

Localização subcelular da proteína ASR3 de soja

Kaira Thalia da Rosa Nunes¹; Márcia Pinheiro Margis¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Introdução

Os genes *ASR* (do inglês, ABA [*Abscisic acid*], *stress and ripening*) codificam proteínas bifuncionais que podem ser chaperonas e fatores de transcrição. Esses genes são regulados ao longo do desenvolvimento das plantas, bem como em resposta a exposição a variados estresses de natureza abiótica. Apesar do significativo papel biológico desempenhado por essa família de proteínas, o compartimento subcelular no qual as ASRs de soja se localizam ainda não foi estabelecido. Em soja, a família gênica *ASR* é composta por três membros, sendo que um deles, *ASR3*, possui maior nível de expressão em raízes e folhas. Identificar a localização subcelular dessa proteína é o objetivo principal deste trabalho.

Materiais e Métodos

Uma amostra de 2 µg de RNA total, extraído de plântulas de soja (TRIzol® - Thermo Fisher Scientific), foi utilizada para a síntese de cDNA (M-MLV reverse transcriptase - PROMEGA) e *primers* específicos foram projetados (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para amplificar o gene *ASR3* de soja. O produto amplificado foi introduzido no vetor pENTR (Gateway® Technology - Thermo Fisher Scientific). Os clones positivos foram confirmados por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento, e o vetor contendo o gene *ASR3* foi recombinado (Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix - Thermo Fisher Scientific) com o plasmídeo p2YGW7,0. O plasmídeo resultante da recombinação (p2YGW7,0::ASR3) foi multiplicado em cultura líquida de *Escherichia coli*, extraído da bactéria (PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit - Thermo Fisher Scientific) e utilizado para fazer o experimento de localização subcelular em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Os protoplastos foram isolados do mesófilo de folhas de *Arabidopsis* e PEG (polietilenoglicol) 4000 foi utilizado para transfectar as células com o plasmídeo obtido, o qual permite a expressão da proteína *ASR3* de soja fusionada à proteína YFP. Um plasmídeo expressando somente a proteína YFP foi utilizado como controle. Após 24 horas, os protoplastos foram visualizados no microscópio confocal de fluorescência, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, com o objetivo de identificar o compartimento subcelular no qual a proteína *ASR3* se localiza.

Resultados e discussão

Os protoplastos foram extraídos do mesófilo de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 1) e transfectados com plasmídeo para expressão da proteína YFP fusionada à proteína *ASR3* de soja. Foi utilizado como controle o plasmídeo de expressão da proteína YFP sozinha. O resultado obtido (Figura 2) mostra que a proteína *ASR3* se encontra dispersa por todo o citoplasma. É possível que esta proteína também esteja localizada no núcleo, atuando como fator de transcrição e, conseqüentemente, regulando a expressão de diversos genes.

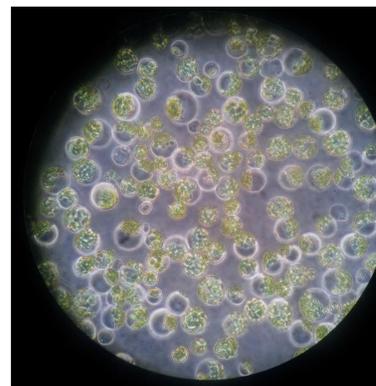


Figura 1: Protoplastos extraídos do mesófilo de folhas de *Arabidopsis thaliana*.

