



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Agrobacterium tumefaciens* e *E. coli* COM O VETOR BINÁRIO pRS037 CONTENDO O GENE GFP

KLAFKE, Gabriel Baracy¹; AMARAL, Marcelo Nogueira do¹; CASTRO, Rodrigo Inácio de¹; RAISKI, Sidney¹; NORA, Fabiana Roos¹

¹ Centro de Biotecnologia-CenBiot, Universidade Federal de Pelotas-UFPeI
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. gabrielklafke@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia recombinante de expressão iniciou com a produção do antígeno da hepatite B em fungos em 1982, abrindo um novo campo na área de exploração de novos sistemas de expressão para a produção de proteínas de interesse farmacêutico (Valenzuela et. al, 1982). Porém, microrganismos recombinantes começaram a oferecer desvantagens, e outras plataformas de expressão também passaram a ser utilizadas para a produção das proteínas recombinantes (Streatfield, 1999; Kost & Condreay, 1999; Houdebine, 2002). Recentemente plantas vêm sendo investigadas extensivamente como uma fonte potencial para a produção de vacinas. Esse sistema tem emergido como uma alternativa conveniente, segura e econômica quando comparada com os sistemas utilizados até então baseados na cultura de microrganismos e especialmente sistemas utilizando células animais e animais transgênicos. Os sistemas de expressão em plantas possuem várias vantagens, entre elas, mostram-se mais econômicos que sistemas tradicionais, a ausência do risco de contaminação com patógenos animais, a conservação da máquina eucariótica que media a modificação dessas proteínas, a possibilidade de produção em larga escala e o potencial de produzir vacinas comestíveis.

O presente estudo representa uma das etapas do processo de otimização da transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* var. *virgínia*, para a expressão da quimera LTBR1, e tem por objetivo a obtenção de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com o vetor binário pRS037 preparado para integrar no genoma de células vegetais um cassete de expressão gênica (35S::mGFP-ER-NOS) para induzir a expressão do gene *gfp*, importante marcador utilizado em processos de transformação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal do centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

A clonagem do vetor binário (pRS037) foi realizada pela sua introdução em células competentes de *Escherichia coli* por choque térmico conforme descrito por

Sambrook (2001), com algumas modificações. A seguir, as células transformadas foram cultivadas em meio LB acrescido de 25 μ g·L⁻¹ Gentamicina^R. Após o cultivo, o vetor binário foi isolado e utilizado para transformação da cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* pelo mesmo método.

Para obtenção de células competentes da linhagem DH5-alfa de *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook (2001). Logo após, uma alíquota de células competentes (50 μ L) foi adicionado a 1 μ L de plasmídeo pRS037 e 100 μ L de cloreto de cálcio para a realização da transformação das células conforme descrito por Sambrook (2001). A extração do vetor binário das colônias de *A. tumefaciens* e *E. coli* das cepas LBA4404 e DH5-alfa respectivamente, crescidas nas placas contendo antibiótico de seleção foi realizada utilizando-se o *Kit Plasmid Mini KitPrep* (RBC-Real Genomics). A confirmação da introdução do vetor binário (pRS037) nas cepas putativamente clonadas foi realizada pela técnica de PCR, utilizando-se os *primers* específicos para a região do plasmídeo 35S e t-NOS.

A reação de PCR foi realizada em termociclador *PTC-100 Peltier Thermal Cycler* (MJ Research) e as condições de amplificação consistiram de uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz UV. Logo em seguida, foi realizada a transformação genética via *Agrobacterium* dos tabacos com o vetor pRS037 conforme o protocolo Brasileiro (1999), com algumas modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. tumefaciens, putativamente transformadas, foram visualizadas em placa de Petri após três dias de cultivo em meio seletivo. Após o cultivo em meio líquido de colônias isoladas das referidas placas de Petri, o DNA plasmidial foi isolado das mesmas e analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 1). A presença de bandas de aproximadamente 14kb sugerem a presença do vetor binário pRS037, respectivamente, nas referidas colônias de *A. tumefaciens* e *E. coli*.

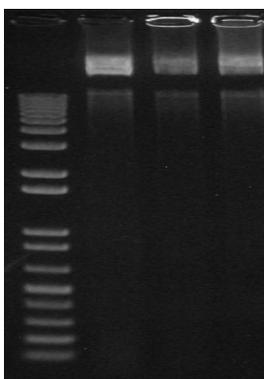


Figura 1 - Separação de bandas em gel de agarose a 0,8%. Marcador 1Kb plus/INVITROGEN (1). Vetor pRS037, controle positivo (2). Produtos de extração do plasmídeo pRS037 de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 (3) *E. coli* linhagem DH5-alfa (4).

