



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE
PROMOTORES DE CAFÉ (*Coffea arabica* cv Mundo Novo)
ESPECÍFICOS DE FRUTO E UBÍQUOS**

LAYRA GABRIELLA PINTO

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Biociências, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

--

Dedico à minha família. :)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à minha família, pela educação, conselhos, suporte e dedicação, sem o qual não teria conseguido completar minha graduação. Mãe, pai, vó, Lê, Lu e Naty, amo muito vocês!

Agradeço ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela oportunidade de estágio e excelente orientação, que com certeza fará diferença em minha vida profissional. E aos companheiros de laboratório Juliana, Alessandra Vasconcelos, Alessandra Tenório, Carol, Bonsai, Rodrigo, Márcio, Fábio e Pit, pelo conhecimento, suporte e ajuda. Agradeço também aos demais professores do Departamento de Genética, que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação. À turma XLIII de Ciências Biológicas, especialmente Lê e Hava, pelos estudos, companheirismo e risadas garantidas, e às melhores companheiras de quarto que alguém poderia ter: Fê, Nariz, Bola e Tixa, que deixarão muitas saudades.

Ao meu namorado, Charles, pelo apoio, carinho e dedicação em todos os momentos.

Às minhas cachorras, pela alegria e amor incondicional.

Finalmente, agradeço à FAPESP pela bolsa concedida.

“Todos os fenômenos da natureza são meros reflexos das formas eternas”

Platão

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação esquemática da metodologia do <i>genome walking</i>	Pág. 22
Figura 02 – Representação esquemática do plasmídeo <i>pCAMBIA-1381z</i>	Pág. 25
Figura 03 - DNA genômico de café digerido com enzimas de restrição para construção das bibliotecas de <i>Genome Walking</i>	Pág. 32
Figura 04 – Produtos de amplificação oriundos do PCR secundário do GW para o gene <i>SP</i>	Pág. 33
Figura 05 – Análise da digestão de um dos clones recombinantes em vetor pGEM-Teasy (3 kb) com a enzima <i>EcoRI</i>	Pág. 34
Figura 06 – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado com a sequência do EST validado disponível no banco de ESTs do Café	Pág. 35
Figura 7 - Sequência consenso do promotor <i>SP</i>	Pág. 35
Figura 08 – PCR confirmatório do posicionamento do produto de GW do candidato com expressão específica em fruto em relação ao EST de origem	Pág. 37
Figura 09 – Amplificação da região promotora do gene <i>SP</i> clonada em pGEM-Teasy para posterior inserção no vetor pCAMBIA-1381z	Pág. 38
Figura 10 – Análise de digestão dos clones recombinantes contendo a região promotora do gene <i>SP</i> (1.453 pb) inserida em vetor pCAMBIA-1381z	Pág. 39
Figura 11 - Amplificação do fragmento promotor do gene <i>SP</i> para confirmação da inserção em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pág. 40
Figura 12 – Amplificação da região promotora do gene <i>14-3-3</i> para confirmação da clonagem em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pág. 40
Figura 13 – Amplificação da região promotora do gene <i>GAPDH</i> para confirmação da clonagem em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pág. 41

- Figura 14** – Discos foliares de *N. tabacum* após infecção por *A. tumefaciens*, em meio MS suplementado com BAP Pág. 42
- Figura 15** – Parte aérea de *N. tabacum* transgênico em meio MS suplementado com ANA. Observa-se o desenvolvimento dos primórdios radiculares. Pág. 42
- Figura 16** – PCR confirmatório da inserção do cassete de expressão do gene SP em plantas de tabaco. Pág. 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido naftaleno acético
BLAST	Basic local alignment search tool
BAP	Benzilaminopurina
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EST	Etiquetas de seqüências expressas
GW	Genome walking
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GUS	β -glucuronidase
g	Gramas
g	Força g
°C	Graus Celcius
kb	Kilobases
l	Litros
LB	Luria-Bertani
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
MS	Murashige & Skoog
ng	Nanogramas
nm	Nanometros
pb	Pares de base
%	Porcento
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVC	Cloreto de polivinila

p/v	Partes por volume
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SP	Storage Protein
TE	Tampão de Eluição

RESUMO

O projeto genoma do café disponibilizou para a comunidade científica uma série de informações que têm viabilizado a identificação e clonagem de genes de interesse bem como a identificação das principais seqüências envolvidas na regulação dos mesmos. Utilizando-se de etiquetas de seqüências expressas (EST) de café com padrão de expressão característico, o presente projeto teve como objetivo realizar a amplificação, clonagem e seqüenciamento de promotores de café. Num primeiro momento, as regiões promotoras de um gene com expressão específica em fruto de café e de outro com expressão ubíqua foram amplificadas por meio da técnica de *Genome Walking*, e os produtos resultantes inseridos no vetor *pGEM-Teasy* (Promega), para posterior seqüenciamento. Uma vez concluído o seqüenciamento dos clones obtidos, iniciou-se a construção dos cassetes de expressão no vetor *pCAMBIA-1381z* (Cambia). Os fragmentos promotores foram clonados em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS) visando a posterior caracterização funcional dos mesmos. Os cassetes de expressão obtidos foram então inseridos em *Agrobacterium tumefaciens*, e em seguida em plantas de tabaco visando os estudos funcionais.

Palavras chave: Promotores, Café, Expressão Gênica, Sequências Regulatórias.

ABSTRACT

The Coffee Genome Project made available to the scientific community relevant information that made practical the identification and cloning of important genes, as well as the identification of the major sequences involved on their regulation. The aim of the present study was to amplify, clone and sequence coffee promoters with specific expression patterns. For that, coffee ESTs which known expression profiles were employed. First, the promoter regions of coffee genes showing, respectively, fruit-specific and ubiquitous expression were amplified using the Genome Walking strategy. Amplified sequences were then inserted in the *pGEM-Teasy* vector (Promega) and sequenced. Once completed the sequencing, an expression cassette was constructed using the binary vector *pCAMBIA-1381z* (Cambia). These expression cassettes were cloned into *Agrobacterium tumefaciens*, and transgenic tobacco plants were generated aiming the functional characterization of these promoters.

Keywords: Promoters, Coffee, Gene expression, Regulatory sequences.

SUMÁRIO

Lista de figuras	Pág. 6
Lista de abreviaturas e siglas	Pág. 8
Resumo	Pág. 10
Abstract	Pág. 11
1. Introdução	Pág. 14
2. Objetivos	Pág. 19
3. Material e Métodos	
3.1. <i>Extração de DNA genômico de Coffea arabica cv Mundo Novo</i>	Pág. 20
3.2. <i>Construção das bibliotecas de Genome Walking</i>	Pág. 20
3.3. <i>Amplificação da seqüência promotora do gene SP</i>	Pág. 21
3.4. <i>Clonagem e sequenciamento dos produtos de amplificação do GW</i>	Pág. 23
3.5. <i>Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado</i>	Pág. 24
3.6. <i>Transformação de agrobactéria</i>	Pág. 26
3.7. <i>Obtenção de plantas de tabaco para transformação</i>	Pág. 28
3.8. <i>Transformação genética de tabaco</i>	Pág. 28
3.9. <i>Regeneração das plantas transformadas</i>	Pág. 29
3.10. <i>Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas</i>	Pág. 30
3.11. <i>Testes histoquímicos da atividade GUS</i>	Pág. 31
4. Resultados e Discussão	
4.1. <i>Extração de DNA genômico e amplificação por GW da região promotora de um gene candidato com expressão específica em fruto (SP)</i>	Pág. 31
4.2. <i>Clonagem e Sequenciamento do produto de amplificação obtido para o gene candidato com expressão em fruto (SP)</i>	Pág. 33

<i>4.3. Seqüenciamento da região promotora do candidato com expressão ubíqua (14-3-3)</i>	Pág. 36
<i>4.4. Confirmação do posicionamento do fragmento amplificado no GW</i>	Pág. 36
<i>4.5. Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado (gene SP)</i>	Pág. 37
<i>4.6. Transformação de Agrobactéria com os cassetes de expressão</i>	Pág. 39
<i>4.7. Transformação genética e regeneração de tabaco</i>	Pág. 41
<i>4.8. Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas</i>	Pág. 42
5. Conclusões e Perspectivas	Pág. 45
6. Referências Bibliográficas	Pág. 46
7. Anexos	
<i>7.1. Produção de células competentes de E. Coli</i>	Pág. 50
<i>7.2. Transformação de células competentes de E. coli DH5α</i>	Pág. 51
<i>7.3. Extração de DNA de tabaco</i>	Pág. 52

1. INTRODUÇÃO

O café é uma das três mais importantes mercadorias do comércio agrícola internacional apresentando alto valor econômico. Apesar de sua produção ser baseada em duas espécies, a *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, o gênero *Coffea*, pertencente à família *Rubiaceae*, possui mais de 100 espécies descritas (Vieira *et al.*, 2006). A espécie *Coffea arabica* L., assim chamada por ter sido descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1753, surgiu provavelmente do cruzamento das espécies *Coffea eugenoides* e *Coffea canephora*, hipótese embasada por testes com marcadores RAPD (Lashermes *et al.*, 1993). O cultivo da espécie *C. arabica* se iniciou a 500 anos, no Yemen, e chegou ao sudeste da Ásia aproximadamente em 1700. No começo do século 18, plântulas da espécie foram levadas da Indonésia até a Europa, e posteriormente para a América (Carvalho, 1945). Esta é a espécie que mais se destaca, especialmente devido a aceitação do mercado em relação ao seu sabor e aroma, o que faz com que 70% da produção mundial de café esteja associada a ela (Anthony *et al.*, 2001).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o café é um dos maiores geradores de riqueza do planeta. O Brasil é o maior exportador mundial, participando com aproximadamente seis bilhões de dólares nas exportações do agronegócio. As áreas cafeeiras estão concentradas no centro-sul do país, onde se destacam quatro estados produtores: Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a previsão atual de colheita no Brasil é de 47,2 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado em 2010, apresentando um acréscimo de 19,6 % quando comparado com a previsão de 2009, fato justificado pela bienalidade positiva e pelas condições climáticas favoráveis

durante o ciclo da cultura. Adicionalmente, o setor cafeeiro gera em torno de sete milhões de empregos.

