

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM GENE CRY1A DE *Bacillus thuringiensis* EM *Escherichia coli*

BARZAN, Barbara B.; OLIVEIRA Rafael R.; ZANETTINI Maria H. B.; PASSAGLIA, Luciane M. P.

Laboratório de Genética Molecular Vegetal

barzan.barbara@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, entomopatogênica, aeróbica (ou anaeróbica facultativa), capaz de esporular e acumular proteínas na parede dos endósporos sob a forma de cristais.

As proteínas Cry são tóxicas para diversos ordens de animais, como coleópteros, lepidópteros, dípteros, himenópteros e alguns nematódeos. No entanto, essas proteínas são inócuas a humanos, outros vertebrados e plantas.

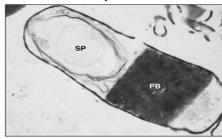


Figura 1: microscopia eletrônica de *Bacillus thuringiensis*, mostrando o esporo (SP) e o cristal de proteína (PB).

OBJETIVOS

Clonagem e caracterização de um gene pertencente à família *cryIA*, a partir de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* isolada de amostras de solo do Estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fragmento correspondente às regiões amino terminal e central da proteína Cry da linhagem UNI498 de *Bacillus thuringiensis*, de aproximadamente 1,9 Kb, foi clonado em vetor pGEM T-Easy. A ligação do fragmento, já clonado em PGEM, ao vetor de expressão pGEX 4T3 foi realizada através de digestão enzimática.

As clonagens foram confirmadas por PCR e sequenciamento do gene *Cry1A* utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas *Clustal X* e *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0*. As sequências também foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, utilizando os métodos de neighbour joining e UPGMA, com análises de bootstrap com 1000 repetições. O programa Mega, versão 2.1.0 foi utilizado para estas análises.

RESULTADOS

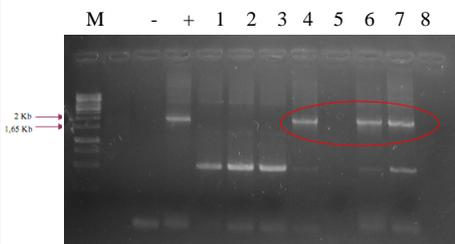


Figura 2: PCR da clonagem em pGEM T-Easy

M: marcador de peso molecular 1Kb Ladder Plus, - controle negativo da reação de PCR, + controle positivo da reação, 1-8 produto de PCR usando como molde extração de plasmídeo das colônias selecionadas.

M + - 1 2 3 4 5 6 7 8 9

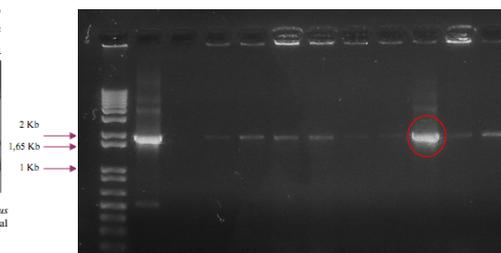


Figura 3: PCR da clonagem em pGEX 4T3.

M: marcador de peso molecular 1Kb Ladder Plus, - controle negativo da reação de PCR, + controle positivo da reação (DNA total de B), 1-9 produto de PCR usando como molde extração de plasmídeo das colônias selecionadas.

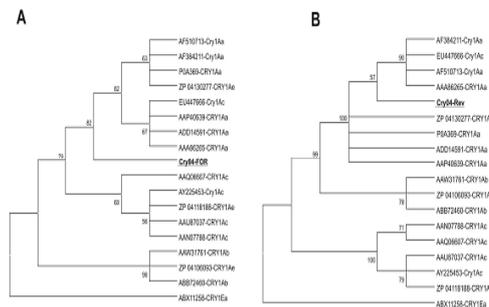


Figura 4: Árvores filogenéticas obtidas pelo método neighbour joining usando em (A) a sequência de aminoácidos correspondente à porção 5' e em (B) a correspondente à porção 3' do fragmento isolado de UNI498 e diversas sequências de proteínas *Cry1A* disponíveis no GenBank.

Os clones recombinantes pGEX-Cry1A tiveram sua expressão de proteínas induzida, entretanto, nenhum deles expressou a proteína Cry recombinante. No caso do vetor pGEX, a proteína recombinante Cry-GST teria um tamanho aproximado de 94 kDa.

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que o fragmento de 1854 pb isolado da linhagem Bt UNI498 contém um gene pertencente à subfamília Cry1Aa das enterotoxinas Cry.

PERSPECTIVAS

- Construção de iniciadores internos, visando o sequenciamento dos 132 nucleotídeos que faltam para a obtenção da sequência completa do fragmento de 1854 pb;
- expressão da proteína Cry1A;
- bioensaios com larvas de *A. gemmatilis*, para verificação da atividade inseticida da proteína isolada.

Financiamento: CNPq e FAPERGS