A. tumefaciens e *E. coli* foi submetida à amplificação por PCR com *primers* para uma região específica do pRS037. Após a separação dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose, a presença de bandas de tamanho esperado (~600pb) evidenciou a transformação de ambas as cepas com pRS037, permitindo assim que a cepa de *A. tumefaciens* pudesse ser utilizada nas etapas seguintes de transformação de células vegetais. A seguir, a transformação genética com o pRS037 foi realizada de acordo com o protocolo de Brasileiro (1999), com modificações.

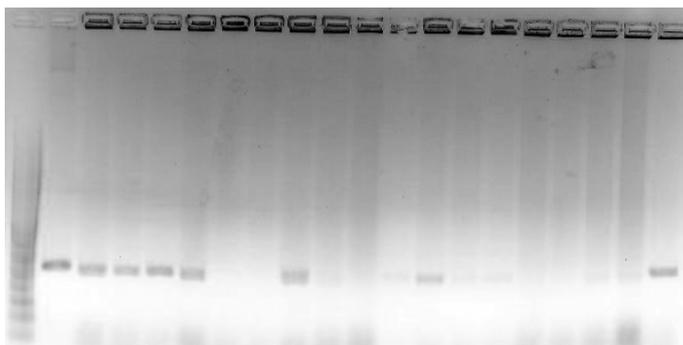


Figura 2 – Gel de agarose com produtos de PCR. Marcador 1Kb plus/INVITROGEN (1); Controle positivo ~600pb (2); Produto do PCR do vetor binário pRS037 amplificado a partir de DNA plasmidial extraído de colônias de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 (3 à 11) e DNA plasmidial amplificado a partir de colônias de *E. coli* linhagem DH5-alfa (12 à 20), com tamanho de ~600pb.

Após 4 semanas de regeneração, os brotos regenerados foram submetidos a luz UV para a visualização da fluorescência da proteína GFP nas plantas putativamente transformadas (Figura 3).

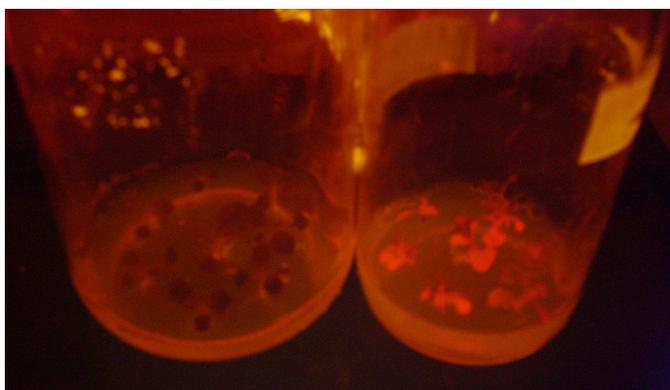


Figura 3 – Brotos regenerados putativamente transformados com vetor pRS037, submetidos a luz UV (direita) e putativamente não transformados (esquerda).

4. CONCLUSÃO

O protocolo descrito por Brasileiro (1999), com algumas modificações foi eficaz para a inserção do vetor binário pRS037 em cepas de *Agrobacterium tumefaciens* e *E.coli*. A utilização do vetor pRS037 contendo o gene *gfp*, é uma importante ferramenta que poderá ser utilizada nos processos de estabelecimento da transformação genética. O pRS037 contendo a proteína GFP mostrou-se um bom vetor de expressão para a utilização com outros cassetes contendo genes de interesse. A proteína GFP demonstrou-se um bom marcador, sendo facilmente visualizado e útil para confirmação rápida de experimentos de transformação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasileiro, A.C.M. & Dusi, D.M.A. (1999). In: Torres, A.C., Caldas, L.S. & Buso, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas 2**, 679-735.

Houdebine, L.M. Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 625-629 (2002).

Kost, T.A. & Condeary, J.P. Recombinante baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 428-433 (1999).

Sambrook, J., and D. W. Russel. 2001. **Molecular cloning**. p. 9.16-9.17. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Streatfield, S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 2-15 (2007).

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. & Hall, B.D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast *Nat. Biotechnol.* **298**, 347-350 (1982).