Para se manter nessa condição, o Brasil possui uma base tecnológica condizente, a qual está atualmente focada na produção de grãos especiais para responder ao aumento da demanda por cafés de qualidade superior. Uma ferramenta imprescindível para melhorar ainda mais a sustentação tecnológica do setor cafeeiro é a biotecnologia. Na área vegetal, produtos de alto valor agregado como a cana de açúcar, o eucalipto, a soja, o café, entre outros, têm se beneficiado dos avanços proporcionados pela biotecnologia. Dentre os elementos que têm contribuído para tal destacam-se inúmeros genes identificados nos projetos de sequenciamento de genomas e transcriptomas que passaram a tornar viável a obtenção de plantas com características melhoradas via modificação genética. Esta possibilidade, quando associada às técnicas de melhoramento genético clássico, torna-se ainda mais útil em espécies perenes com importante valor econômico, como é o caso do café.

Num primeiro momento, o melhoramento genético clássico do café foi assistido pelos marcadores moleculares. Assim, tornou-se possível a identificação de um maior número de características de interesse agrônomo e sua associação em mapas genéticos, QTLs e seleção assistida. Em paralelo, a produção de plantas geneticamente modificadas passou a figurar como uma alternativa, pois essa abordagem tende a viabilizar o melhoramento de genótipos cada vez mais adaptados selecionados por métodos convencionais, pela introdução de um ou poucos genes que, em muitos casos, estão presentes em espécies distantes. Tais genes não poderiam ser transferidos via recombinação, o que obrigatoriamente acontece entre indivíduos sexualmente compatíveis. Entretanto, os avanços atuais nos programas de melhoramento são limitados especialmente pela variabilidade genética restrita, e no caso do café, pelo

quase total desconhecimento dos seus genes. Além disso, a autogamia da espécie *C. arabica* contribui para um crescente déficit de produção da cafeicultura frente às demandas atuais. Neste contexto, o seqüenciamento do código genético de diferentes organismos tem disponibilizado uma enorme quantidade de informação que pode ser usada para acelerar os programas de melhoramento genético de espécies de interesse. Os seqüenciamentos em larga escala para a produção de ESTs, e a posterior comparação destas com seqüências disponíveis em bancos públicos, tornou-se uma opção de escolha para a geração rápida e eficiente de dados que embasam a identificação de novos genes (Vieira *et al*, 2006). Por este motivo, diversos projetos de seqüenciamento de plantas de interesse econômico foram desenvolvidos no Brasil, como é o caso, entre outros, do SUCEST (Sugar Cane EST Genome Project) da cana de açúcar coordenado pelo grupo ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis) (Arruda, 2001).

O Projeto Genoma Brasileiro do Café foi, portanto, criado com o intuito de desenvolver ferramentas úteis para a identificação de novos genes e sua análise funcional, tanto em café quanto em outras espécies relacionadas, de maneira a permitir o avanço do conhecimento da estrutura do genoma do café. Esse projeto foi criado em 2002 a partir de uma parceria entre o Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) com 40 Universidades Públicas e Institutos de Pesquisa, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa (Instituto UNIEMP) (Vieira *et al*, 2006). Segundo dados publicados recentemente pela Embrapa-Café, o projeto já desvendou mais de 200 mil seqüências de cDNA e identificou cerca de 30 mil genes da planta. Agora, grande parte das seqüências obtidas está sendo depositada em um banco de dados internacional

de informações biotecnológicas, o *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/), que permitirá o livre acesso a elas.

Com a disponibilidade desta importante ferramenta genômica, genes envolvidos em diferentes vias metabólicas puderam ser identificados e disponibilizados para uso em transgenia. Para que isso seja concretizado, entretanto, novas ferramentas se fazem necessárias para viabilizar a correta expressão destes genes na planta. A obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido requer, por exemplo, a utilização de promotores altamente ativos (Rance *et al.*, 2002). Assim, a disponibilidade de seqüências regulatórias que permitam regular a expressão espaço-temporal dos transgenes se torna de grande valia, uma vez que muitas delas podem ser usadas em construções gênicas que visam obter transgênicos com características melhoradas para a produção comercial.

O uso de promotores com padrão de expressão conhecido permite direcionar a expressão dos genes de interesse nos órgãos-alvos nos quais estes promotores estejam ativos (Lauvergeat *et al.*, 2002), possibilitando assim um aprimoramento dos processos biotecnológicos. Nesse caso, a identificação de promotores órgão/tecido-específicos torna-se uma opção interessante, pois permitirá dirigir a expressão do transgene somente no tecido-alvo sem a desnecessária expressão constitutiva normalmente obtida com o emprego de promotores convencionais como, por exemplo, o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (Sanders *et al.*, 1987). Muitas seqüências regulatórias com tais características já foram identificadas e clonadas em diferentes espécies vegetais, como por exemplo, o promotor do gene que codifica uma faseolina de feijão que viabiliza uma expressão semente-específica (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1985); o promotor do gene *RBCS2* que contém elementos regulatórios que permitem a expressão em frutos jovens de tomate (Baum *et al.*, 1997); o promotor de um gene que codifica uma

glicosiltransferase que dirige a expressão em raízes de *Arabidopsis* (Vijaybhaskar *et al.*, 2008); os promotores TdPRPI de trigo e OsPRPI de arroz, que conferem expressão direcionada em tecidos presentes nas fases vulneráveis a ataques de patógenos (Kovalchuk *et al.*, 2010); entre outros. No caso do café, nosso grupo clonou recentemente um promotor capaz de dirigir a expressão em folhas que é responsivo a estresse abiótico e biótico (Brandalise *et al.*, 2009). Em nosso laboratório também foram validados diversos genes expressos especificamente em frutos de *C. arabica* e cujas seqüências podem ser usadas na clonagem de suas respectivas regiões promotoras. Ainda como exemplo de promotores clonados em café é possível citar a seqüência promotora do gene que codifica uma N-metiltransferase, uma enzima essencial na síntese de cafeína em plantas de *C. canephora* (Satyanarayana *et al.*, 2005), e um potente promotor grão-específico relacionado ao gene *CcDH2* também de *C. canephora* (Hinniger *et al.*, 2006).

Diante do exposto fica claro que a caracterização de promotores órgão/tecido específicos representa um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação genética (Sasaki, 2008). No caso do café, espécie alvo do presente projeto, a disponibilidade de promotores com tais características é bastante limitada, fato que, aliado aos dados já citados anteriormente, enfatiza ainda mais a necessidade de esforços de pesquisa nesse sentido. Esse estudo pretende, portanto, empreender experimentos que visam clonar e caracterizar promotores com padrão de expressão órgão (tecido)-específico em uma espécie agrícola de extremo interesse e importância econômica.

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivos:

- 1-) Realizar a amplificação das regiões promotoras de genes previamente validados como tendo, respectivamente, expressão específica em frutos de café ou ubíqua, para posterior clonagem e seqüenciamento.
- 2-) Construir cassetes de expressão dos promotores em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS).
- 3-) Obter plantas transgênicas de tabaco transformadas com os respectivos cassetes visando a análise funcional dos promotores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração de DNA genômico de *Coffea arabica* cv *Mundo Novo*

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998). Foram utilizados aproximadamente 2 g de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido com posterior solubilização em 9,4 ml do tampão de extração CTAB pré-aquecido [2% CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 1% PVP (polyvinylpyrrolidone K 40), 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2 % 2-mercaptoetanol e água Milli-Q para completar o volume final], seguido de incubação por 30 min a 65°C. Foram adicionados 8 ml de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) seguido de uma centrifugação a 14000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi coletado, e ao mesmo foi adicionado 600 µl de CIA, com posterior centrifugação nos mesmos parâmetros anteriores. O sobrenadante foi coletado e o DNA precipitado pela adição (2/3 do volume) de isopropanol gelado (-20°C), com incubação a -20°C por no mínimo 30 min, e centrifugação a 7500 rpm por 5 min. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado a 7500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA – pH8.0) contendo 10 µg/ml de RNase, sendo incubado em banho-maria a 37°C por aproximadamente 1 hora para eliminar contaminações com RNA. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro modelo NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific) e a integridade verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

3.2. Construção das Bibliotecas de Genome Walking (GW)

As bibliotecas de GW foram construídas a partir de alíquotas de DNA genômico (2,5 µg) digerido separadamente pelas enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, durante 16 horas a 37°C. Uma alíquota (5 µl) de cada reação foi aplicada em gel de

agarose 1% para verificar a qualidade da digestão, e o DNA restante foi purificado e ligado aos adaptadores seguindo as instruções do fabricante do kit *Universal GenomeWalker*[™] (Clontech).

3.3. Amplificação da seqüência promotora do gene *SP*

O protocolo de GW foi utilizado para amplificar a região promotora do gene com expressão em fruto de café (denominado *SP*). Para tal, foram utilizadas as bibliotecas produzidas anteriormente e o kit *Universal GenomeWalker*[™] seguindo as recomendações do fabricante (Clontech).

O *Genome Walking* é uma técnica que se baseia no isolamento de regiões localizadas à montante de uma seqüência de DNA conhecida (Devic *et al.*, 1997). Para tal são empregados oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e a uma seqüência conhecida (no nosso caso, do EST de café previamente validado).

