

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE GENES PARA 16S RNAr A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

EDER SOARES PIRES¹
KÁTIA REGINA DOS SANTOS TEIXEIRA²

1. Bolsista de iniciação Científica PIBIC/CNPQ/Embrapa Agrobiologia, Discente do curso de Biologia da UFRuralRJ;

2. Pesquisador da EMBAPA Agrobiologia – Laboratório de Genética e Bioquímica.

RESUMO: PIRES, E. S. e TEIXEIRA, K. R. dos S. Construção de bibliotecas de genes para 16S RNAr a partir de amostras ambientais. *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida, Seropédica, RJ: EDUR*, v. 24, n.2, p. 41-45, jul.-dez., 2004. A estratégia de clonagem e sequenciamento é uma das técnicas moleculares que permite avaliar a diversidade microbiana em amostras ambientais. O DNA extraído de amostras de solos cultivados com milho (*Zea mays*) e guandu (*Cajanus cajans*) em dois sistemas de produção (orgânico e convencional) foram amplificados utilizando iniciadores para o gene 16S e clonados. Clones selecionados foram utilizados para verificar a presença de inserto e validar a biblioteca de genes para 16S DNAr através da PCR. Os resultados obtidos revelaram a presença do inserto na maioria dos clones testados, porém a presença de uma colônia branca falso-positivas foi detectada.

Palavras-chave: Eletroforese, clonagem, PCR.

ABSTRACT: PIRES, E. S. and TEIXEIRA, K. R. dos S. Construction of 16s rRNA library from environmental samples. *Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida, Seropédica, RJ: EDUR*, v. 24, n.2, p. 41-45, jul.-dez., 2004. The cloning and sequencing strategy is one of the molecular techniques that allows us to evaluate the diversity in environmental communities. DNA extracted from soils cultivated with maize (*Zea mays*) and guandu (*Cajanus cajans*) in two production systems (organic and conventional), were amplified using primers for 16S genes and cloned. Selected clones were used to verify the presence of insert and to validate of the 16S rDNA gene library by PCR. The data obtained showed that the majority of clones tested had the insert but a false-positive white colony was also detected.

Key Words: Microbial diversity, soil DNA extraction, cloning.

INTRODUÇÃO

Estudos na área de Ecologia Molecular Microbiana vem se desenvolvendo desde a década de 80, utilizando diferentes técnicas para análise das comunidades microbianas a partir de amostras ambientais. O processo de extração de DNA do solo é a metodologia que mais tem sofrido modificações (OGRAM, 2000). Sabe-se que as comunidades microbianas do solo são bastante complexas, diversas e importantes, mas, pouco conhecidas devido às limitações de cultivo dos diversos organismos presentes. Uma estratégia utilizada para ampliar os conhecimentos dos componentes dessas comunidades, em um ambiente, é a análise filogenética a partir do sequenciamento de genes, que codificam a formação das subunidades do RNAr, principalmente da 16S DNAr. Alguns estudos de observação em microscópio têm mostrado que o número

de microorganismos que se tem cultivado é apenas uma porcentagem de toda diversidade existente (KUSKE *et al.*, 1997). Além de genes ribossomais, estudos da comunidade microbiana através de uso de genes funcionais também tem sido aplicados. Dentro destas comunidades, populações que desempenham um papel importante na dinâmica dos nutrientes também podem ser estudados. A fixação biológica de nitrogênio é um processo realizado por alguns microorganismos procarióticos, e genes funcionais desses grupos de organismos como o *nifH* tem sido usado para a caracterização filogenética de microorganismos (PICENO *et al.*, 1999 e SHAFFER *et al.*, 2000).

O processo de clonagem é uma estratégia que nos permite obter informações sobre a variabilidade, e também sobre as relações filogenéticas, dos organismos presentes no ambiente, possibilitando a construção de bibliotecas

ambientais de 16S DNAr. A clonagem de um gene consiste em inseri-lo em um vetor, que é um DNA capaz de se multiplicar dentro de um sistema vivo; um exemplo é um plasmídeo bacteriano. Considerando que uma colônia de bactérias pode corresponder a multiplicação de uma só célula, essa colônia constitui portanto um clone. Quando se faz uma extração de plasmídeo obtém-se então várias cópias desse gene para outras manipulações. A importância do conhecimento da biodiversidade de microorganismos, num determinado solo, vai desde a compreensão de sua dinâmica até a manipulação de algumas das suas propriedades biológicas, a fim de se obter retorno econômico. Este trabalho consistiu na construção de bibliotecas de 16S DNAr para avaliação da biodiversidade em amostras de solos oriundos da rizosfera de milho e guandu.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de amostras de DNA de solo: nessa etapa foram utilizados dois métodos para amostras provenientes da rizosfera de milho e guandu. O primeiro utilizou o kit comercial "MoBio UltraClean Soil" e contou com a seguinte metodologia: foram adicionados 500mg de solo a 2ml de solução de extração presente em microtubos do kit e misturado no vórtex. Em seguida, adicionou-se 60ml de solução 1 misturando por inversão três vezes. Foi adicionado 200ml de solução IRS e levado ao "bead beater" por 10 minutos na velocidade máxima. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 30 segundos e o sobrenadante transferido para outro tubo. Acrescentou-se 250ml de solução 2, vortex por 5 segundos e incubação a 0°C por 5 minutos. Posteriormente, centrifugou-se por 1 minuto e um volume de 450ml do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados

