

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**PROSPECÇÃO DE GENES DE CELULASE
PRESENTES EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA**

Gisele Regina Rodrigues
Bióloga

Orientador: Prof.Dr João Martins Pizauro Junior

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**PROSPECÇÃO DE GENES DE CELULASE
PRESENTES EM BIBLIOTECA METAGENÔMICA**

Gisele Regina Rodrigues
Bióloga

Orientador: Prof.Dr João Martins Pizauro Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2008

Rodrigues, Gisele Regina

R696p Prospecção de genes de celulase Presentes em biblioteca metagenômica / Gisele Regina Rodrigues. Jaboticabal, 2008. xiii, 50 g. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Banca examinadora: Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Haroldo Alves Pereira Junior

1. Microbiologia. 2. Biologia Molecular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:577

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gisele Regina Rodrigues – Nascida em 22 de dezembro de 1981, no município de Jaboticaba, Estado de São Paulo. Ingressou no curso de Ciência Biológicas em 2001 na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Catanduva (FAFICA) sendo transferida para o Centro Universitário de Araraquara (UNIARA) no ano de 2003, onde obteve o título de Bióloga em 2005. Em março de 2006 iniciou o mestrado em Microbiologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”(UNESP- FCAV).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Dr. João Martins Pizauro Junior e a Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, por terem cedido os laboratórios L.E.A e LBMP

para realização do meu trabalho e por todo ensinamento que me proporcionaram.

Aos técnicos de laboratório Fátima Harnich e João Carlos Campanharo que me auxiliaram sempre que necessitei.

Aos amigos Flavio, Diogo, Gustavo, Vanessa, Tiago, Simone, Mariana, Thaís, Luciano, Douglas, Ana Rita e a todos os outros companheiros de trabalho que sempre estiveram presentes para ajudar durante todo o período de pesquisa.

Meus amigos de quase toda a vida Ariane, Beatriz, Bárbara, Fernanda Andrade, Fernanda Lopes, Fernanda Queiros, Fernandinha, Lizandra, Carolina, Viviane, que direta ou indiretamente sempre me deram força para conseguir superar as dificuldades.

E aos meus pais Roberto e Elenice e minha irmã Kele que me deram apoio, suporte durante toda minha vida.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

UNIDADES-----	3
RESUMO E PALAVRAS CHAVE -----	4
SUMMARY AND KEY WORDS-----	5
I- INTRODUÇÃO -----	6
II-REVISÃO DA LITERATURA-----	8
2.1-Diversidade Microbiana do Solo e Metagenômica -----	8
2.2- Celulase -----	10
III-MATERIAIS E MÉTODOS -----	14
3.1- Obtenção do controle positivo -----	14
3.2- Biblioteca metagenômica -----	14
3.3-Teste bioquímico dos clones da biblioteca-----	15
3.4-Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores degenerado-----	15
3.5-Extração do DNA controle positivo-----	16
3.6-Quantificação do DNA controle positivo -----	17
3.7-Otimização da reação de PCR-----	17
3.8-Reação de PCR do “pool” -----	18
3.9- Extração do DNA e PCR da placa 13 -----	18
3.10-Teste bioquímico dos clones individuais-----	19
3.11- Extração e quantificação do DNA cosmidial-----	20
3.12- Sub-biblioteca e cosmídeo em vetor plamídeo-----	20
3.12.1- Reação de nebulização-----	20
3.12.2- Precipitação e quantificação do fragemento do DNA-----	21
3.12.3- Reação de reparo das extremidades do fragemento de DNA-----	21
3.12.4- Reação de fosforilação -----	22
3.12.5- Seleção do tamanho do inserto -----	22
3.12.6- Eluição do fragmento de DNA -----	23

3.12.7- Reação de ligação -----	23
3.12.8-Tansformação das células competentes-----	24
3.12.9- Coleta e estoque dos clones -----	24
3.13- Extração e Quantificação e dos clones da sub-biblioteca -----	25
3.14- Reação de sequenciamento dos clones da sub-biblioteca -----	26
3.15- Análise das seqüências geradas através de ferramentas da bioinformática-----	26
 IV-RESULTADO E DISCUSSÃO -----	 27
4.1- Teste bioquímico dos clones da biblioteca - -----	27
4.2- Extração e quantificação do DNA <i>Bacillus subtilis</i> -----	28
4.3- Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados -----	28
4.4- Reação de PCR com “pool” do DNA cosmidial -----	30
4.5- Extração e quantificação do DNA cosmidial da placa 13 -----	30
4.6-Teste bioquímico dos clones individuais -----	33
4.7-Extração do DNA cosmidial -----	34
4.8- Sub-biblioteca de cosmídeo em vetor plasmídeo -----	35
4.9- Sub_clonagem e análise dos resultados -----	38
 V-CONCLUSÃO -----	 42
 VI-REFERENCIAS -----	 46

Unidades

g – aceleração da gravidade

g – grama

kb – kilobase

L – litro

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

kb - kilobases

U – unidades

V - Volt

PROSPECÇÃO DE GENES DE CELULASE PRESENTE EM BIBLIOTECA METAGENOMICA

RESUMO - Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares que ajudam na mineralização da matéria orgânica, liberação de carbono e nutrientes na forma de serem assimilados. Devido a esses importantes fatores é que cada vez mais aumenta a busca por enzimas que possam ser utilizadas nos diversos setores industriais com maior aproveitamento e baixo custo. A celulase pertence a essa classe de enzimas, ela é formada por um complexo multienzimático capaz de hidrolisar celulose através da quebra da ligação β ,1-4. A partir disso foi realizada uma busca de gene relacionado com a hidrolise da celulose em biblioteca metagenômica de DNA extraído de solo de arboreto de eucalipto. Foram realizado testes bioquímicos e moleculares, partindo de um par de oligonucleotídeo iniciadores degenerado que foi construído para identificar gene da glucanase que está ligado na hidrolise da celulose. Com o teste bioquímico foi possível selecionar clones que estão relacionados com hidrolise da celulose, a confirmação dos clones positivos foi feita através de reações de PCR. Após a escolha do clone foi feita uma sub-biblioteca, os clones da sub-biblioteca foram sequenciados e através do sequenciamento foi possível encontrar gene relacionado à hidrólise da celulose.

Palavra-Chave: diversidade microbiana do solo, celulase, biblioteca metagenomica

PROSPECTION OF GENES OF CELLULASE PRESENT IN METAGENOMIC LIBRARY OF EUCALIPTO

Summary - The microorganisms show a abundant genetic diversity and perform unique and crucial ecosystems maintenance, one of this function is the produce of extracellular enzymes that mineralize organic matte and release carbon and nutrients in forms that can be assimilated. Due this important factors its increasing the search of enzymes who can be use on the manufacturing with better utilization and low cust. The cellulase belongs to this class of enzymes and its formed by a complex multienzymatic who its able to hydrolisar a cellulose trough the broke of the linked β - 1-4. The cellulose, o homopolissacarideo wich we see in big amount on the biosphere. So, was made a screening to genes related with cellulase in metagenômico library of aboreto of eucalyptus cloning larg fragmenets in vector cosmídeo, with size who was between 30 and 45kb. There was made tests biochemists and molecular starting of a couple degenerate primes wich was made to identify the gene of glucanase that its connected in hydrolise da cellulose. With this tests we could detect the clones related with hydrolase of cellulose.

Keywords: soil microbe's diversity, cellulase, library metagenômica.

I - INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes em toda biosfera, são capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Sua presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, além disso, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável.

Apesar da grande diversidade microbiana, apenas uma minoria já foi identificada devida principalmente às dificuldades de se encontrar técnicas adequadas de cultivo e também porque alguns microrganismos conseguem se desenvolver somente em associações. Assim aumenta a necessidade da adoção de novas estratégias para a exploração plena e preservação dos recursos genéticos microbianos.

Nos últimos anos, novas abordagens de trabalho, envolvendo metodologias de bioinformática e biologia molecular, vêm permitindo o acesso a informações a partir de dados genômicos em bases de dados e a análise de microrganismos sem a necessidade de isolamento e cultivo, a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais (*metagenoma*).

A metagenômica investiga o genoma da microbiota total de um ambiente, propiciando muito mais informações sobre a diversidade e metabolismo, permitindo assim conhecer microrganismos presentes no local que ainda não foram identificados pelos meios de cultura disponíveis.

Esses microrganismos, também produzem enzimas extracelulares que ajudam a degradar complexos orgânicos, dentre eles destaca-se a celulose que é um recurso natural renovável mais abundante na biosfera, possui uma estrutura é composta por ligações β - 1,4, que resulta em uma rotação de 180 graus do plano de unidades alternadas de glicose formando numa cadeia molecular balanceada que torna possível uma molécula de cadeia linear capaz de se orientar em estruturas fibrosas e cristalinas de alta resistência à tensão. Sendo insolúvel em solventes orgânicos, água, ácidos e álcalis diluídos, à temperatura ambiente.