Para a realização deste método, deve-se primeiramente construir bibliotecas de DNA genômico. Estas são obtidas quando alíquotas com alta qualidade de purificação do DNA de interesse são submetidas à restrição por diferentes enzimas que deixem extremidades abruptas, e posteriormente ligadas a regiões adaptadoras conhecidas (item 3.3). Após a construção das bibliotecas, o protocolo do GW consiste em dois *rounds* de amplificação por PCR por biblioteca. O PCR primário utiliza primers relacionados a um adaptador (AP1) e à seqüência conhecida do gene (GSP1). O produto deste PCR é então diluído e usado como base para o PCR secundário, que usa de primers mais internos, também relacionados a um adaptador (AP2) e à seqüência conhecida do gene (GSP2), segundo ilustração da Figura 1.

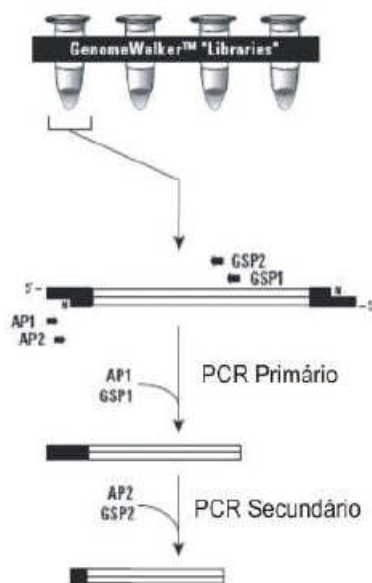


Figura 01 – Representação esquemática da reação de GW segundo o kit *Universal GenomeWalker* (Clontech). As extremidades em preto dos fragmentos de DNA representam os adaptadores (AP).

Para o desenho dos oligonucleotídeos gene-específicos (denominados SP1 e SP2, respectivamente) foi utilizada a seqüência de nucleotídeos do EST CA00-XX-FR2-061-H09-JE.F+ correspondente ao gene *SP* que codifica uma proteína de reserva (*storage protein*), o qual foi selecionado junto ao banco do genoma café (www.lge.ibi.unicamp.br/cafe) e validado como apresentando expressão específica em frutos pela doutoranda Carla Barsalobres (Barsalobres-Cavallari, 2009). Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio dos programas computacionais *Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000) e *GeneRunner*. Para tal, foram adotados critérios como tamanho entre 25-28 nucleotídeos e conteúdo em GC entre 40%-60%. Essas características asseguram que os oligos se anelem efetivamente às seqüências desejadas. O fabricante recomenda ainda a verificação da formação de possíveis estruturas secundárias e a existências de mais do que três guaninas e três citosinas nas últimas seis posições da região 3' do mesmo.

Como mencionado anteriormente, durante o GW foram realizados dois *rounds* de PCR. No PCR primário foram utilizados os oligonucleotídeos SP1 (5'AGAACCCTGTTTTTCAGCGGCTTGCATGGC'3) e AP1 (5'GTAATACGACTCACTATAGGGC3'). Uma alíquota diluída (1:50) dessa reação foi então utilizada como molde para a realização do segundo *round* de amplificação, utilizando os oligonucleotídeos SP2 (5'CCCTTGTGGCGTTCTTGGCTGGTCTTGG'3;) e AP2 (5'ACTATAGGGCACGCGTGGT3').

3.4. Clonagem e sequenciamento dos produtos de amplificação do GW

Os produtos de PCR derivados das reações de GW foram isolados em gel de agarose 1% e purificados. Esses produtos foram inseridos no vetor pGEM-Teasy (Promega) e transformados por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) em *Escherichia coli* cepa DH5 α , segundo anexo 8.2. O preparo das células competentes foi realizado como descrito no anexo 8.1. A mini-preparação por lise alcalina foi utilizada para a extração dos referidos plasmídeos (Sambrook *et al.*, 1989), e uma digestão com a enzima *EcoRI* foi realizada para verificar a presença dos fragmentos clonados nos tamanhos corretos, descartando assim os falsos positivos. Os transformantes validados foram estocados no freezer -80 °C em cultura permanente em meio Luria-Bertani (LB) líquido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura e 0,1 % p/v de NaCl em água deionizada, pH 7,0 (1,5 ml) contendo 15% de glicerol.

Para a mini-preparação por lise alcalina, uma colônia isolada foi inoculada em 3 ml de meio LB líquido contendo o antibiótico ampicilina . Após incubação por 16 horas a 37°C, aproximadamente 1,4 ml da cultura foi transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. O tubo foi então centrifugado a 14000 rpm durante 60

segundos, e o sobrenadante foi descartado para a adição de outros 1,4 ml da cultura de bactérias, com outros 60 segundos de centrifugação a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e as bactérias foram ressuspensas em 300 µl de solução P1 contendo RNase [Tris-HCl (pH 8) 50 mM; EDTA (pH 8) 10 mM; RNase 100 µg/ml] utilizando vortex. Após considerável homogeneização foram adicionados 300 µl de solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%). Os tubos foram agitados por inversão suave e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µl de solução P3 (Acetato de Potássio 3M pH 5,5 com ácido acético glacial). Os tubos foram agitados, e posteriormente incubados no gelo por 20 minutos. Decorrido esse tempo, realizou-se uma centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Logo após esta etapa foram coletados 800 µl do sobrenadante e o DNA precipitado pela adição de 400 µl de isopropanol absoluto em novo tubo. Os tubos foram incubados no gelo por 20 minutos e centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos adicionais. Os sedimentos de DNA plasmidial obtidos foram ressuspensos em água Milli-Q e armazenados a -20°C.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kit (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.5. Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado

O promotor do gene com expressão específica em fruto foi clonado no vetor *pCAMBIA-1381z* (Cambia), em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* que codifica a enzima β-glucuronidase (GUS). Este vetor binário foi especialmente desenhado para testar promotores em planta, uma vez que a região codificadora do gene

repórter é interrompida por um íntron (catalase) para evitar expressão inespecífica na planta, e por apresentar um gene de resistência à canamicina como agente de seleção bacteriano e um gene de resistência à higromicina para seleção em plantas (Figura 2).

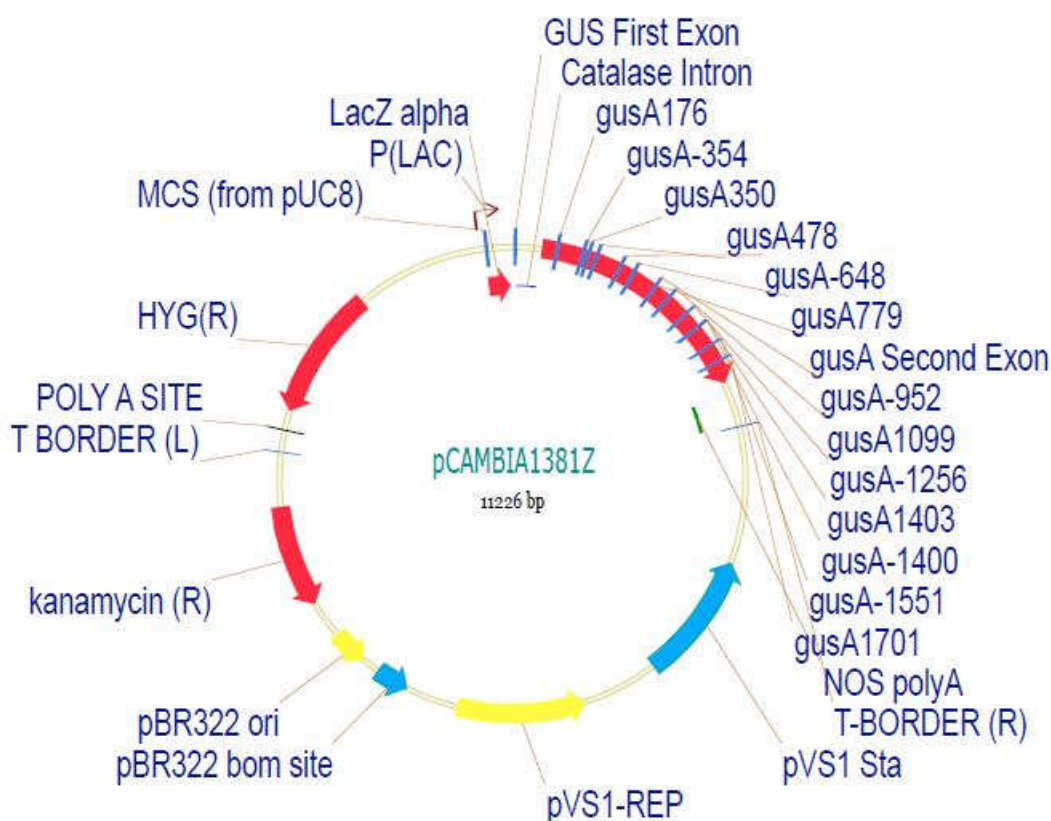


Figura 02 – Representação esquemática do vetor binário *pCAMBIA-1381z* (Cambia) utilizado na construção dos cassetes de expressão. (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.htm>).

Para tal procedimento, o fragmento promotor foi reamplificado por PCR utilizando oligos aos quais sítios para enzimas de restrição específicas (*Bam*HI e *Nco*I) foram adicionados. Na reação de PCR foram utilizados 2 µl de DNA plasmidial e 0.1 µM de cada oligonucleotídeo gene-específico. A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC 100 – MJ Research) adotando-se uma desnaturação prévia por 3 minutos a 94°C e um ciclo básico de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de

annealing de 63°C e 1 minuto a 72°C, o qual foi repetido 40 vezes. Um alongamento adicional de 10 minutos a 72°C foi realizado. Os produtos de amplificação foram purificados em gel e digeridos pelas enzimas de restrição descritas acima, e inseridos no vetor de transformação *pCAMBIA-1381z* (Cambia) igualmente digerido.