900ml de solução 3 e misturado em vortex por 5 segundos. A seguir, aproximadamente 700ml foram colocados em uma mini-coluna, e centrifugado por 1 minuto, e o líquido que ficou no fundo do tubo foi descartado. A esta mini-coluna foram adicionados 300ml de solução 4 e centrifugado por 30 segundos descartando o líquido do fundo do tubo. Centrifugou-se por mais 1 minuto para remover todo o líquido. A mini-coluna foi transferida para um novo microtubo e o DNA retido foi eluído pela adição de 50ml de solução 5 e 30 segundos de centrifugação. Finalmente, O DNA resultante dessa extração foi estocado a -20°C.

Foram usados 250mg de solo para a extração de ácidos nucléicos através do protocolo de extração utilizado na rotina do laboratório (DIREITO *et al.*, 2001 e SILVA *et al.*, 2003). **Reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase):** os DNAs obtidos, em ambos protocolos, foram amplificados utilizando o kit "PureTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham Biosciences). Ao tubo contendo a "bead" foram adicionados 5ml de DNA molde e 20ml de uma mistura contendo a combinação dos iniciadores Y1/Y3 ou 27f/1492r específicos para 16S DNAr. As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*. Os produtos da amplificação foram analisados por Eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1x). **Reação de ligação:** Foi utilizado o vetor do *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen). Cada reação continham 4ml de produto de PCR fresco, 1ml de solução de sais e 1ml de vetor TOPO TA. A ligação ocorreu durante 30 minutos a temperatura ambiente e os produtos foram utilizados para transformação. **Transformação:** *E. coli One shot TOP* 10 competentes foram descongeladas em gelo. Os 6ml da reação de ligação foram adicionados ao tubo contendo as células competentes do kit e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. O processo de choque térmico consistiu em incubar os tubos contendo as células

competentes e os produtos da ligação em banho-maria, a 42°C por 45 segundos, e imediatamente levadas a um banho de gelo por 2 minutos. A seguir, adicionou-se 250ml de meio SOC em cada tubo. Estes foram incubados a 37°C com agitação de 200rpm por 1 hora. **Seleção:** Todos os tratamentos de transformação foram selecionados em placas contendo meio LB sólido na presença dos antibióticos Canamicina (10mg/l) e Ampicilina (100mg/l) e do substrato para b-galactosidase X-Gal (80mg/l). Após incubação durante uma noite a 37°C, os clones obtidos nas placas foram analisados em relação a presença de cor azul e branca desenvolvida na presença de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosides). Clones de diferentes cores foram selecionados ao acaso para que fosse feita uma reação da PCR. **Preparo de colônias para PCR:** colônias brancas e azuis foram selecionadas e ressuspensas, individualmente, em 150ml de água destilada, esse processo repetiu-se duas vezes. Após a última lavagem, foram colocados 5ml de células em um tubo contendo 1ml de cada iniciador, um "bead" do kit *pure Taq* e 18ml de H₂O para PCR. Os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (TAE1x).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de extração de ácidos nucléicos a partir de amostras de solo, foi observado que o rendimento obtido pelo kit comercial *MoBio UltraClean Soil* foi menor do que o obtido pelo método convencional aplicado no laboratório (Figura 1). Neste caso, apesar da quantidade de solo inicial utilizado para a extração com o Kit ter sido o dobro do utilizado no protocolo do laboratório foi detectado que houve retenção de grande parte do material na etapa de purificação em coluna pelo Kit e conseqüentemente houve grande perda no

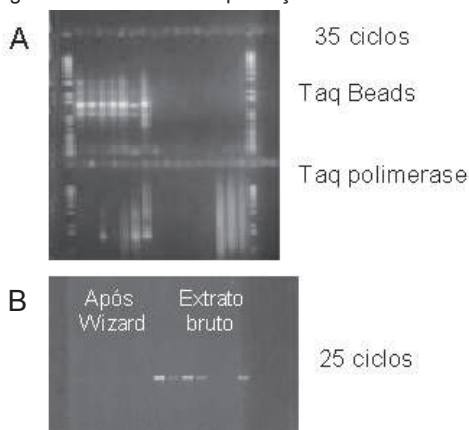
rendimento (dados não apresentados).