A estrutura cristalina formada pela celulose pode ser hidrolisada pela enzima denominada celulase a qual se encontra como um complexo multienzimático.

A celulase é amplamente utilizada em diversos ramos da indústria, como por exemplo: na indústria têxtil e de detergentes, na preparação do malte da cerveja, em processo de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, é comercializado como componentes indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando à fabricação de produtos de interesse, tal como etanol.

A celulase vem sendo estudada por vários grupos com intuito de entender melhor o seu mecanismo de atuação visando diminuir os custos de produção da enzima.

Dentro deste contexto o objetivo deste trabalho foi encontrar em biblioteca metagenômica de DNA de solo de arboreto de eucalipto genes de microrganismos produtores de celulase, visando sua possível aplicação industrial. A descoberta de novas celulasas além de ser objeto de patente pode abrir novas possibilidades de exploração da biomassa de celulose.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Diversidade Microbiana do Solo e Metagenômica

Devido à vasta diversidade, às diversas populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente com a riqueza e complexidade das interações entre os organismos do solo, entre outras simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (BEARE *et al.*, 1995).

Evidências demonstram que os microrganismos são filogeneticamente mais diversos que o obtido pelas análises de seqüências de linhagens cultivadas (HUGENHOLTZ & PACE, 1996). Os ecossistemas microbianos são comunidades geneticamente abertas (TERZAGHI & O'HARA 1990) e com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (WHITMAN *et al.*, 1998).

Além dessa grande diversidade os microrganismos do solo produzem enzimas extracelulares sendo o primeiro meio pelo qual esse microrganismos degradam os complexos formados por compostos orgânico em moléculas menores que podem ser assimiladas. Além de permitir aos microrganismos acesso à energia e nutrientes presentes no complexo dos substratos, as enzimas extracelulares fazem a catálise inicial, da etapa limitante do processo de decomposição dos nutrientes a serem mineralizados (ALLISON & VITOUSEK, 2004).

Há tempos essa diversidade vem sendo investigada através de técnicas de cultivo tradicionais e alguns microrganismos já foram caracterizados principalmente em relação as suas necessidades nutricionais. Entretanto, a abordagem do cultivo limitou seriamente a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997).

Atualmente, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana. Estes progressos mostraram

que a diversidade genética de microrganismos na natureza é muito maior que a refletida nas coleções e bancos de linhagens, porque apenas uma pequena parcela dos microrganismos, em torno de 1% é cultivável em laboratório pelas técnicas padrões de cultivo (AMANN *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de novas técnicas, como a metagenômica, que representa os genomas da microbiota total encontrada na natureza despertou a busca por novos genes (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Através de clonagem e análise de grandes segmentos de DNA microbiano do solo, pode-se avaliar, com mais detalhes, a fisiologia e a função dos microrganismos na natureza.

A Metagenômica permite acessar genes de organismos incultiváveis, pois se baseia na análise genômica de uma comunidade de microrganismos sem a necessidade de cultivo em laboratório. A técnica consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de uma biblioteca com DNA, para posterior clonagem e expressão de genes de interesse biotecnológico em vetores de expressão (KNIGHT *et al.*, 2003).

Alguns estudos mostram que a técnica metagenômica oferece uma associação quase ilimitada para encontrar novos genes que codifiquem produtos biotecnológicos relevantes, como as enzimas, lipases, amilases, celulase, quitinases, esterases, e outras envolvidas com biossínteses (KNIGHT *et al.*, 2003).

Para construção de uma biblioteca é necessário que o DNA extraído seja de alta qualidade, puro e não fragmentado. A partir da obtenção do DNA podem ser utilizadas estratégias para construção da biblioteca metagenômica. Nesse sentido, o plasmídeo vem sendo utilizado como vetor para obter alto número de cópias, mas aceitam apenas insertos pequenos que são adequados para análise das seqüências dos clones. Para obtenção de biblioteca com grandes insertos nos vetores, cosmídeos, foscídeos e cromossomos artificiais bacterianos (BAC), que possibilitam a identificação e a compreensão de vias sintéticas complexas (RONDON *et al.*, 2000; LORENZ *et al.*, 2002; ROLF, 2004).

2.2 – Celulase

Celulase é um complexo multienzimático denominado celulosomo, constituído por endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21) responsável pela hidrólise da cadeia β -1,4 glicosídica (BÉGUIN, P. 1990; DENG &., TABATABAI, 1994; LYND. L et al., 2002; DILLON. A, 2004; DEMAINE. A et al., 2005; FENG. Y. et al., 2006; ZHANG. Y. et al, 2006) A endoglucanase (EG) , hidrolisa aleatoriamente as regiões amorfas da cadeia polissacarídica da celulose, gerando novos oligossacarídeos de tamanhos variados. A exoglucanase (CBH), atua nas regiões redutoras e não redutoras liberando glicose ou celobiose, sua atuação pode ainda acarretar um desgaste da estrutura microcristalina da celulose. Já a β -glucosidase, hidrolisa os oligossacarídeos e celobioses em glicose (ZHANG *et.al.*, 2006; DILLON, 2004, LYND *et.al.* 2002; BAYER *et.al*, 1998; BÉGUIN, 1990).

A celulose é o principal componente dos vegetais e representa a maior parte do CO₂ fixado pelas plantas. Ela é um homopolissacarídeo insolúvel em água (devido, em parte , a seu alto peso molecular), maior ocorrência natural formado por unidades de glicose unidas entre-si por ligações glicosídicas β - 1,4. A decomposição da celulose no solo ocorre por ação de celulases produzida por uma vasta e diversa população fúngica, sendo os principais representantes aqueles dos gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Phoma* e bactérias aeróbicas e anaeróbicas: Anaeróbicas: *Acetovibrio*, *Bacteróides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus* e *Thermoanaerobacter*. Aeróbios: *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Xanthomonas*. (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ZHANG *et. al*, 2006; BAYER *et.al*, 1998; BÉGUIN, P. 1990).

Na forma nativa a celulose é composta por longas fibras cristalinas unidas por pontes de hidrogênio. Todos os organismos capazes de degradar o cristal de celulose secretam, em maior ou menor quantidade, complexo

multienzimático que possuem sinergismo e mecanismos diferentes de atuação durante a hidrólise da celulose (BÉGUIN, P. 1990).

O mecanismo de hidrólise das celulasas produzidas por bactérias é menos conhecido que o de fungos. Toda bactéria celulolítica secreta endoglucanase com propriedades diferente, a maioria mostram uma pequena atividade na estrutura cristalina da celulose. Embora algumas celulasas de origem bacteriana possuem mecanismo de hidrólise muito similar àquele descrito para as enzimas produzidas por fungos, algumas exoglucanases de origem bacteriana já foram caracterizadas, mas apenas duas foram identificadas como exoglucanases e apenas uma atuou sinergicamente com a endoglucanase na hidrólise da estrutura cristalina da celulose (BÉGUIN, P.1990).

De acordo com Béguin,1990 and Lynd,2000 existem mecanismos de controle de síntese e secreção de celulase. Na maioria dos organismos a produção de celulase é reprimida em concentrações elevadas de fonte de carbono metabolizado. Além disso, em vários sistemas, a síntese de celulase é induzida por um substrato, como, celobiose, que é gerada da celulose em baixa concentração, compondo a celulase e β -glucosidase associada a atividade da transglucosidase.

A síntese da celulase parece ser regulada em nível de transcrição do mRNA. Tem sido verificado que a transcrição dos organismos mais estudados (*Trichoderma reesi*, gene *cbh1*.,*Clostridium thermocellum*, *T. reesei cbh2* mRbIAh) possuem múltiplos sítios de iniciação localizado downstream entre os pares de base 35 to 48 entre os boxe TATA, comumente encontrado em eucarioto ; o 5'-terminal da *Erwinia chrysanthemi celZ* mRNAs é processado por um promotor similar ao σ^{70} encontrado em *Escherichia coli* ; e aos dois transcritos de *C.thermocellum celA* os quais são iniciados downstream em determinantes análogo aos promotores σ^{43} e σ^{28} de *B.subtilis*. A transcrição dos genes *cenA*, *cenB*, *cenC*, and *cex* de *Cellulomonas fimi* codificadores de EGA, EGB, EGC e de exoglucanase (EXG), foram estudadas na presença de agente carboximetilcellulose (CMC), do não indutor glicerol e de glicose (condições de não repressão).Os

resultados obtidos mostraram que as células cresceram na presença de carboximetilcelulase, apresentou menor produção na presença de glicerol e não houve transcrição na presença de glicose.