3.6. Transformação de agrobactéria

O cassete de expressão obtido anteriormente foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*. Como é possível notar na Tabela 1, duas outras construções contendo os promotores dos genes *14-3-3* e *GAPDH* que se encontravam disponíveis no laboratório (Barsalobres-Cavallari, 2009), também foram introduzidas em agrobactéria para posterior obtenção de plantas transgênicas. Esses genes têm expressão ubíqua em café.

Tabela 1 – Cassetes de Expressão introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens*.

Gene	Tecido - Especificidade	Informações
<i>SP</i>	Fruto específico	Clonado em <i>pCAMBIA-1381z</i> durante este estudo.
<i>14-3-3</i>	Ubíquo	Já disponível em <i>pCAMBIA-1381z</i> em laboratório.
<i>GAPDH</i>	Ubíquo	Já disponível em <i>pCAMBIA-1381z</i> em laboratório.

Para a obtenção de células competentes e transformação de *Agrobacterium tumefaciens* utilizou-se o protocolo descrito por Brasileiro & Carneiro (1998), com adaptações. Uma colônia isolada da cepa LBA4404 foi inoculada em 3 ml de meio LB líquido contendo 50 µg/ml de rifampicina e 300 µg/ml de estreptomicina, e incubada por 48 horas à 28°C sob agitação (225 rpm). Em seguida, 2 ml dessa suspensão foram transferidos para 50 ml de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos descritos acima. A cultura permaneceu sob agitação e temperatura controlada até se obter uma

absorbância a 600 nm entre 0,5 e 1,0 (aproximadamente 22 horas). Após alcançar a densidade de células necessária, a suspensão foi incubada em gelo por 15 minutos, e então centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de CaCl₂ 20 mM.

Um µg de DNA plasmidial foi então adicionado às células competentes, e essa suspensão foi incubada no gelo por 1 hora, sendo posteriormente congelada por 2 minutos em nitrogênio líquido, e em seguida incubada por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 0,5 ml de meio LB líquido sendo acrescido de um tempo de incubação de 2 horas, a 28°C, sem agitação. As células foram então plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select Agar* em água deionizada, pH 7,0) com os antibióticos descritos acima e adicionado de 50 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas por três dias a 28°C.

Para a confirmação da inserção, os plasmídeos recombinantes foram extraídos das colônias de *A. tumefaciens* recombinantes por mini-preparação por lise alcalina conforme descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989), e a verificação da inserção foi realizada por PCR. Os seguintes oligos gene-específicos foram empregados: SPBamHI (5'ATCGGATCCCGAAAGAAGTATCTACAACCTCAGAAGTTG'3) e SPNcoI (5'CCATCCATGGCTTGATTTCTTCTCTTTTTTCTCTTGGC'3) para o candidato fruto específico; 14-3-3 XhoI (5'AAACTCGAGATCTTAGTTGATGTGACC'3) e 14-3-3 NcoI (5'CTACCATGGATTGTCTTACTCAAATGTGAG'3) para o candidato 14-3-3; e GAPDH-XhoI (5'AAACTCGACTATGCCCTTCATTAATGATGC'3) e GAPDH-NcoI (5'CTACCATGGCATCTATGGCTTTAATTGAG'3) para o candidato GAPDH.

As amplificações foram realizadas em um termociclador (PTC 100 – MJ Research). As condições de amplificação consistiram de uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento à temperatura específica ao tipo de primer utilizado (SP à 63°C e 14-3-3 e GAPDH à 58°C) por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidas por mais 10 minutos de amplificação a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz UV. Os transformantes validados foram estocados no freezer - 80 °C em cultura permanente com LB líquido (1,5 ml) contendo 15% de glicerol.

3.7. *Obtenção de plantas de tabaco para transformação*

Foram obtidas plantas de tabaco selvagem (*Nicotiana tabacum* SR1) como resultado cultivo de sementes esterilizadas. Para a esterilização, as sementes passaram inicialmente por solução etanol 70% por 1 min, seguida de uma incubação em hipoclorito de sódio 50% com Tween-20 por 20 min, e posterior lavagem em água deionizada autoclavada por 5 vezes. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placa com meio Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1962) a 4.4 g/l, pH 5.7, contendo Phytigel (2.29 g/l).

3.8. *Transformação genética de tabaco*

A transformação das plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) foi realizada com base no protocolo descrito por Aragão *et al.* (2002). Para a preparação da cultura de *A. tumefaciens* foi inoculada uma colônia isolada da linhagem LBA4404 transformada com os cassetes de expressão contendo o promotor em estudo em 10 ml de meio líquido LB contendo 100 µg/ml de rifampicina, 50 µg/ml de estreptomicina e

50 µg/ml de hygromicina-B. A cultura foi incubada sob agitação a 100 rpm por 16 horas a 28°C até a fase exponencial de crescimento (absorbância a 600 nm igual a 1.5). Uma alíquota do inoculo foi então diluída até atingir uma absorbância a 600 nm de ~0.1 para então ser utilizada na co-cultura com os discos foliares de tabaco.

Em um fluxo estéril, discos foliares de aproximadamente 2 cm de diâmetro foram cortados de folhas jovens das plantas de *N. tabacum* SR1 cultivadas *in vitro* e, com o intuito de mantê-los hidratados, colocados em uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril. Um mililitro da cultura diluída de *A. tumefaciens* foi adicionado a 10 ml de LB líquido num tubo de centrifuga estéril de 50 ml. Com uma pinça estéril, os explantes foram colocados no tubo e a co-cultura foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos sob leve agitação. Transferiram-se os discos foliares para uma nova placa de Petri contendo papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactérias.

Os discos foliares co-cultivados foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido, pH 5.7, suplementado com 1 µg/ml de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), sendo as mesmas mantidas no escuro por 48 horas a 28°C, tempo necessário para a infecção da bactéria.

3.9. Regeneração das plantas transformadas

Após 48 horas de incubação no escuro, os explantes transformados foram transferidos para novas placas com meio MS sólido suplementado com 2 µg/ml de BAP, 300 µg/ml de cefotaxima e 50 µg/ml de hygromicina-B. Nesse meio, o tecido vegetal não transformado não irá apresentar regeneração já que não apresenta resistência a higromicina-B, enquanto que a cefotaxima irá inibir o crescimento da *A. tumefaciens*. Todas as placas foram mantidas em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Após o aparecimento de partes aéreas no material

regenerante, essas foram transferidas para frascos de vidro estéreis contendo meio MS adicionado dos agentes de seleção e do hormônio ácido naftaleno acético (ANA) para induzir o enraizamento.

Após o estágio de enraizamento, as plantas foram transferidas para copos de plástico de 300 ml contendo vermiculita e terra vegetal na proporção de 1:2, respectivamente, e acondicionadas em caixas plásticas parcialmente fechadas com filme PVC transparente, onde permaneceram por quatro dias para efeito de aclimação. As plantas com tamanho adequado foram então transferidas para vasos maiores e mantidas em estufa para posterior coleta de sementes e análise da geração R1.

3.10. Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas

A inserção dos cassetes de expressão com os promotores em estudo (SP, 14-3-3 e GAPDH) nas plantas regeneradas foi confirmada por PCR empregando-se DNA genômico extraído de folha conforme o protocolo descrito por Konieczny *et al.* (1993). No total obteve-se 15 plantas regeneradas para a construção contendo o promotor 14-3-3, 7 plantas para o promotor GAPDH, e 8 plantas para o promotor SP.

Para o PCR confirmatório foram utilizados 50 ng/μl de DNA genômico extraído de cada linhagem transgênica e de tabaco selvagem (WT), que foi usado como controle negativo. A amplificação foi realizada com uma temperatura de anelamento de 63°C para o candidato fruto específico e 58°C para os ubíquos, utilizando os oligonucleotídeos 14-3-3 XhoI (5'AAACTCGAGATCTTAGTTGATGTGACC'3) para o gene 14-3-3, GAPDH XhoI (5'AAACTCGACTATGCCCTTCATTAATGATGC'3) para o gene GAPDH, e SPBamHI (5'ATCGGATCCCGAAAGAAGTATCTACAACCTCAGAAGTTG'3) para o gene SP,

e o oligonucleotídeo reverso GUSR (5' GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC 3') complementar a região codificadora do gene repórter GUS.

3.11. Testes histoquímicos da atividade GUS

A atividade GUS foi localizada histoquimicamente empregando protocolo padrão descrito por Jefferson *et al.* (1987). Para tal, folhas das plantas transformadas foram incubadas em tampão de reação contendo 100 mM Na₂PO₄.H₂O, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 10 mM Na₂EDTA.2H₂O, 0,1 % Triton X-100 e 1 mM do substrato X-Gluc (50 mg/ml) sendo infiltradas a vácuo por 7 min. Após a infiltração, as folhas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após esse período, as amostras foram imersas em etanol 70 % por 24 h para retirar a clorofila, e então analisadas. Folhas de plantas transformadas com um cassete de expressão contendo o gene *uidA* sob controle de um promotor 35S foram usadas como controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de DNA genômico e amplificação por GW da região promotora de um gene candidato com expressão específica em fruto (SP)

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de amostras de folha de *Coffea arabica* cv Mundo Novo. A extração, adaptada para evitar a oxidação do tecido, se mostrou muito eficiente, pois resultou em um DNA puro, e em concentração alta (1,7 µg/µl), fato esse confirmado por quantificação em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

As bibliotecas de DNA genômico foram construídas a partir da digestão do referido DNA genômico pelas enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*. A

eletroforese de uma alíquota de cada reação demonstrou uma digestão mais adequada do DNA genômico na amostra correspondente a enzima *EcoRV* (Figura 2; linha 4). Tais bibliotecas foram utilizadas para realização das reações de PCR, primária e secundária, do GW.