Figura 1. Extratos de DNA de amostras de solo rizosférico de milho (1 e 2) e guandu (3 e 4) obtidos pelo kit comercial e protocolo convencional. (P) Padrão de peso molecular 1 Kb *Ladder* e (C) DNA padrão 200 ng /ml.

Outra observação é que o método de extração pelo Kit resultou em diferenças no rendimento de material entre os solos cultivados, o que foi menos pronunciado nos extratos obtidos pelo método convencional (Figura 1). O DNA extraído foi submetido a dois tratamentos de amplificação padrão com 35 ciclos, utilizando a combinação dos iniciadores Y1/Y3 ou 27f/1492r para 16S DNAr, na presença de "Taq beads" ou da Taq polimerase (Figura 2). As amostras que utilizaram a "Taq beads" e combinação dos iniciadores Y1 e Y3 foram os que permitiram amplificação de todas os extratos de DNA (Figura 2A).

Figura 2. Produtos de amplificação do 16S DNAr em



diferentes condições de amplificação (A) e número de ciclos (A e B).

Com base nesses resultados foram

reproduzidas as condições de amplificação com os iniciadores Y1/Y3, utilizando extratos de DNA das amostras antes (Extrato bruto) e após purificação com o Kit Wizard (Figura 2B). O sucesso da transformação foi detectado pela interrupção do gene *lac-Z*, que codifica para a b-galactosidase, resultando na presença de colônias brancas no meio seletivo contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside). A presença de colônias azuis, que indicam que não houve interrupção do gene *lac-Z*, também foi observada e sugere que durante o processo de ligação pequenos produtos de PCR, ou a própria molécula do vetor, podem ter se ligado ao vetor e posteriormente foram inseridos e multiplicados em células competentes de *E. coli*. Para verificar a presença do fragmento para 16S DNAr após a clonagem, foi feita uma PCR de algumas colônias brancas (1 e 2 - controle +; 5, 6, 7, 8, 9 e 10 - clones obtidos de cada amostra ambiental) e azuis (3 e 4 - controle da ligação na ausência do inserto), selecionadas ao acaso, utilizando os iniciadores M13f e M13r, que pareiam com regiões localizadas próxima ao sítio de ligação do vetor. A ausência do inserto na colônia branca utilizada para PCR, correspondente a posição 5 na figura 3, indica que a interrupção do gene *lac-Z* foi independente da inserção do produto de PCR específico da 16 S DNAr.



Figura 3. Detecção do produto de amplificação da 16S DNAr em clones de bibliotecas de amostra ambiental.

CONCLUSÃO

A extração de DNA das amostras de solo utilizando o protocolo convencional foi mais eficiente do que a extração com o kit *MoBio UltraClean Soil*. Além disso, verificou-se que o DNA obtido com o protocolo convencional não necessitou de uma etapa adicional de purificação para produzir amplificação para 16S rDNA. Contudo, a presença de colônias azuis e brancas não foi suficiente para confirmar a presença do inserto no vetor após a seleção dos clones em meio seletivo. A PCR, com os iniciadores M13f e M13r, permitiu identificar a presença do inserto na maioria dos clones das bibliotecas ambientais, porém também revelou que algumas colônias brancas podem ser resultantes de ligações que não contem o inserto e são falso-positivas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio do CNPq (Projeto Universal e PIBIC) e Embrapa Agrobiologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIREITO, I. C. N.; SANTOS, S. T.; BALDANI, J. I. e TEIXEIRA, K. R. S. Otimização do protocolo de extração de DNA de amostras de solo e de amplificação parcial do gene *nifH* para avaliação de populações de bactérias diazotróficas. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo. Londrina – PR, Anais..., Paraná, 2001, p. 72.

HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K. and TIEDJE, J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, Michigan, USA, v 54, n 3, p. 703-711, 1987.

KUSKE, C. R.; BARNES, S. M. and BUSCH, J. D. Diverse Uncultivated Bacterial Groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. Applied and Environmental Microbiology, New Mexico, USA, v 63, n 9, p. 3614-3621, 1997.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: metodological challenges for the future. Soil biology & biochemistry, v. 32, p. 1499-1504, 2000.

PICENO, Y. M.; NOBLE, P. A. and LOVELL, C. R. Spatial and temporal assessment of Diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel eletrophoresis analysis. Microbial Ecology. New York, USA, v 38, p. 157-167, 1999.

SHAFFER, B. T.; WIDMER, F. and PORTEOUS, R. J. Temporal and spatial distribution of the *nifH* gene of N₂ fixing bacteria in forest and clear cuts in Western Oregon. Microbial Ecology. New York, USA, v 39, p. 12-21, 2000.

SILVA, I. C. L.; GOMES, M. B.; BALDANI, J. I. e TEIXEIRA, K. R. S. Determinação da capacidade de troca catiônica em Microamostras e sua aplicação na extração de DNA do solo. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 17 – 20 de Novembro 2003, Florianópolis – SC, 2003, MS 039. CD