O estudo da sequência de aminoácidos de 50 celulases e β -glucosidasas produzidas por fungos e bactérias mostraram que diferentemente de outras enzimas, a celulase não apresenta domínios catalíticos muito conservados, isso foi determinado partindo do estudo de várias enzimas que são compostas por domínios catalíticos não muito conservados e estão integradas em diferentes ordens em varias proteínas (BÉGUIN,P., 1990) . (Figura 1)



Figura 1: Domínios de similaridade prolongada entre algumas celulases ou xilanases.(B.s.) *Bacillus subtilis*; (C.sa.) *C.saccharolyticum* ;(C.t.) *C. thermocellum*; (C.fl.)*C.flavigena*; (C.fl.)*C. fini*; (M.bi.) *M. bispora*. Os domínios mostram uma significativa similaridade. (Béguim,et al.1989).

Devido a grande diversidade entre os genes dos organismos (Figura 1), Herissant e colaboradores (1989) propuseram ordenar essas diferentes famílias através de uma divisão baseada na análise da região hidrofóbica. Nessa classificação havia seis famílias que se subdividem. Bayer e colaboradores (1998), através de estudo de cristalografia e da estrutura tridimensional da celulase e dos diferentes domínios de ligação (CBD), identificou mais seis novas famílias e subfamílias.(Figura 2)

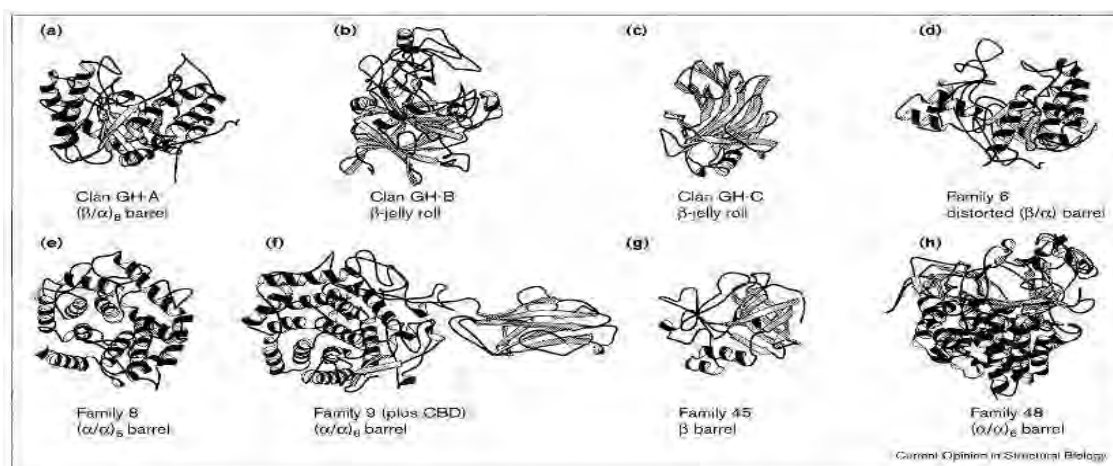


Figura 2: Domínios catalíticos das respectivas famílias e “clans” de celulase e enzimas relacionadas. **(a)** Clan GH-A, endoglucanase A (família 5) de *Clostridium cellulolyticum* (Protein Data Bank [PDB] código 1 EDG), **(b)** Clan GH-B, celobiohidrolase I (família 7) de *Trichoderma reesei* (PDB código 1CEL), **(c)** Clan GH-C endoglucanase B (família 12) de *Streptomyces lividans* (PDB código 1NRL), **(d)** Família 6, celobiohidrolase II de *Trichoderma reesei* (PDB código 3CHB), **(e)** Família 8, celulase CelA de *Clostridium cellulolyticum* (PDB código 1 CEM), **(f)** Família 9, endoglucanase E4 de *Termomonospora fusca* (PDB código 1 TF4), **(g)** Família 45 endoglucanase V de *Humicola insolens* (PDB código 2 ENG), **(h)** Família 48, CelF C. cellulolyticum. (Bayer, *et al.*, 1998)

Dentro desse contexto o objetivo deste trabalho foi encontrar em biblioteca metagenômica de arboreto de eucalipto genes de microrganismos produtores de celulase, utilizando técnicas PCR e sequenciamento, visando sua possível aplicação industrial.

III – MATERIAIS E METODOS

3.1 Obtenção do controle positivo

Bacillus subtilis (ATCC 6633), foi o microrganismo selecionado por ser encontrado naturalmente no solo, o gênero *Bacillus* é um dos responsáveis pela decomposição da celulose no solo através da ação de enzimas extracelulares.(MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Para observar a possível produção da celulase desse microrganismo foram realizados testes bioquímicos e moleculares a fim de utilizá-lo como controle positivo. Esta bactéria foi cedida pelo PROF.DR. Manoel Victor Franco Lemos responsável pelo Laboratório de Genética de Bactérias do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – UNESP.

3.2 Biblioteca Metagenômica

A biblioteca metagenômica utilizada neste trabalho foi, construída no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV-UNESP - Jaboticabal (SP). A construção da biblioteca foi parte do trabalho de mestrado de Schuch,V., 2006 orientada pela Prof Dr Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. O solo sob arboreto de eucalipto foi escolhido por apresentar a maior diversidade bacteriana quando comparado a amostras de solo sob floresta nativa (SILVEIRA *et al.*, 2006) e amostras de solo cultivado (PEREIRA *et al.*, 2006).

Atualmente a biblioteca conta com 9.380 clones os quais foram utilizados para a pesquisa dos genes de enzimas relacionadas com a hidrólise da celulose. (BÉGUIN, P. 1990; DENG &., TABATABAI, 1994; LYND. L et al., 2002; DILLON. A,2004; DEMAINE. A et al., 2005; FENG. Y. et al.,2006; ZHANG. Y.et al, 2006).

3.3 Teste bioquímico com clones da biblioteca

Os testes bioquímicos foram realizados em placas de petri utilizando meio contendo baixa concentração de nutriente e ampicilina concentração final de 70µg/mL.

O meio utilizado foi o C12 descrito por Kim, e colaboradores, 1999 modificado para conter pouca reserva energética, substituindo-se glicose por CMC, [CMC 0,5% p/v, caseína hidrolisada 0,5% p/v, peptona 0,2% p/v, extrato de levedura 0,2% p/v, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 23mM] pH 7.0,

Os clones foram cultivados em placas de petri descartáveis (150mm x 15mm), eles foram transferidos da placa de estoque para a placa de petri contendo o meio C12 modificado através de um replicador. Após a inoculação as placas foram levadas para B.O.D a 37°C onde ficaram durante 72 horas incubando, em seguida as placas foram cobertas com uma fina camada do mesmo meio C12 e incubadas novamente a B.O.D 37°C, por mais 6 horas, Após esse período foi realizados teste com Vermelho Congo de acordo com Teather & Wood, (1981) para observar a formação de halos ao redor das colônias.

3.4 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores degenerado

Para realizar o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores degenerados foi necessário fazer a escolha das seqüências de gene relacionado ao complexo multienzimático da celulase. As seqüências analisadas foram retiradas do National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) do trabalho de Feng, et al., (2006). As seqüências foram transformadas no formato FASTA e alinhadas no programa de múltiplo alinhamento (ClustalX 2.0; <http://www.uk.plbio.kvl.dk/bioinfo.htm>). Feito o alinhamento dos genes foi possível separar um grupo de genes com maior similaridade. As seqüências escolhidas foram submetidas no programa de múltiplo alinhamento ClustalX 2.0 (Chenna,R.; 2003) a partir desse alinhamento foi gerada uma seqüência consenso dos seguintes microrganismos: *Clostridium beijerincki*

(DQ182493), *Clostridium beijerincki* (DQ182494), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DQ916114), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DQ916115), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DQ916116), *Reinekea sp* (DQ916117), *Reinekea sp* (DQ916118). A partir da sequência consenso foram escolhidas as regiões mais conservadas em seguida elas foram analisadas no programa GeneRunner 3.05 (Hastings Software), que auxiliou na escolha da melhor sequência a qual foi degenerada.

Após o alinhamento das seqüências e as análises feitas nos programas citados no item 3.3 foi possível obter o seguinte par de oligonucleotídeos iniciadores degenerado:

Forward - 5' CGTSGGVTAYCGSTAYTTYGA 3';

Reverse - 5' CGMTYDCCYGCSCCDCCYTC 3'.

A base degenerada D pode ser G, A ou T, a Y pode ser C ou T, a K pode ser G ou T, e a M pode ser A ou C; os iniciadores foram feitos para amplificar a região do gene da β -glucosidase que é uma das enzimas que faz parte do complexo multienzimático da celulase, sendo que o produto obtido deve estar entre 800 e 900 pb aproximadamente.

