary vectors, 1988. In GELVIN, S.; SCHILPEROORT, R. **Plant Molecular Biology Manual**, Section A, Chapter 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p 1-19.
- BANERJEE, A.; PRAT, S.; HANNAPPEL, D. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Science**, 170, 732–738, 2006.
- BARBOSA, J. Estudo de fatores que influenciam o processo de transformação genética em citros via *Agrobacterium tumefaciens*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 51p., 2002.
- BARTA, A. et al. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. **Plant Molecular Biology**, 6, 347–357, 1986.
- BASF. Basf banks on plant biotechnology. **News Release BASF**, 2000.
- BRASILEIRO, A. et al. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen. 309p, 1998.
- CHAUDHURY, D.; MADANPOTRA, S.; JAIWAL, R. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Science**, 172, 692–700, 2007.
- CHIKWAMBA, R.; CUNNICK, J.; HATHAWAY, D.; et al. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat

labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). **Transgenic Research**, 11, 479-493, 2002.

CONCEIÇÃO, F.; MOREIRA, A.; DELLAGOSTIN, O. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, 24 (29-30), 5734-5743, 2006.

DUNG, T.; DUC, L.; HO, N.; UYEN N. *Agrobacterium*-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture**, 2006.

FERREIRA, A.T. Transformação de batata (*Solanum tuberosum* L. cvs. Baronesa e Macaca) via *Agrobacterium tumefaciens* visando a obtenção de plantas resistentes ao vírus do enrolamento das folhas (PLRV). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, FAEM/UFPel, Pelotas. 1998, 112p.

FOSTER, G., TWELL, D. **Plant gene isolation. Principles and practice**. John Wiley & Sons, England, 1996.

GHOSH, S.; MALHOTRA, P.; LALITHA, P. et al. Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP1₁₉), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco. **Plant Science**, 162 (3), 335-343, 2002.

GLEBA, Y.; KLIMYUK, V.; MARILLONNET, S. Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. **Vaccine**, 23 (17-18), 2042-2048, 2005.

HORSCH et al. A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. **Science**, 229, 1229-1231, 1985.

HSU, T.; ARTIUSHIN, S.; MINION, F.C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, 179 (4), 1317-1323, 1997.

HSU, T, MINION, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**. 66. p. 4762-4766, 1998.

JENKINS, C.; WILTON, J. L.; MINION, F. C., et al. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesion bind heparin. **Infection and Immunity**, 74, p. 481-487, 2006.

JENSEN, D. S., ERSBOLL, A. K., NIELSEN, J. P. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. **Prv. Vet. Med**, 54, p. 265-278, 2002.

KAVANAGH, N. The effect of pulse medication with combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. **International Veterinary Journal**, 47, 58-61, 1994.

KIM, T.; KIM, M.; KIM, G. et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). **Protein Expression and Purification**, 51 (1), 22-27, 2007.

KOPROWSKY, H.; YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. **Vaccine**, 19, 2735–2741, 2001.

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V.; KUMRIA, R. et al. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Report — Genetic Transformation and Hybridization**, 22, 465–470, 2004.

LIN, J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. **Plant Science**, 109 (2), 171-177, 1995.

MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature**, 4, 794 – 805, 2003.

MINION, F.C., ADAMS, C., HSU, T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infection and Immunity**, 68, p.3056-3060, 2000.

MOREAU, I.A., MILLER, G.Y.; BAHNSON, P.B. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vaccine**. 22:2328-2333, 2004.

NAUERBY, B.; BILLING, K.; WYNDAELE, R. - Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, 123, 169-177, 1997.

- OGAWA, Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: Novel β -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Science**, 172 , 564–572, 2007.
- ROMMENS, C. Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a potentially multifaceted gene. **Trends in Plant Science**, 11 (7), 317-319, 2006.
- SALA, F.; RIGANO, M.; BARBANTE, A. et al. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. **Vaccine**, 21 (7-8), 803-808, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SCHILLBERG, S; TWYMAN, R.; FISCHER, R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. **Vaccine**, 23, 1764–1769, 2005.
- SERAGELDIN, I.; PERSLEY, G.; Prometeian science. Agricultural biotechnology, the environment, and the poor. Consultative Group on International Agriculture Research. Washington, D.C. 2000.
- SHRAWAT, A.; BECKER, D.; LÖRS, H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, 172, 281–290, 2007.
- SILVA, J.; NHUT, D.; TANAKA, M. et al. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulturae**, 97, 397–410, 2003.
- SILVA, J. Simple multiplication and effective genetic transformation (four methods) of in vitro-grown tobacco by stem thin cell layers. **Plant Science**, 169 (6), 1046-1058, 2005.
- SILVEIRA, J.; BUAINAIN, A.; CARVALHO, I. Cultivos geneticamente modificados e comércio de commodities agrícolas. In: Oficina de Trabalho sobre Impacto Econômico de Produtos Transgênicos na Agricultura Brasileira, 2004, Brasília. CGEE. Brasília : CGEE, p. 1-35. 2004.
- STREATFIELD, S. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. **Methods: Methods in Mucosal Immunisation**, 38 (2), 150-157, 2006.

- SUNILKUMAR, G.; VIJAYACHANDRA, K.; VELUTHAMBI, K. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. **Plant Science**, 141 (1), 51-58, 1999.
- THACKETT, C.; PASETTI, M.; EDELMAN, R. et al. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. **Vaccine**, 22 (31-32), 4385-4389, 2004.
- TRAVELLA, S.; ROSS, S.; HARDEN, S. et al. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. **Plant Cell Report — Genetic Transformation and Hybridization**, 23, 780–789, 2005.
- TSUCHIZAKI, N.; ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. Colony PCR for rapid detection of antibiotic resistance genes in MRSA and enterococci. **Jpn. J. Antibiot.**, 53(6), 422-429, 2000.
- TWYMAN, R.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S. et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology . **Trends in Biotechnology**, 21 (12), 2003.
- TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 17, 147–154, 2006.
- VERWEIJ, W.R.; HAAN, L.; HOLTROP, M.; et al. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, 16, 3476-3482, 1998.
- WARD, A.; Rapid analysis of yeast transformants using colony-PCR. **Biotechniques**, 13 (3), 350, 1992.
- WEI, X.; GOU, X.; YUAN, T.; RUSSEL, D. A highly efficient in vitro plant regeneration system and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Plumbago zeylanica*. **Plant Cell Report — Cell Biology and Morphogenesis**, 25, 513–521, 2006.
- WILLY, D.; JANNIEK, C.; JYOTI, K. et al. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **The Plant Journal**, 12 (6), 1459-1463, 1997.

ZHANG, Q., YOUNG, T.F., ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infection and Immunity**, 63, p.1013-1019, 1995.

ZHENG, G.; YANG, Y.; RAO, Q. et al. Expression of bioactive human M-CSF soluble receptor in transgenic tobacco plants. **Protein Expression and Purification**, 46 (2), 367-373, 2006.