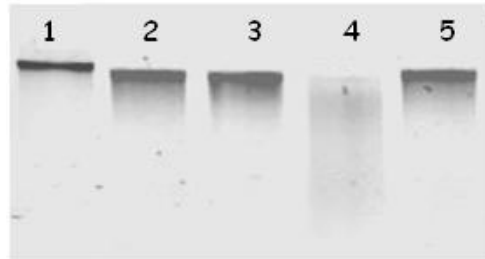


Figura 3 - DNA genômico de café digerido com enzimas de restrição para construção das bibliotecas de GW. **1.** DNA não digerido; **2.** DNA digerido com a enzima *DraI*; **3.** DNA digerido com a enzima *PvuII*; **4.** DNA digerido com a enzima *EcoRV*; e **5.** DNA digerido com a enzima *StuI*.

Uma vez construídas tais bibliotecas, os experimentos de GW foram iniciados com o objetivo de amplificar a região promotora do candidato correspondente ao EST CA00-XX-FR2-061-H09-JE.F+, que apresenta expressão específica em fruto de café (Barsalobres-Cavallari, 2009) e que codifica uma proteína de armazenamento (storage protein; SP). Oligos gene-específicos (SP1 e SP2) foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos desse EST que se encontrava depositada no banco de ESTs do café.

Em paralelo às duas rodadas de PCR do GW foram realizadas reações de controle negativo utilizando somente os oligos complementares aos adaptadores. Assim procedendo, os produtos de amplificação derivados dessas reações controles podem ser comparados aos amplificados nas reações contendo os oligos gene-específicos. Nesse caso, todos os produtos de tamanho semelhante são considerados falsos positivos, pois selecionam preferencialmente a população de fragmentos que contenham adaptadores nas duas extremidades.

Após a execução dos procedimentos descritos anteriormente, os produtos oriundos da reação de PCR secundário foram visualizados em gel de agarose 1%. Dois produtos de amplificação com tamanhos aproximados de 1400 e 3000 pares de base (pb), respectivamente, foram observados na reação correspondente à biblioteca *EcoRV* (Figura 4; linha 2).

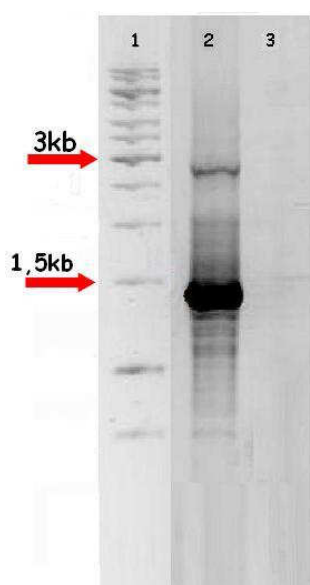


Figura 4 - Produtos de amplificação oriundos do PCR secundário do GW para o gene *SP*. **1.** Ladder 1kb; **2.** Produtos observados na reação da biblioteca *EcoRV*. **3.** Controle negativo. As setas indicam as bandas de 1500 e 3000 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

4.2. Clonagem e Sequenciamento do produto de amplificação obtido para o gene candidato com expressão em fruto (*SP*)

O fragmento de 1400 pb visualizado na Figura 4 foi purificado do gel de agarose usando o *Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen) e clonado no vetor pGEM-Teasy, segundo as recomendações do fabricante. Os clones recombinantes foram validados a partir de digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. Esta enzima libera o fragmento clonado no vetor pGEM-Teasy, e a presença do mesmo pode ser confirmada por eletroforese (Figura 4). Os clones analisados pela digestão apresentaram um fragmento cujo tamanho corresponde àquele do produto amplificado no GW.

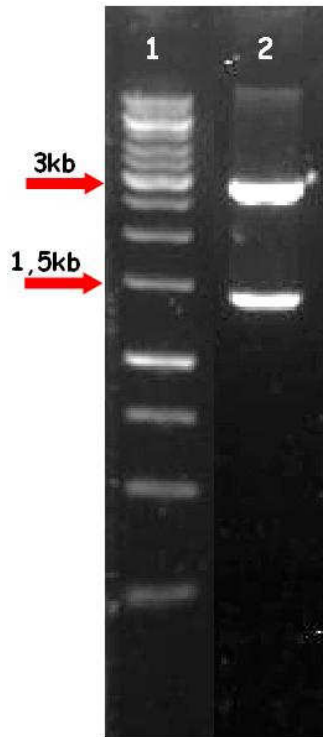
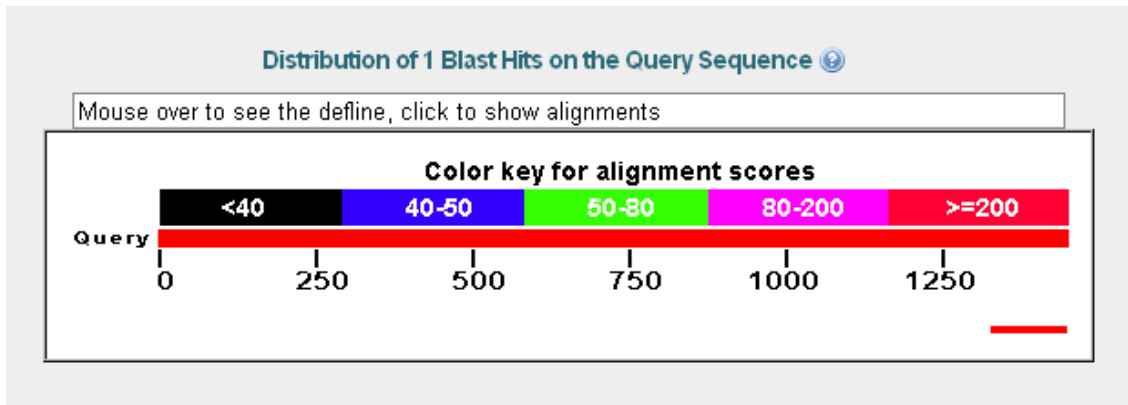


Figura 5 – Análise da digestão de um dos clones recombinantes em vetor pGEM-Teasy (3 kb) com a enzima *EcoRI* **1.** Ladder 1 kb; **2.** Clone do candidato fruto específico SP (1,4 kb). As setas indicam as bandas de 1500 e 3000 pb do marcador. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Três clones recombinantes foram então selecionados e submetidos a reações de sequenciamento. A análise da seqüência consensual obtida no banco de ESTs do café utilizando a ferramenta BLAST demonstrou que essa não apresenta similaridade com nenhuma seqüência depositada, indicando que o fragmento amplificado é uma região ainda não caracterizada do genoma do café. O mesmo foi observado quando tal consenso foi analisado no banco do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por outro lado, uma região de sobreposição entre a seqüência consensual obtida e a seqüência do EST de origem foi observada quando ambas foram alinhadas (Figura 6). O sequenciamento do fragmento clonado mostrou que o mesmo apresenta 1453 pb, conforme demonstrado na Figura 7.



```

>lcl|22389 est
Length=748

Score = 209 bits (113), Expect = 7e-58
Identities = 121/124 (97%), Gaps = 3/124 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 1331 ATTTTCCTGTTTTATGATCCCTTGAGATTTGGTTCCACCAATCAATACTGTCATTCAAAA 1390
          |||
Sbjct 1 ATTTTCCTGTTTTATGATCCCTTGAGATTTGGTTCCACCAATCAATACTGTCATTCAAAA 60

Query 1391 GCCAAG-AGAAAAAGAGAAGAAATCAAGATGAGCCAAGACCAGCCAAGAACGGGCCACA 1449
          |||
Sbjct 61 GCCAAGTAGAAAAAGAGAAGAAATCAAGATGAGCCAAGACCAGCCAAGAACG--CCACA 118

Query 1450 AGGG 1453
          |||
Sbjct 119 AGGG 122
  
```

Figura 06 – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado com a sequência do EST validado disponível no banco de ESTs do Café. A região alinhada correspondente à região de sobreposição dos mesmos. Query = Sequência amplificada por GW e clonada em pGEM-Teasy; Sbjct = EST validado (CA00-XX-FR2-061-H09-JE.F+). O alinhamento foi obtido empregando BLAST 2 Sequences (B12Seq).

```

CGACGGCCCCGGGCTGGTATCAAATAATCGAAAGAAGTATCTACAACCTCAGAAGTTGGAGGGTGGAAATAC
CTAAAATATAGTACGGAGTAATAAAAGAAATAAGATATTTCTTCTGTTTGGTTAGCATGATTTGCAAAAAA
CTTTTTAAATATTATTCAACATATATTTATAAAATATAACTTTTAACTTTTTTTTTTATCTTACATACGTTAC
GTCATAAAAGAATGTTATAGCACAATTTCTAAACAATTTTTTTTCAAATGATTTCCGATAGAAACACACCAT
ATATGGTTGACTTAAAAAATTTGGTGGTGAAGTACCTATGTCTTATAGCTTTTTTCCCCCTGCACCTTGTT
TTAATAAAGAAATCATCGGAATGAACAACCGAAAATGAAAAACCAAGTCGATAATTGATCAGTTTTTGGAG
ATACGACATGTGGCAACATGATTTTCATCGCGTCAGCCAAAAGTCAAACGGTGGGCCTTCTGTTCAAACCTT
CAAAACGATGCTCAGACAGAACCCCCCCCCCTCATCTTTTAAGAAGCCCCCAAAAAACAAAAA
TCTTTTTTAATTGACTCTTCTTTTTTGGCTATTTGTCAAAGTATAAACCTTTGTTTATATACACCAATA
GTATCAAATATATAATTACACCTCCATTTCTATTTTGATAGTTTTTGTCTTTTTCATTTATTTCTAAA
TTATAATCACTTTCTAATTGAAAATATAGTCAACTTTTAAATTTTTTTTTAAATATCTTATTTAATGTAC
TTTGTCAATAAGTGATTATAACCTACTTTTATTCACTAATTTCTTTGATTCATGTTTTGAATGGTGCAACTTT
CTATTAGTATTATTATTGTAATTAATGTAAGATATAATGATTAGTCATATCTTAATATTAATATAAGG
GTATTTTAAAGAAAATAATATATTAGATTGATTCTTCTTTACTAATTTTTATTAACATATGTAAAAAATA
AATTAACCTATTAAAAATGGGATGGAGGGAATATATATTTTTTACTAAAAAACATACAATTTACGAAA
TGTACACCAAAAATTATACATACTTGCACCATACATAGCCGTATCTGCCTCATTATCCGACCATCATGCC
AAGATTTAACAATTGCCACCTCCTGTATGGCTGTATCATAAGATTGATGTGTTCCATTTCTAAGCATGAC
ACTTATCATAAGATTGATGCGTTCCATTACTAAGCATGACACCTGTAATCGGTGCTGTCAACTCAACCTG
ACCTTGATCACTTCATCTCAGTACCATAAGAGGAACAAGTCCCTGGCCTCCTTGGCTAACAAAGGTCCCC
ATTTTCTGTTTTATGATCCCTTGAGATTTGGTTCCACCAATCAATACTGTCATTCAAAGCCAAGAGAA
AAAAGAGAAGAAATCAAGATGAGCCAAGACCAGCCAAGAACGGGCCACAAGG
  