3.5 Extração do DNA do controle positivo

A extração de DNA da bactéria da espécie *B. subtilis* foi feita através do protocolo de Marmur (1961). A bactéria foi cultivada por 24 horas em meio de cultura LB à 28°C, 180 rpm. Foi centrifugada uma alíquota por 25 minutos à 4°C, 16.266 x g. O *pellet* bacteriano (0.5g) foi ressuscitado em 6ml de solução salina contendo 0.15 NaCl e 0.1M EDTA pH 8.0 e mantido no gelo. Foram adicionados 0.6 μ l de lisozima (20mg/ μ l) e deixado em banho-maria (37°C) por uma hora. Foram acrescentados 500 μ l de SDS 25%, e a amostra foi agitada suavemente por cinco minutos. Foi adicionado acetato de sódio para uma concentração final de 1M e a amostra foi agitada suavemente por cinco minutos. Um volume igual de clorofórmio- álcool isoamílico (24:1) foi adicionado, e posteriormente a amostra foi agitada por cinco minutos. A suspensão foi transferida para um tubo corex e centrifugada por trinta

minutos à 4°C, 17.212 x g. A fase aquosa foi aspirada suavemente e transferida para um tubo corex novo, mantida no gelo. Dois volumes de etanol absoluto foram adicionados e depois a amostra foi centrifugada por vinte e cinco minutos à 4°C, 20.201 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em 100 µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8) pH 7.0 e as amostras foram estocadas a - 20°C.

3.6 Quantificação DNA controle positivo

Após a extração do DNA do controle positivo, foi feita a quantificação em gel de agarose 0,8% (p/v) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml), foi utilizada uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% (v/v) de glicerol], em uma cuba modelo Horizon 11-14 e conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 100 V.

A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho foto-documentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA). O padrão molecular utilizado foi 1 kb DNA “Ladder” (Fermentas), para selecionar qual amostra apresentava melhor qualidade para realizar a reação de PCR.

3.7 Otimização da reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) para observar o padrão das bandas formadas das seguintes reações; Tampão PCR 10X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCL], 4 mM dNTP, 1.3;1.4;1.6 mM MgCl₂, 0,8 e 1,0 U de Taq Polimerase, 200 ng de DNA, 120 pmol de cada iniciador, e água deionizada ultra pura para completar um volume final de reação de 20 µL. Os ciclos utilizados foram 4 minutos a 94°C, trinta vezes o ciclo de 1 minuto 94°C, 1 minuto(45°C a

55°C) e 1 minuto e 30 segundos a 72°C . As amostras foram analisadas conforme descrito no item 3.5.

3.8 Reação de PCR do “pool”

Após a confirmação pelo sequenciamento da similaridade do controle positivo com o gene da β -glucosidase, foi iniciada a busca de clones positivos na biblioteca, mas antes de testar os clones individuais foi realizado PCR dos “pools” das placas da biblioteca, o primeiro “pool” a ser testado foi da placa 13. A reação foi feita nas seguintes condições; Tampão PCR 10X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCL], 4 mM dNTP 10 mM, 1.12 mM $MgCl_2$, 1,0 U de Taq Polimerase, 100 ng de DNA, 120 pmol de cada iniciador, e água deionizada ultra filtrada para completar um volume final de reação de 20 μ L. A reação de PCR foi colocada no termociclador com os seguintes ciclos; 4 minutos a 94°C, trinta vezes o ciclo de 1 minuto 94°C, 1 minuto 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C . As amostras foram analisadas de acordo com as informações já descritas no item 3.5.

3.9 Extração DNA e PCR da placa 13

Depois de visualizar a amplificação do fragmento para o gene de β -glicosidase para o “pool” da placa 13, foi realizado a extração dos clones individuais dessa placa, pelo método de lise alcalina de acordo com protocolo Sambrook *et al.* 1989. Para extração em tubos eppendorf, o método foi realizado sem modificações. Para extração em placas de cultivo de 96 poços, os clones da biblioteca foram inoculados em triplicatas utilizando-se um replicador, em 1,1 mL de meio LB suplementado com 70 μ g/mL de ampicilina. As suspensões foram incubadas com agitação de 230 rpm, 37°C, por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3220 g, o sedimento foi ressuspensionado em 200 μ L de solução GTE [Glicose 50 mM; Tris-HCl 23 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM] e as amostras das triplicatas foram reunidas numa só placa de cultivo, que foi submetida à

extração.

Repetiu-se a centrifugação anterior e as células foram ressuspensas em 85 μL de solução de GTE contendo de 5 μg de ribonuclease. Um volume de 60 μL de cada amostra foi transferido para microplacas de polipropileno de fundo “U”. Acrescentou-se 60 μL de solução de lise [NaOH 0,2N / SDS 1% (p/v)], procedendo-se uma incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, e 60 μL de KOAc 3M, repetindo-se o período de incubação anterior. Após uma breve centrifugação para concentrar o material no fundo da placa e retirar bolhas, as placas foram incubadas por 30 minutos a 90°C. As placas foram resfriadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 3320 x *g*, a 20°C. Todo o volume, cerca de 165 μL , de cada poço foi transferido para placas Millipore providas de filtro e acopladas em placas de polipropileno novas. Este conjunto foi centrifugado por 10 minutos a 3220 x *g*, a 20°C. Ao material filtrado foram adicionados 110 μL de isopropanol absoluto gelado. Após selar as placas com adesivos resistentes a álcool, as mesmas foram invertidas 10 vezes, para misturar a amostra, e centrifugadas a 3220 x *g* por 45 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA cosmidial precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% (v/v) gelado. As placas foram centrifugadas por 10 minutos nas mesmas condições de rotação e temperatura já descritas. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o resíduo secou em temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA foi ressuspensado em 30 μL de água Milli-Q esterilizada e, armazenado a -20°C. Após a extração foi realizados PCR da placa 13 com os iniciadores utilizados anteriormente e em seguida visualizados de acordo com o item 3.5.

3.10 Teste bioquímico dos clones individuais

Os clones da placa 13 que apresentaram amplificação para os iniciadores de β -glucosidase foram crescidos separadamente em meio Luria-Bertan (LB) com ágar e ampicilina na concentração final de 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para isolar colônias, e foi encubado em B.O.D 37°C, após o isolamento a colônia

foi colocado sob agitação de 240 rpm a 37°C por um período de 22 horas para o desenvolvimento dos clones. Posteriormente, 100 µL do meio de cultura com o clone desenvolvido foi adicionado em 900 µL de solução salina 0.85%, as diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} (diluições seriadas) tiveram uma alíquota de 100 µL distribuída em placa de petri contendo o meio de cultura.

Após a inoculação as placas foram levadas para B.O.D a 37°C onde ficaram durante 72 horas incubando, em seguida as placas foram cobertas com uma fina camada do mesmo meio C12 e incubadas novamente a B.O.D 37°C, por mais 6 horas, Após esse período foi realizados teste com Vermelho Congo de acordo com Teather & Wood, (1981) para observar a formação de halos ao redor das colônias isoladas.

3.11 Extração e quantificação do DNA dos clones

Foram escolhidos os clones que apresentaram boa amplificação e boa atividade no teste bioquímico.

Os DNAs foram extraídos de acordo com protocolo SAMBROOK *et al.* 1989, e quantificado em gel de agarose 0,8% cuba LCH 7X8 (Loccus Biotecnologia) a 60 V e visualizada como foi descrito no item 3.5.

3.12 Sub-biblioteca de cosmídeo em vetor plasmídeo

Após a realização dos testes bioquímicos e a extração quantificação o clone escolhido pra dar continuidade ao trabalho.

3.12.1 Reação de nebulização

A nebulização é uma forma mecânica de fragmentar o DNA essa técnica é mais vantajosa em relação à fragmentação por restrição enzimática, por apresentarem um caráter mais randômico. O produto obtido pela fragmentação deve ser separado por tamanho para evitar a clonagem de fragmentos pequenos.

Foi utilizado o DNA A09 na concentração de 35µg, 100 µL Tris-HCl 1M pH 8.0 filtrado, 30µL MgCl₂ 1M filtrado e 1 mL glicerol 50%, completar o volume para 2 mL com água milliQ. A nebulização é feita com nitrogênio por 18 segundos a 3 KgF/ cm², após a nebulização a amostra foi centrifugada a 4°C a 12.000 xg durante 2 minutos para concentrar o material. O volume recuperado foi transferido em alíquotas de 700 µL para eppendorfs de 1,5 mL.

O DNA cosmídial foi nebulizado para gerar fragmentos para poder ser sub-clonado, o tamanho dos fragmentos de interesse é de 1 a 3 Kb.