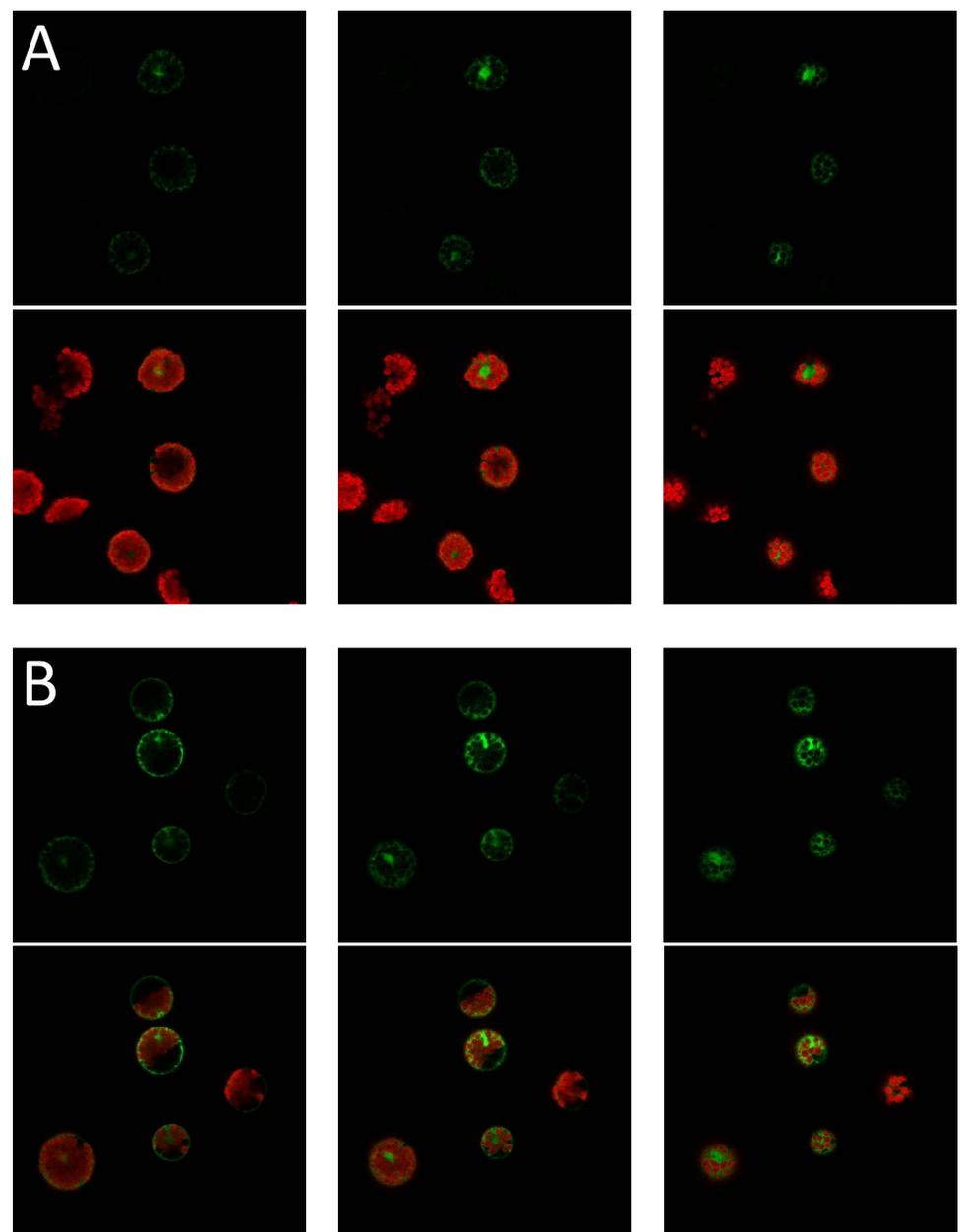


Figura 2: Protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis thaliana* expressando transientemente YFP ou YFP-ASR3. (A) O painel superior mostra as imagens da fluorescência da proteína YFP em de três campos, enquanto o painel inferior mostra a mesma imagem com a sobreposição da fluorescência vermelha dos cloroplastos. (B) O painel superior mostra as imagens da fluorescência da proteína de fusão YFP-ASR3, enquanto o painel inferior mostra a mesma imagem com a sobreposição da fluorescência vermelha dos cloroplastos.

Como perspectivas, pretendemos adaptar a técnica para o isolamento de protoplastos de soja (sistema homólogo), bem como fazer o uso de corante para o núcleo celular, comprovando dessa maneira, que a proteína *ASR3* também está localizada nesse compartimento subcelular, onde é possível regulador da expressão gênica.