```

Figura 7 – Sequência consensual de nucleotídeos do promotor do gene *SP* (1453pb) amplificado por GW.

4.3. Sequenciamento da região promotora do candidato com expressão ubíqua (14-3-3)

Em paralelo aos ensaios de GW visando amplificar e seqüenciar a região promotora do gene candidato com expressão específica em fruto, um fragmento correspondente à região promotora de um gene candidato com expressão ubíqua também foi seqüenciado. Esse candidato codifica a proteína 14-3-3 (EST CA00-XX-LV5-042-D11-RF) e sua região promotora (1.5 kb) havia sido previamente amplificada em nosso laboratório e clonada no vetor pGEM-Teasy.

Após inúmeras tentativas de obtenção de uma seqüência consensual para esse candidato, em análises mais detalhadas das seqüências obtidas, verificou-se que um elemento de transposição encontrava-se presente junto da região promotora amplificada. Por essa razão, optou-se pela utilização de um segundo produto de amplificação obtido para uma provável isoforma da 14-3-3 que se encontrava disponível em nosso laboratório (Barsalobres-Cavallari, 2009).

Além deste, outro candidato com expressão ubíqua foi selecionado para os testes. O gene escolhido codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) sendo correspondente ao EST CA00-XX-FB1-090-E04-SB.F+. A região promotora amplificada por GW tem 1459 pb. Esses dois fragmentos amplificados no GW já se encontravam inseridos no vetor binário *pCAMBIA-1381z* (Cambia) para as posteriores análises (Barsalobres-Cavallari, 2009).

4.4. Confirmação do posicionamento do fragmento amplificado no GW

Ainda com o intuito de confirmar o posicionamento do fragmento amplificado nos ensaios de GW para o candidato fruto-específico em relação ao EST de origem, um oligonucleotídeo complementar à porção 3' da região amplificada (SPconf -

5'CGTTCCATTACTAAGCATGACACC3') foi desenhado. Objetivando amplificar a região situada entre o fragmento clonado e a região codificadora do EST usado como base para o GW, uma reação de PCR utilizando DNA genômico de café e os oligos SPconf e SP2 (empregado no GW) foi realizada. Na Figura 8 é possível observar a amplificação de um produto de tamanho esperado (250 pb), dado que confirma que o fragmento amplificado e o EST de origem são correlacionados e encontram-se no mesmo locus. Como controle positivo da reação foi utilizado DNA plasmidial (pGEM-Teasy) contendo o produto de amplificação do GW e os referidos oligos (Figura 8; linha 2).

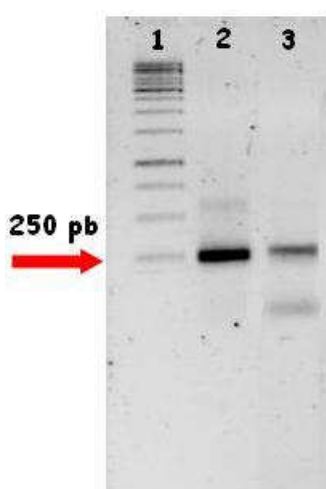


Figura 8 – PCR confirmatório do posicionamento do produto de GW do candidato com expressão específica em fruto em relação ao EST de origem. **1.** Ladder 1kb; **2.** Controle Positivo (DNA plasmidial); **3.** Amplificação empregando DNA genômico de café. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição do produto esperado.

4.5. Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado (gene SP)

A construção do cassete de expressão contendo o promotor do candidato com expressão em fruto em fusão ao gene GUS foi iniciada a partir da confirmação do posicionamento da sequência amplificada no GW pelos testes descritos nos itens 4.3 e

4.4. Para a construção do cassete de expressão foi escolhido o vetor de transformação *pCAMBIA-1381z* (Cambia) e os sítios de restrição *NcoI* e *BamHI*.

Para tal, o fragmento promotor inicialmente clonado em pGEM-Teasy foi amplificado por PCR usando-se os oligos SPBamHI (5'ATCGGATCCCGAAAGAAGTATCTACAACCTCAGAAGTTG'3) e SPNcoI (5'CCATCCATGGCTTGATTTCTTCTCTTTTTTCTCTTGGC'3), que pareiam nas porções 5' e 3' do promotor, e aos quais foram adicionados os sítios de restrição para as referidas enzimas (sublinhados). O produto resultante de tal amplificação pode ser visualizado na Figura 9.

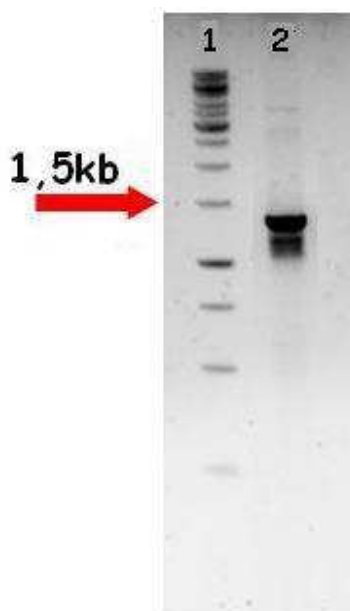


Figura 9 – Amplificação da região promotora do gene *SP* clonada em pGEM-Teasy para posterior inserção no vetor *pCAMBIA-1381z*. **1.** Ladder 1kb; **2.** Produto de amplificação obtido usando os oligos SPBamHI e SPNcoI (1.453pb). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

O fragmento indicado na Figura 9 foi purificado a partir do gel de agarose 1%, e em seguida digerido com as enzimas de restrição selecionadas. Realizou-se então uma reação de ligação que permitiu a inserção desse fragmento no vetor de transformação *pCAMBIA-1381z* igualmente digerido. A transformação em *E. coli* resultou em algumas

colônias positivas, das quais quatro foram selecionadas para análise. Após a extração dos plasmídeos recombinantes empregando mini-preparação por lise alcalina, a inserção do fragmento no vetor binário foi confirmada por digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI* (Figura 10).

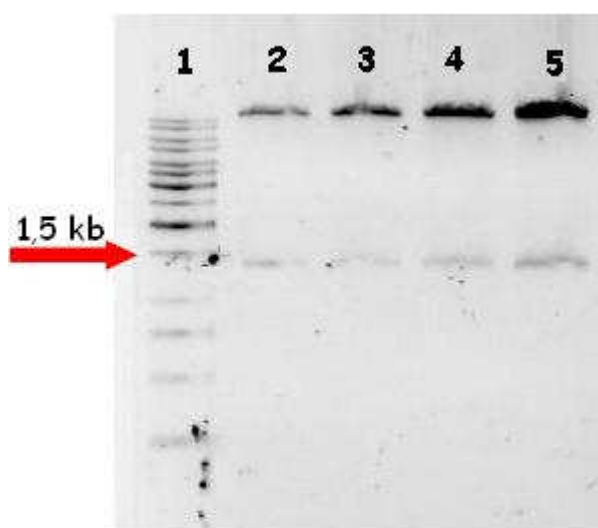


Figura 10 – Análise de digestão dos clones recombinantes contendo a região promotora do gene *SP* (1.453 pb) inserida em vetor *pCAMBIA-1381z* (11 kb). **1.** Ladder 1kb; **2-5.** Clones 5, 6, 7 e 9. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

4.6. Transformação de *Agrobactéria* com os cassetes de expressão

Uma vez construído o cassete de expressão contendo o promotor fruto-específico em *pCAMBIA-1381z*, a inserção deste em *Agrobacterium tumefaciens* foi empreendida. Em paralelo, os cassetes de expressão contendo os promotores dos genes candidatos com expressão ubíqua obtidos previamente também foram inseridos em *agrobactéria*.

A confirmação da inserção em *agrobactéria* foi realizada por PCR utilizando os oligos empregados na clonagem do fragmento promotor no vetor binário. Para tal, algumas colônias de cada construção foram selecionadas para extração de DNA plasmidial por lise alcalina.

Como se pode observar nas Figuras 11, 12 e 13, fragmentos de tamanho esperado foram amplificados nas amostras provenientes dos diferentes clones de agrobactéria selecionados, confirmando assim a transformação destas com o vetor binário contendo os 3 promotores em estudo. A confirmação destes dados deu subsídio para o início da transformação e regeneração de plantas modelo de tabaco, a fim de iniciar a caracterização funcional dos referidos promotores.