3.12.2 Precipitação e quantificação do fragmento de DNA

Sobre cada alíquota do DNA nebulizado foi adicionado 70 µL de NaAc 3M pH 5,2 e 700 µL de isopropanol 100%, as amostras foram homogeneizadas e incubadas overnight a -20°C. Após a incubação foi centrifugado a 4°C a 15.000 xg durante 25 minutos, o pellet obtido foi lavado com 1 mL etanol 80% e centrifugado novamente 4°C a 15.000 g durante 15 minutos, e o pellet foi deixado a temperatura ambiente para secar, em seguida ressuspendido em 20 µL de água ultra- pura e depois o DNA foi levado para o banho a 37°C por 1 hora. Depois desse período é necessário unir o volume de todos “eppendorfs”.

O DNA nebulizado foi quantificado em gel de agarose 0,8% cuba LCH 7X8 (Loccus Biotecnologia) a 80 V por 1 hora e 25 minutos e conduzida em tampão TEB 1X e visualizada em fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000).

3.12.3 Reação de reparo das extremidades dos fragmentos de DNA

A reação de reparo das extremidades do DNA foi realizada para que este pudesse ser ligado ao vetor, já que, o vetor está aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I.

Nessa reação foi usado 57µL de DNA com concentração aproximada de 35µg, 10µL de Tampão NEB2 10X (BioLabs), 10µL BSA 100X 10mg/mL (BioLabs), 10µL DNTP's 10 mM (Fermentas) e 5µL de T4 Polymerase 3U/µL (BioLabs), completando o volume para 100µL com água ultra- pura. Em seguida a reação foi encubada a 12°C por 15 minutos, após essa incubação foi adicionada a 5 µL da enzima Klenow 5U/ µL (BioLabs) e foi incubado novamente mas a 37°C por 30 minutos e 75°C por 20 minutos para a inativação da enzima.

3.12.4 Reação de fosforilação

Foi usado 100 µL do DNA reparado, 12 µL do Tampão T4 ligase com 1mM ATP (BioLabs) e 2,5µL de Kinase 10U/ µL (BioLabs) e água ultra- pura para completar o volume de 120 µL. Depois de unir todos os reagentes a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e 65°C por 20 minutos para inativação da enzima,e a reação ficou a 4°C por aproximadamente 12 horas.

3.12.5 Seleção do tamanho do inserto

Depois do DNA reparado e fosforilado a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose para separação das bandas e posterior recuperação dos insertos de tamanho desejado.

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com hipoclorito 4% (v/v).

No gel foi aplicado uma alíquota 10 µL do DNA ao lado 6 µL do padrão molecular utilizado foi 1 kb DNA "Ladder" (Fermentas).Pulou-se uma canaleta e na próxima foi aplicado todo o DNA. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X [40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA] isento de brometo de etídio, a voltagem constante 80V durante 1 hora e 30 minutos.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose

resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob luz UV, o marcador serve para guiar na obtenção do inserto da porção não corada. As duas partes do gel foram colocadas lado a lado, e a região contendo o inserto do tamanho desejado foi marcada e cortada com bisturi, e colocada em *eppendorfs* de 1,5mL, com aproximadamente 400 mg de gel/tubo. O restante do gel foi corado para observar se foi retirado todo DNA de interesse, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

3.12.6 Eluição do fragmento de DNA reparado do gel

A eluição foi feita seguindo as especificações do kit eppendorf Perfect Prep Gel Cleanup, e após a eluição foi feita uma eletroforese para observar o tamanho do inserto.

3.12.7 Reação de ligação

Nessa etapa o DNA vai ser ligado ao vetor, o vetor utilizado nessa reação foi pUC19 Fermentas que possui 2.686 pares de base, o DNA é clonado na região *lacZ* do vetor. (Figura 3)

Foram usadas nessa reação, 2,0 µL de Tampão 10X T4 ligase (BioLabs), 2ng/mL DNA, o vetor pUC19 100ng/mL (Fermentas), 1,5µL enzima Ligase (BioLabs) e água ultra pura para completar o volume de 20µL, a reação foi incubada a 16°C overnight.

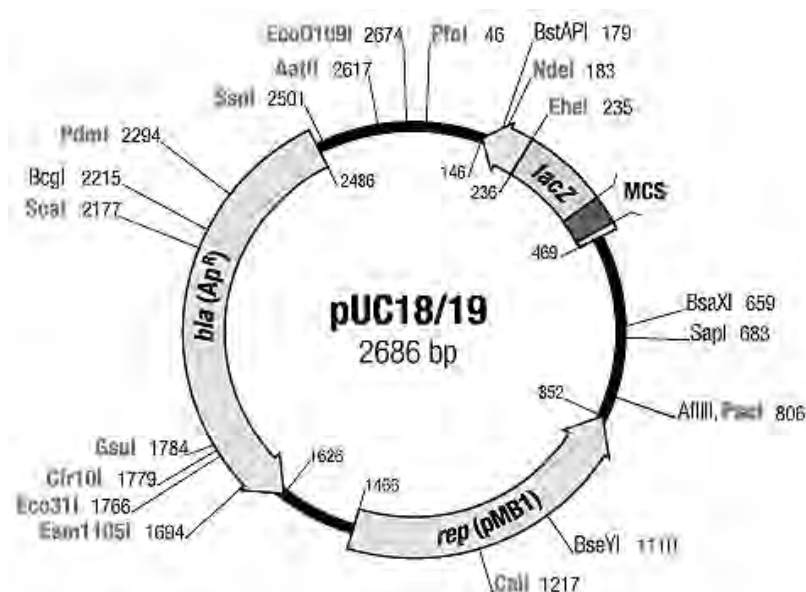


Figura 3: Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pUC19(Fermantas).

3.12.8 Transformação da célula competente

Com o DNA já ligado ao vetor agora é necessário colocá-lo em uma célula competente a célula usada é DH5 α cedida pelo PROF.DR. Manoel Victor Franco Lemos responsável pelo Laboratório de Genética de Bactérias do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – UNESP.

Na transformação foi utilizado 10 μ L do DNA ligado e 200 μ L de célula competente DH5 α , a transformação ocorre através de choque térmico, ficando 20 minutos no gelo e em seguida é colocada durante 90 segundos a 42°C e colocada no gelo novamente por 2 minutos. As células transformadas são colocadas em 950 μ L de meio SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl 1M,KCl 1M, Mg²⁺ 2M e glicose 2M), sob agitação de 225rpm a 37°C durante 1 hora e 30 minutos para recuperar a bactéria.

Passado o período de recuperação das bactérias elas foram plaqueadas em meio Luria-Bertan (LB) com ampicilina na concentração final 100 μ g/mL,para selecionar os clones, sobre esse meio foram adicionadas as soluções de IPTG stock(0,1M) e X-GAL(5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactopiranosídeo) nas concentrações indicadas no manual da Promega (pGEM-T/ β -GEM- Teasy).

Foi adicionado em cada placa 100 μ L IPTG e 20 μ L de X-GAL em seguida foi adicionado 115 μ L da mistura e bactéria, posteriormente as placas foram levadas para B.O.D a 37°C por aproximadamente 14 horas.

3.12.9 Coleta e estoque dos clones transformados

Após o período de incubação foi possível observar o crescimento dos clones, foram coletados apenas as colônias brancas. A inserção do fragmento de DNA se dá na região do gene *lacZ*, responsável pela síntese de β -galactosidase que quebra o substrato X-gal, originando coloração azul. Portanto, as células que receberam o inserto formam colônias brancas e as que não receberam, formam colônias azuis.

A coleta foi feita com palitos de madeira esterilizados e passados para plates (“mega-titer plates”, 96 poços) contendo 1.1mL de meio Luria-Bertan (LB) e 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram colocadas sob agitação de 250rpm a 37°C durante 22 horas.

Depois de passar pelo período de desenvolvimento foram retirados 100 μ L, do meio com os clones crescidos colocados em placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 μ L) contendo 100 μ L de glicerol 40% (v/v). Estas placas constituem o estoque de clones da sub-biblioteca foram estocadas à 80°C negativos.

3.13 Extração e quantificação dos clones da sub-biblioteca

Após o crescimento bacteriano sob agitação foi feita extração de DNA plasmidial. Os clones da sub-bibliotecas estocadas foram inoculados em 1,100L de meio LB + 70 μ g/ml de ampicilina, em placas de cultivo de bactérias (*Mega Titer*, 96 wells, 2,5 ml). A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com o que foi descrito no item 3.9.

3.14 Reação de PCR de sequenciamento dos clones da sub-biblioteca

A reação de sequenciamento foi feita em microplacas, após a quantificação do DNA dos clones da sub-biblioteca. A reação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 100 ng do DNA, 5,0pmol de cada um dos pares M13F e M13R esses iniciadores são específicos para o PCR de sequenciamento, 0,6 µL de “Dynamic Terminator” (GE) e 3,4 µL de tampão (400mmol/L Tris- HCl, pH9,0; 10m mol/L MgCl₂), volume da reação foi completado com tampão. As amostras foram levadas ao termociclador, seguindo o programa: 1 ciclos de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 55°C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos e 72°C por 10 minutos. Ao final do programa as amostras no aparelho permanecem a 10°C até serem retiradas.

Após a reação de PCR, as amostras foram ressuspensas e desnaturadas com 9 µl de Hi-Di-Formamida a 95°C, por 5 minutos e submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho ABI 3700 DNA Analyzer-Applied Biosystems.

3.15 Análise das seqüências geradas através de ferramentas de bioinformática

Após o sequenciamento, os dados brutos dos eletroferogramas de seqüências de DNA foram analisados pelo programa PhredPhrap (Ewing et al., 1998; Ewing e Green, 1998) e Consed (Gordon et al., 1998) afim de gerar seqüências FASTA e avaliar a qualidade e alinhamento das mesmas. Valores de phred acima de 20 foram considerados de alta qualidade.

As seqüências FASTA foram submetidas ao *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), através do programa BLASTX, para comparação com seqüências homólogas de nucleotídeos depositadas no banco de dados.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste bioquímico dos clones da biblioteca

O teste bioquímico foi realizado das placas 01 a 40 de forma aleatória, com objetivo de fazer uma pré-seleção dos clones produtores de celulase para etapa do testes moleculares. O teste consiste na hidrólise da celulose disponível no meio de cultura, a hidrólise é visualizada através da formação de halo “amarelo” ao redor de clone produtor de celulase (KIM, *et al.* 1999 e Teather & Wood,1981).

Entre todas as placas testadas apenas três apresentaram resultado positivo para clones produtores de celulase (Figura 4).

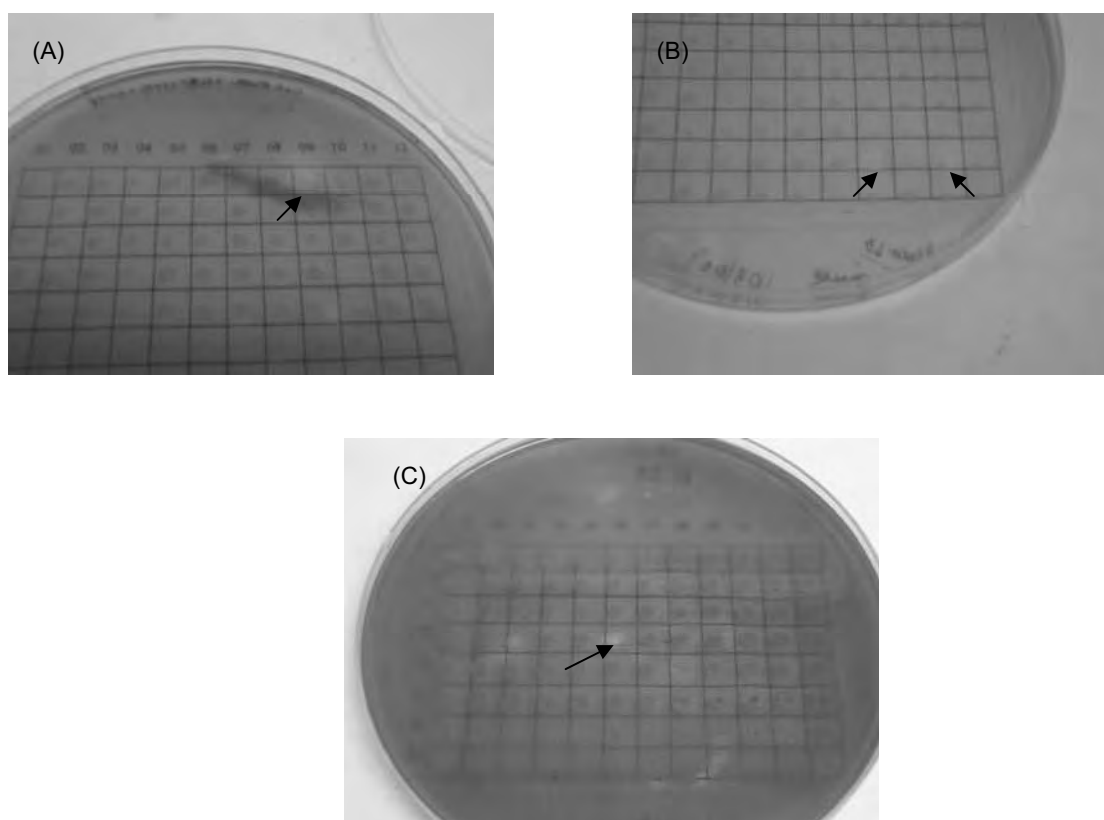


Figura 4: As placas A,B e C são respectivamente; placa 02 clone A09,placa 13 clone G09e G11 e placa 23 clone D06, elas apresentaram resultados positivos para hidrólise da celulose devido a formação o halo “amarelo” ao redor dos clones que estão indicados pelas seta.

4.2 Extração e quantificação do DNA *Bacillus subtilis*

O DNA foi extraído com sucesso de acordo com protocolo descrito no item 3.4, esse DNA foram utilizados posteriormente para otimização dos oligonucleotídeos iniciadores, o perfil eletroforético pode ser visualizado na figura 5. Apesar de apresentar baixa concentração nas amostras de 1 a 15 por se tratar do mesmo microrganismo todas as amostras foram reunidas em apenas 1 único tubo para poder ficar próxima da concentração de DNA visualizada nas amostras 16 a 26.

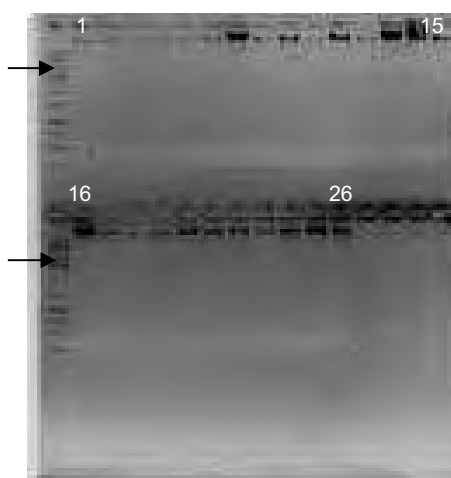


Figura 5: Perfil eletroforético de gel de agarose mostrando quantificação das amostras de *B. subtilis*. Foi utilizado 6µL do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “Ladder” (Fermentas), usando essa quantidade do marcador as bandas que estão indicadas pelas setas ficam com o a massa de 60ng, de acordo com as especificações do fabricante. A canaletas 1a 26 contem DNA .

4.3 Otimização dos oligonucleotídeos iniciadores

Depois de realizada a quantificação do DNA, foram preparadas as reações para otimização do PCR cada reação contem o DNA controle e foram feitas variações na concentração de Taq polimerase e $MgCl_2$, até encontrar a condição ideal para obtenção de um único fragmento. As reações foram feitas em um termociclador de gradiente para obter a melhor temperatura de pareamento para os iniciadores.

Em todas as reações a concentração de DNA foi a mesma, a variação de $MgCl_2$ (1.3, 1.4, 1.6mM) respectivamente e a de Taq polimerase (1 e 0,8U). (Figura 6).

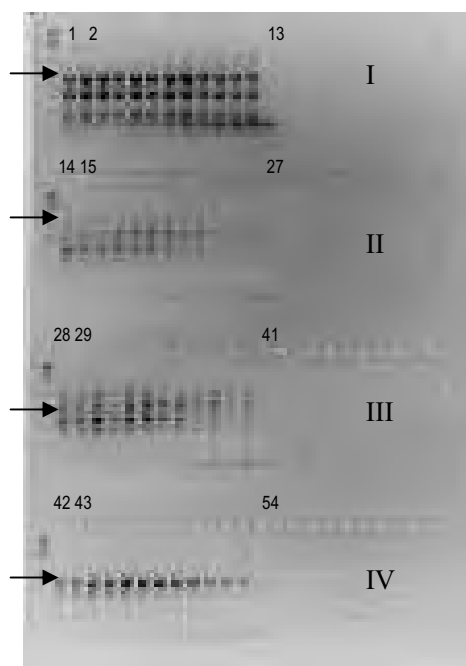


Figura 6: Perfil eletroforético de gel de agarose de reação de PCR termogradiante. As canaletas 1, 14, 28 e 42 são os marcadores de tamanho molecular 1kb DNA "Ladder" (Fermentas); A variação temperatura de 45°C a 55°C. Na reação I foi usado $MgCl_2$ 1,3mM e 1U de Taq polimerase, reação II manteve a concentração da Taq polimerase e usou 1,4mM de $MgCl_2$, reação III foi usado 1,6mM de $MgCl_2$ e 1U de Taq polimerase e reação IV usou 0,8 U de Taq polimerase e 1,4mM de $MgCl_2$ (Fermentas); As setas indicam o tamanho de 1.000pb.