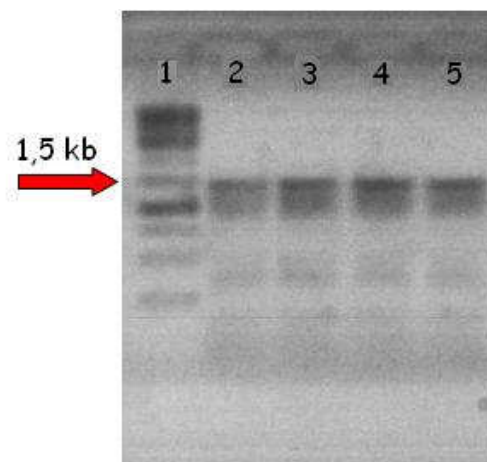


Figura 11 – Amplificação do fragmento promotor do gene *SP* (1453 pb) para confirmação da inserção em *Agrobacterium tumefaciens*. **1.** Ladder 1kb; **2 -5.** Clones recombinantes em *Agrobacterium*. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

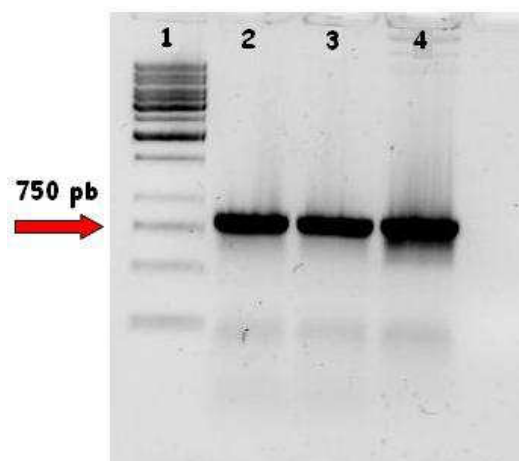


Figura 12 – Amplificação da região promotora do gene *14-3-3* (756 pb) para confirmação da clonagem em *Agrobacterium tumefaciens*. **1.** Ladder 1kb; **2-4.** Clones do candidato ubíquo 14-3-3 em *Agrobacterium*. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 750 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

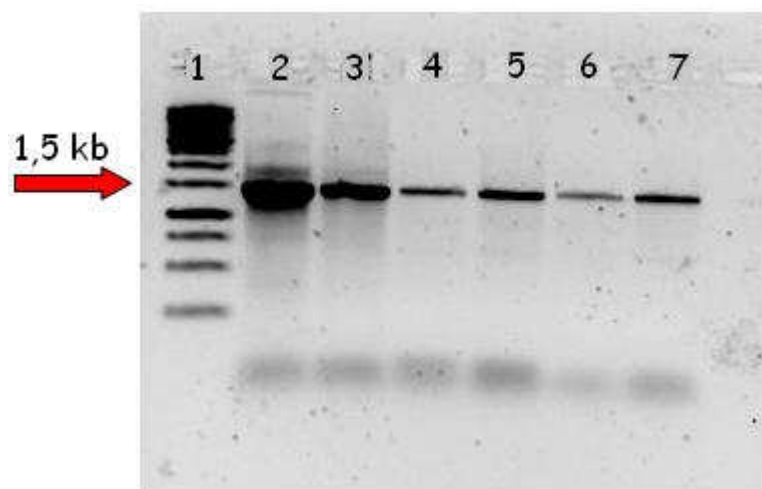


Figura 13 – Amplificação da região promotora do gene *GAPDH* (1459 pb) para confirmação da clonagem em *Agrobacterium tumefaciens*. **1.** Ladder 1kb; **2-7.** Clones do candidato ubíquo GAPDH em *Agrobacterium*. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

4.7. Transformação genética e regeneração de tabaco

Uma vez confirmada a inserção dos cassetes de expressão em *A. tumefaciens*, deu-se início aos ensaios de transformação dos discos foliares de tabaco. Após a co-cultura, os discos foliares de tabaco foram mantidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS adicionado dos agentes de seleção descritos anteriormente (Figura 14).

Após algumas semanas foi possível verificar a indução da parte aérea nos explantes. Nessa etapa transferiu-se a parte aérea para potes com meio MS adicionado do fitohormônio ANA para induzir o enraizamento, sempre em presença dos agentes de seleção. Após algumas semanas verificou-se o desenvolvimento do sistema radicular dos tabacos transformados (Figura 15). Nesse estágio, as plantas foram transferidas para copos plásticos e aclimatadas para o novo ambiente.

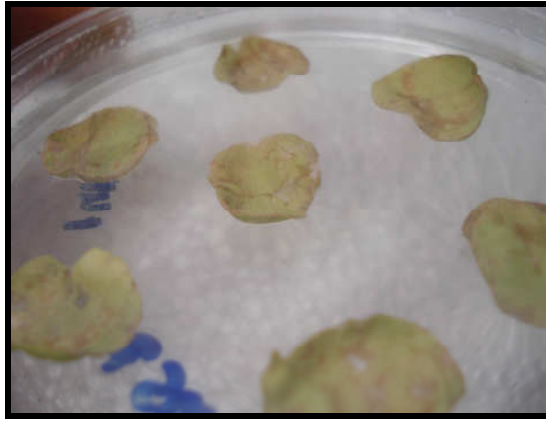


Figura 14 – Discos foliares de *N. tabacum* após infecção por *A. tumefaciens*, em meio MS suplementado com BAP.



Figura 15 – Parte aérea de *N. tabacum* transformada e mantida em meio MS suplementado com ANA. Observa-se o desenvolvimento dos primórdios radiculares.

4.8. Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas

Com o intuito de confirmar a inserção dos cassetes de expressão nas plantas transformadas foram realizadas extrações de DNA genômico de diferentes linhagens. A

extração seguiu o protocolo descrito por Konieczny (1993). Após a extração foram realizadas reações de PCR individuais com as temperaturas de anelamento específicas de cada um dos promotores em estudo.

No caso do promotor fruto específico, a reação de PCR utilizou a temperatura de 63°C na fase de anelamento, amplificando um produto de tamanho esperado nas amostras de DNA provenientes das diferentes linhagens transgênicas geradas, enquanto que o controle negativo não apresentou amplificação (Figura 16). Esse resultado confirma a inserção do cassete de expressão no genoma das diferentes linhagens transgênicas analisadas.

No caso dos promotores dos genes ubíquos utilizou-se inicialmente a temperatura de anelamento de 58°C, conforme amplificações anteriores. Porém, a presença de produto de amplificação não foi observada em ambos os casos. A fim de sanar o problema, esta temperatura foi ajustada, assim como outros parâmetros da reação, como tempo de duração das etapas de anelamento e de polimerização, e concentração de oligos e amostra de DNA. Mesmo com o ajuste destes parâmetros, não foi possível detectar produto de amplificação correspondente aos promotores inseridos nas plantas analisadas. Adicionalmente, objetivando verificar a integridade do DNA genômico extraído, reações individuais de PCR utilizando um par de oligos para amplificação de um gene endógeno de tabaco (*rgs-Cam*) foram realizadas, e neste caso produtos de amplificação com tamanho esperado foram detectados, indicando que o DNA extraído era de boa qualidade e encontra-se livre de qualquer tipo de contaminação. Como última alternativa, folhas das plantas transformadas com os cassetes de expressão contendo os promotores ubíquos foram submetidas ao teste histoquímico para verificar se o gene repórter GUS encontrava-se ativo, confirmando assim os eventos de transformação.

Entretanto, nenhuma coloração azul característica da atividade da enzima β -glucoronidase sobre o substrato X-Gluc pode ser detectada nos tecidos foliares analisados.

De maneira geral, esses resultados indicam que as plantas transformadas com os cassetes de expressão contendo os promotores dos genes *14-3-3* e *GAPDH* não são transgênicas, sugerindo que as mesmas correspondem a prováveis falsos positivos com resistência à higromicina. Por outro lado, a não detecção da atividade GUS pode estar relacionada a erros ocorridos durante a construção dos cassetes de expressão. Atualmente, esses cassetes estão sendo resequenciados para tentar identificar se a raiz do problema está efetivamente na construção dos mesmos.

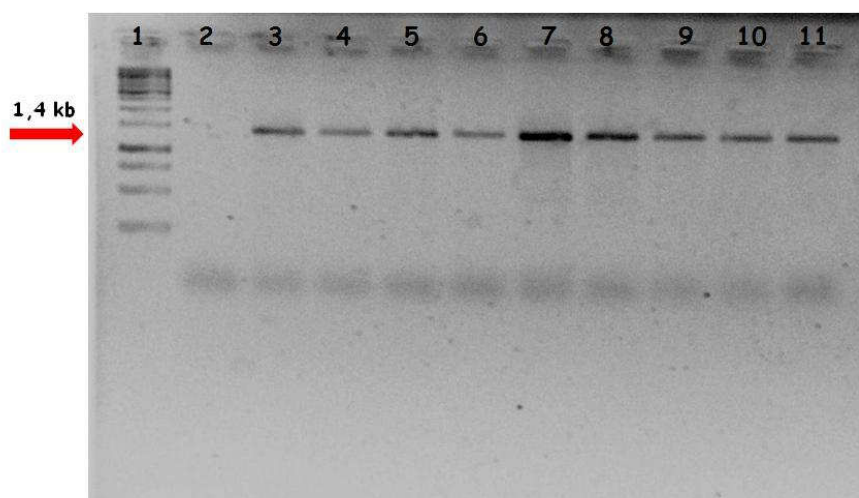


Figura 16 – PCR confirmatório da inserção do cassete de expressão do gene SP em plantas de tabaco. **1.** Ladder 1kb; **2.** Controle Positivo (DNA Tabaco Selvagem); **3-11.** DNA genômico das plantas de tabaco 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13 e 14, contendo o gene fruto específico SP (1,4 kb). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição do produto esperado.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os objetivos propostos nos presente trabalho, que envolviam a amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões promotoras de genes com tecido especificidade, construção dos cassetes de expressão em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS), e obtenção de plantas transgênicas de tabaco, foram alcançados a contento.