Com a avaliação dos resultados foi possível definir a melhor condição para amplificação dos iniciadores, estabelecendo temperatura e concentração ideal de Taq polimerase e $MgCl_2$, as condições definidas foram: 1,4 mM de $MgCl_2$, 0,8U de Taq polimerase e temperatura de 55 °C. Essas condições podem ser visualizadas na reação IV da figura 6, na mesma figura é possível observar que o produto da amplificação tem entre 800 e 900pb, que é o tamanho esperado para o gene da β -glucosidase.

4.4 Reação de PCR com “pool” DNA da biblioteca metagenômica

O “pool” consiste na união dos 96 clones de uma placa de estoque e é feita uma extração do DNA de todos os clones juntos.

Com a otimização do PCR do controle positivo foi possível fazer teste no DNA dos “pools”, as condições das reações foram às mesmas usadas para o PCR do controle positivo, o “pool” 13 foi o primeiro a ser testado, e apresentou amplificação do tamanho esperado para o gene da β -glucosidase que é entre 800 e 900pb (Figura 7).

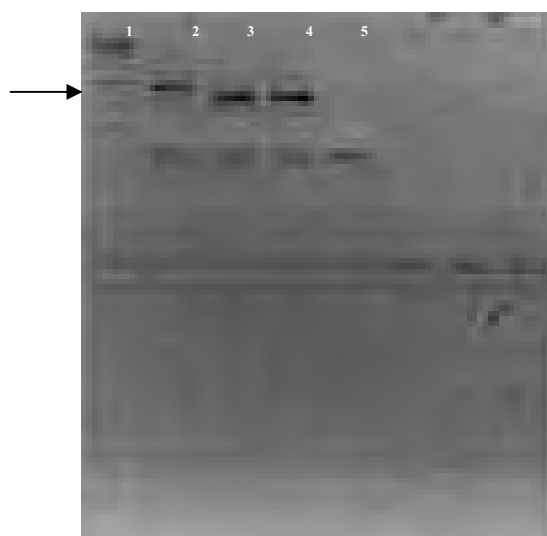


Figura 7: Perfil eletroforético de gel de agarose de PCR do “pool” 13. Na canaleta 1,1kb DNA “Ladder” (Fermentas), 2 controle positivo, 3 e 4 duplicata da amplificação do “pool” 13 e 5 controle negativo. A seta indica 1.000pb.

4.5 Extração de DNA cosmidial e reação de PCR da placa 13

Após a confirmação da amplificação do pool 13 foi feita à extração de DNA cosmidial dos clones da placa 13, a extração foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente no item 3.9. Em seguida esses DNA's foram quantificados em gel de agarose 0,8%(Figura 8).

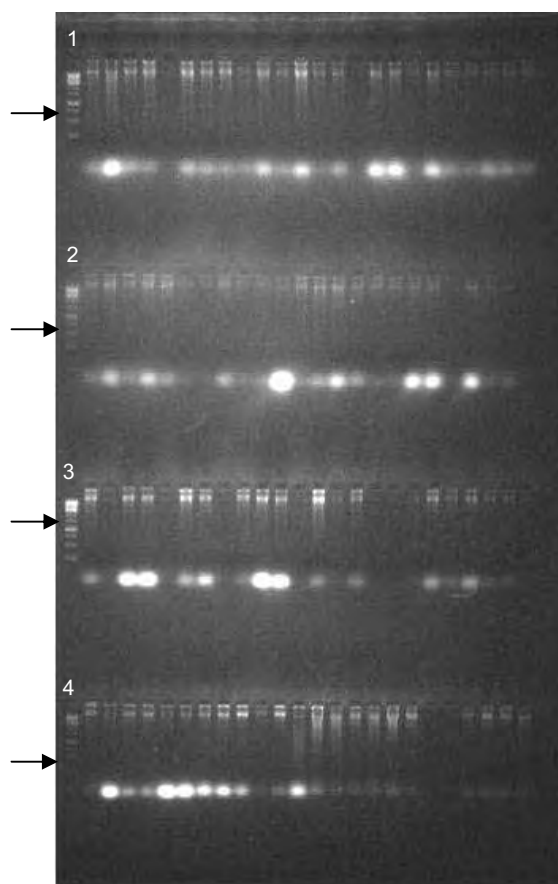


Figura 8: Perfil eletroforético de gel de agarose de extração de DNA cosmidial da placa 13. As canaletas 1 a 4 são marcadores de tamanho molecular 1kb DNA "Ladder" (Fermentas), as setas indicam a massa de 60ng,o restante das amostras são de DNA de cada clone da placa 13.

Em seguida foi feita a reação de PCR nas mesmas condições do controle positivo para todos os clones dessa placa, foi observada amplificação em clones que anteriormente não apresentaram formação de halo no teste bioquímico não apresentaram formação de halo.

Após a análise do gel de agarose do PCR da placa 13, foi constatada amplificação do gene da β -glucosidase para os seguintes clones: A08, A09, A11 e B10 e os clones G09 e G11 que haviam apresentado formação de halo anteriormente não teve amplificação do gene. (Figura 9).

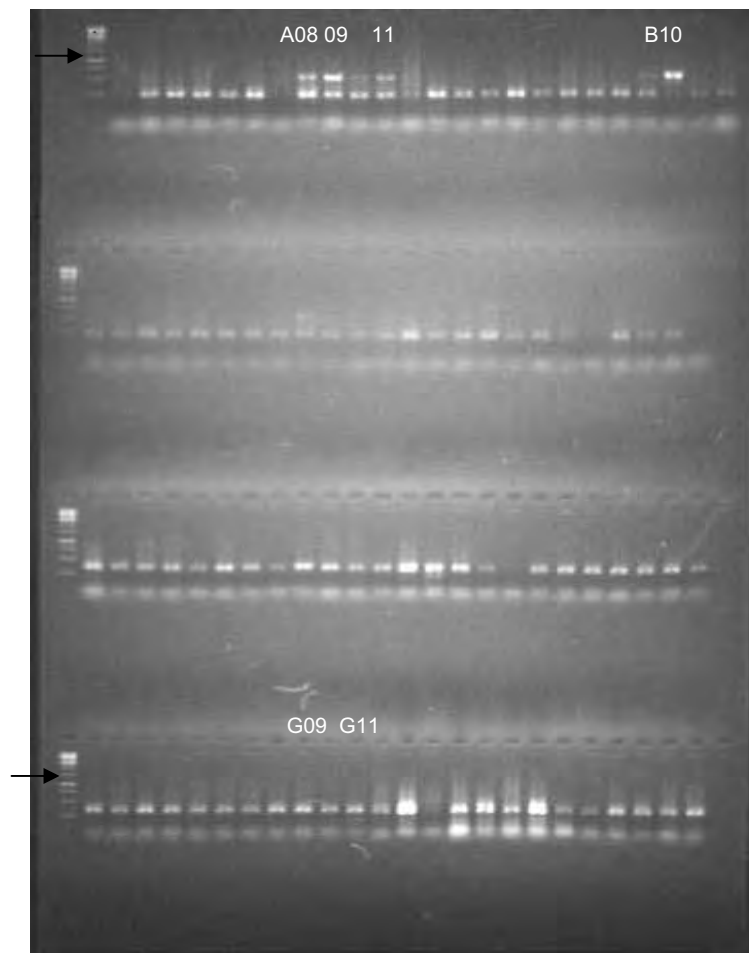


Figura 9:Perfil eletroforético do gel de agarose da reação de PCR da placa 13, com amplificação para o gene de β -glucosidase nos clones A08, A09 e A11 mas com bandas inespecíficas. As setas indicam o tamanho 1.000pb e 1kb DNA "Ladder" (Fermentas).

Foi possível visualizar na figura 9 que houve amplificação de clones que no teste bioquímico não haviam apresentado resultado positivo, esses clones A08, A09 e A11 também apresentaram formação de bandas inespecíficas para a reação PCR montada, devido a isso, foi realizada uma nova reação de PCR com algumas modificações na concentração de $MgCl_2$ que era 1,4mM foi para 1,12 mM e a Taq polimerase de 0,8U foi utilizado 1 U. Essas modificações foram realizadas porque o $MgCl_2$ e a Taq polimerase são considerados fatores críticos, pois, altas atividades levam a bandas inespecíficas ou inativação por baixa quantidade relativa de substrato;

baixas atividades levam à ausência de produto, as duas situações regidas principalmente por essas duas soluções.