A despeito dos problemas surgidos com os promotores ubíquos, a metodologia aplicada para os procedimentos foi muito bem absorvida e a experiência adquirida durante a realização do presente trabalho foi de grande valia. Esforços estão sendo realizados para localizar a fonte do problema ocorrido com tais promotores para que as análises funcionais possam ser retomadas.

Com relação ao candidato com expressão específica em fruto, pretende-se empreender também a transformação de plantas de tomate, uma vez que essa espécie apresenta fruto em baga, assim como o café. Para tal, um novo cassete de expressão foi construído empregando-se o vetor binário pPR97 (Szabados, 1995) que confere resistência a canamicina (pré-requisito para a seleção de plantas transformadas de tomate). Esse vetor apresenta o gene repórter GUS e permite a inserção de fragmentos promotores, pois apresenta um sítio múltiplo de clonagem localizado acima do gene repórter. O novo cassete de expressão obtido foi inserido na cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* para posterior transformação de tomate.

Ainda em continuidade, as análises moleculares das plantas de tabaco transformadas com o promotor fruto-específico serão finalizadas, e as análises funcionais visando validar completamente a atividade dos promotores em estudo através de ensaios histoquímicos de GUS serão empreendidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P. *et al.*. (2001). Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, 118 : 53-65.
- ARAGÃO F. J. L., SANTOS M. O., MORAIS L. S., ROMANO E. (2002). Metodologias para transformação genética de Plantas-Modelo. Circular Técnica 15, ISSN 1516-4349, EMBRAPA, Brasília, DF.
- ARRUDA, P. (2001) Sugarcane transcriptome: a landmark in plant genomics in the tropics. In: Arruda P (ed), Special volume on Sugarcane Transcriptome. *Genet. Mol. Biol.* 24:1–296.
- BAUM, K.; GRÖNING, B.; MEIER, I. (1997). Improved ballistic transient transformation conditions for young tomato fruits allow identification organ-specific contributions of I-box and G-box to the RBCS2 promoter. *Plant Journal*, 12 : 463-469.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F. Identificação e caracterização de promotores de genes de café (*Coffea arabica*). Tese de doutorado, UNESP, 2009.
- BRANDALISE, M., SEVERINO, F.E., MALUF, M.P., MAIA, I.G. (2009). The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. *Plant Cell Reports*, 28: 1699-1708.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (1998). Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: Manual de transformação genética de plantas. Ed.Embrapa, Brasília. 6: 93-109.

- CARVALHO, A. (1945). Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. Bol. Superint. Serv. Café. 21:174-180.
- DEVIC M.; ALBERT S.; DELSENY M.; ROSCOE T.J. (1997). Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 1-9.
- FERREIRA E. M. & GRATTAPAGLIA D.(1998). Extração de DNA genômico total de plantas. Em: *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa, p.121-139, 3ª ed.
- GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIM, R. C. (2000). Regulation of gene transcription in: *Modern Genetic Analysis*. 3rd edition, W. H. Freeman and Company, New York, NY.
- HINNIGER, C.; CAILLET, V., MICHOUX, F. et al. Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. *Annals of Botany*, v.97, p.755-765, 2006.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.V. GUS fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile marker in higher plants. *EMBO J.*, v.6, p.3901-3907, 1987.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based makers. *The Plant J.*, 4 (2) : 403-410.
- KOVALCHUK, N., LI, M., WITTEK, F., REID, N., SINGH, R., SHIRLEY, N., LOPATO, S. (2010). Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal* 8, pp. 47–64.
- LAUVERGEAT, V., RECH, P., JAUNEAU, A., GUEZ, C., COUTOS-THEVENOT, P., GRIMA-PETTENATI, J. (2002). The vascular expression pattern directed by the

- Eucalyptus gunnii cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Molecular Biology*, 50: 497-509.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; MARMEY P.; CHARRIER, A. (1993). Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40: 91-99.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- OHLER, U.; NIEMANN, H. (2001). Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. *Trends in Genetics*, 17: 56-60.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. E. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd e., Cold Spring Harbor Laboratory.
- SASSAKI, F. T., (2008). *Isolamento e Caracterização de Promotores Órgão-específicos a partir de informações do Banco FORESTs (Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium) - Dissertação de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências. Botucatu, São Paulo. Brasil.*
- SATYANARAYANA, K.V.; KUMAR, V.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G.A. Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. *Journal of Biotechnology*, v.119, p.20-25, 2005.
- SZABADOS, L., CHARRIER, B., KONDOROSI A., BRUIJN, F. J., RATET, P., (1995). New plant promoter and enhancer testing vectors. *Molecular Breeding*, 1: 419-423.
- SENGUPTA-GOPALAN, C.; REICHERT, N.A.; BARKER, R.F.; HALL, T.C.; KEMP, J.D. (1985). Developmentally regulated expression of a bean beta-phaseolin gene in tobacco seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3320-3324.

- RANCE I.; NORRE F.; GRUBER V.; THEISEN M. (2002). Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. *Plant Science*, 162: 833-842.
- ROZEN S., SKALETSKY H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.*, 132: 365-86.
- VIJAYBHASKAR V.; SUBBIAH V.; KAUR J.; VIJAYAKUMAR P.; SIDDIQI I.; (2008) Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter; *J. Biosci.* 33 : 185–193.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE A.C; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H.A.; METHA, A. (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1): 95-108.

7. ANEXOS

7.1. Preparação de células competentes de *Escherichia coli*

- 1) Fazer um pré-inoculo de uma colônia de *E.coli* em meio SOB. Crescer *overnight*.
- 2) Na manhã seguinte, passar uma alíquota para 50 ml do mesmo meio. Crescer a 37°C.
- 3) Acompanhar a absorbância (600 nm) até que a mesma alcance 0,5-0,6 (cerca de 2 horas), e então incubar no gelo. Adicionar à cultura 1 ml de MgCl₂ 1 M gelado, e incubar por 15 minutos.
- 4) Centrifugar a 4500 rpm, a 4°C por 12 minutos.
- 5) Descartar o sobrenadante, ressuspender o sedimento bacteriano em 20 ml de solução RF1 gelada, e deixar em repouso no gelo por 15 minutos.
- 6) Centrifugar a 4500 rpm, a 4°C por 12 minutos.
- 7) Descartar o sobrenadante, ressuspender gentilmente o sedimento em 2 ml da solução RF2 gelada, e aliquotar 50 µl em eppendorfs gelados.
- 8) Congelar em banho de álcool e gelo seco, ou em nitrogênio líquido, e manter em freezer -80°C.

Soluções:

Meio SOB (100 ml)
2,4 g de Triptona
1 g de Extrato de Levedura
1,7 ml de NaCl 1 M
500ul de KCl 1 M
1 ml de MgCl ₂ 1 M após autoclavar.

Meio RF1 (50 ml)
5 ml de KCl 1 M
2,5 ml de MnCl ₂ 4 x H ₂ O 1 M
3 ml de KAc 0,5M pH 6,9
0,5 ml de CaCl ₂ 2 x H ₂ O 1 M
7,5 ml de glicerol 15% p/v
Ajustar pH para 5,8 e filtrar

Meio RF2 (50 ml)
1 ml de Na-MOPS 0,5 M pH 7
0,5 ml de KCl 1 M
3,7 ml de CaCl ₂ 2 x H ₂ O 1 M
7,5 ml de Glicerol 10%

7.2. Transformação de células competentes de *E. coli* DH5a

- 1) Colocar o produto da ligação no tubo contendo as células competentes de *E. coli*;
- 2) Incubar no gelo por 30 min;
- 3) Incubar a 42°C por 1,5 min exatamente;
- 4) Rapidamente transferir para o gelo e incubar por 5 min;
- 5) Adicionar 500 µl de meio LB líquido ao tubo;
- 6) Incubar a amostra a 37°C sob agitação (100-150 rpm) por 50 min (A_{600} entre 0.5-1.0);
- 7) Centrifugar o tubo rapidamente para concentrar as células, e retirar o excesso de meio.

- 8) Ressuspender e plaquear 100 µl da suspensão de células em placa de Petri contendo meio LB sólido adicionado dos antibióticos específicos.
- 9) Incubar a 37°C até o crescimento de colônias isoladas (*overnight*). Coletar algumas colônias transformadas para conferir a integridade do vetor transferido.

7.3. Extração de DNA genômico de tabaco

- 1) Macerar o tecido em nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5 ml até transformar o mesmo em pó;
- 2) Adicionar 500 µl de tampão de extração;
- 3) Adicionar 70 µl de SDS 10%;
- 4) Incubar a 65°C por 10 min;
- 5) Adicionar 130 µl de acetato de potássio 5 M;
- 6) Incubar 5 min no gelo;
- 7) Centrifugar a 15000 g por 10 min;
- 8) Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 ml contendo 640 µl de álcool isopropílico e 60 µl de acetato de sódio 3 M;
- 9) Incubar a -20°C por 10 min;
- 10) Centrifugar a 15000 g por 15 min
- 11) Redissolver o sedimento em 200 µl de Tris 50 mM pH 8 e EDTA 10 mM pH 8;
- 12) Centrifugar a 15000 g por 5 min;
- 13) Transferir o sobrenadante para um tubo contendo 20 µl de acetato de sódio 3 M e 440 µl de etanol;
- 14) Incubar a -20°C por 10 min;
- 15) Centrifugar a 15000 g por 5 min;

16) Lavar com 500 μ l de etanol 70%;

17) Descartar o sobrenadante, e dissolver o sedimento em 50 μ l de água.

Tampão de Extração
100 mM Tris pH 8
50 mM EDTA pH 8
500 mM NaCl
10 mM Mercaptoethanol