As modificações realizadas para PCR obtiveram êxito na amplificação dos clones A09 e B10, que apresentaram apenas a banda única para o gene da β -glucosidase com o tamanho aproximado de 800 a 900pb. (Figura 10).

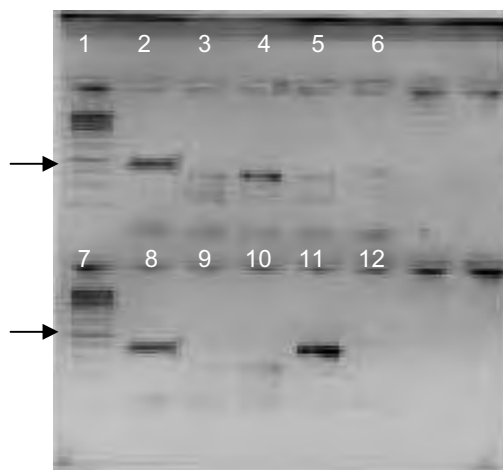


Figura 10: Perfil eletroforético de gel de agarose da reação de PCR de alguns clones da placa 13. As canaletas 1e 7 1kb DNA “Ladder” (Fermentas), as setas marcam 1.000pb; As canaletas 2 e 8 são controle positivo; 6 e 12 controle negativo; 3,4 e 5 representam respectivamente os clones A08, A09 e A11 e as canaletas 9,10 e 11 representam os clones G09,G11 e B10.

4.6 Teste bioquímico dos clones individuais da placa 13

Foi necessário realizar novamente o teste bioquímico, pois os clones que apresentaram resultado positivo para o PCR com os iniciadores do gene da β -glucosidase, não são os mesmos clones que apresentaram resultado positivo no teste bioquímico anterior, mas diferente do que foi feito no ultimo teste que foi realizado com as placas da biblioteca esse teste utilizou apenas os clones de interesse que fazem parte de uma única placa.

Os clones testados foram: A08, A09, A11, B10, G09 e G11, os clones que apresentaram formação de halo ao redor dos clones indicando possível hidrólise da celulase foram: A09, A11, B10 e G09. (Figura 11).

A confirmação do teste bioquímico dos os clones ajudou na interpretação dos resultados de PCR, para saber se realmente estava ocorrendo uma possível hidrólise de celulose por esses clones.

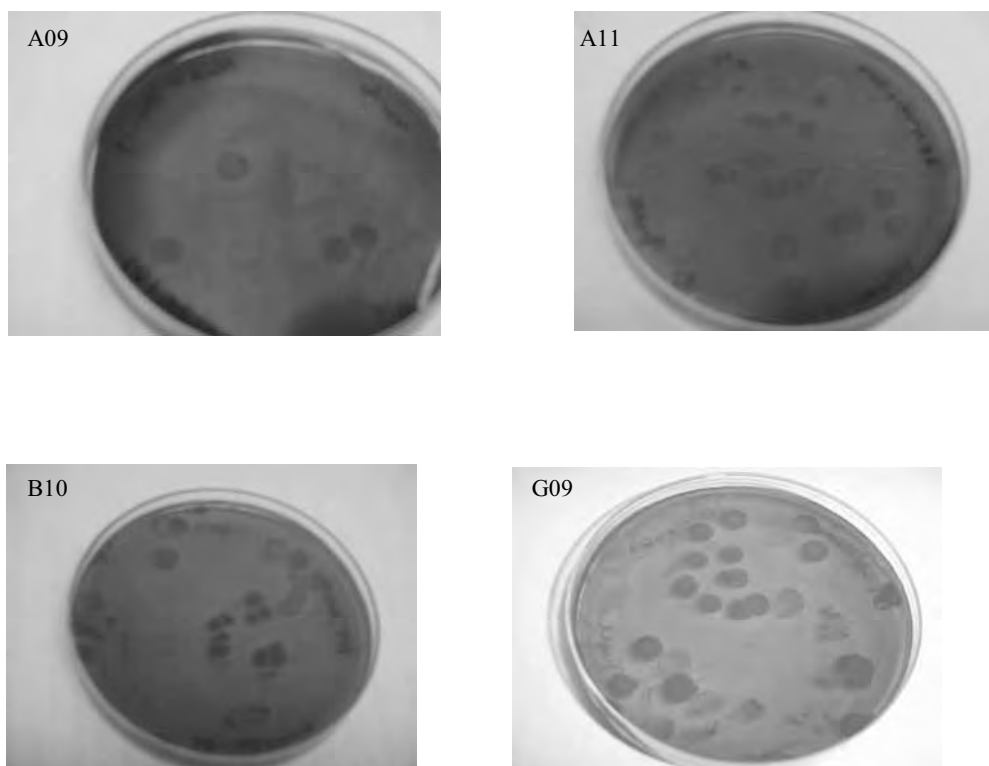


Figura 11: Os testes dos clones A09,A11,B10 e G09 comprovou que mesmo sem a amplificação do gene de β -glucosidase os clones apresentam atividade de hidrólise da celulose .

4.7 Extração do DNA cosmidial

Os clones selecionados pra extração de DNA foram os que apresentaram formação de halo indicando a hidrólise da celulose e amplificação para gene de β -glucosidase, os clones são: A09 e B10. (Figura12).

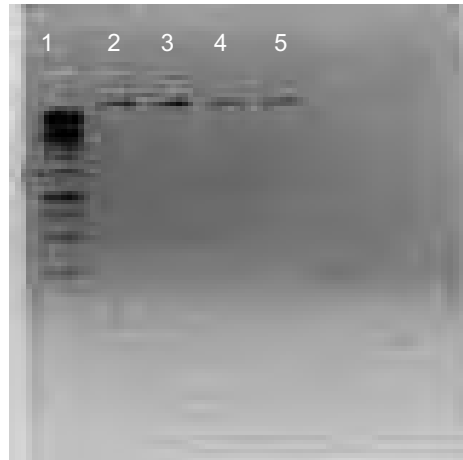


Figura 12: Perfil eletroforético de gel de agarose quantificação de DNA cosmidial. Canaletas 2 e 3 DNA clone A09, 4 e 5 DNA do clone B10 .A canaleta 1 marcado de tamanho molecular 1kb DNA "Ladder" (Fermentas).

4.8 Sub-biblioteca do clone selecionado

A nebulização do DNA ocorreu de acordo com o esperado, essa quebra mecânica do DNA é necessária para escolha do tamanho dos insertos que vão utilizados na clonagem (Figura13).

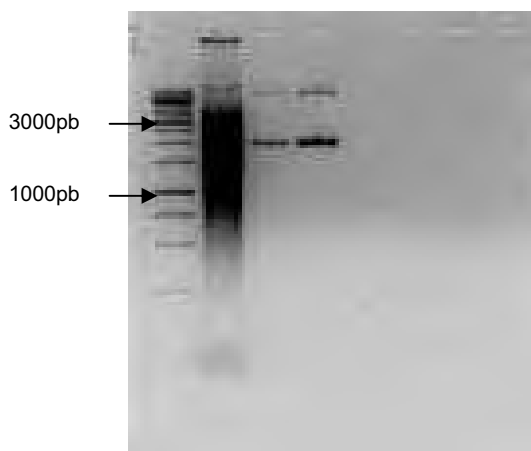


Figura 13: Perfil eletorético de gel de agarose de DNA cosmidial nebulizado. O número 2 corresponde ao DNA nebulizado, foi aplicado 3µL de DNA, 6µL de 1kb DNA "Ladder" (Fermentas), 3 e 4 respectivamente 1 µL e 3 µL de pGEM. A concentração do DNA é de aproximadamente 50µg/ml.

Após a nebulização foi realizada a reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico, foi necessária para que este pudesse ser ligado ao vetor. Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*E. coli*) foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3'→5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'. A enzima T4 ligase com 1mMATP e a Kinase adicionam grupos 5'-P dos fragmentos de DNA, preparando os insertos para clonagem através de ligação em vetores correspondentes.

Uma vez que os fragmentos de DNA metagenômico foram reparados e fosforilados, os mesmos foram submetidos à eletroforese preparativa. A região do gel contendo insertos de tamanho entre 1.000 e 3.000 pb foi marcada e cortada, e os bloquinhos de agarose foram depositados em tubos eppendorfs de 1,5 ml, aproximadamente 400mg de gel/tubo. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador

(Figura 14). Os fragmentos de agarose retirados do gel foram eluídos de acordo com as especificações do kit eppendorf Perfect PrepGel Cleanup e em seguida foi feito gel de agarose 1% e visualizado em luz UV a qualidade do DNA.(Figura15).



Figura 14: Perfil eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v). O número 1 corresponde a 10 μ L de DNA reparado e fosforilado;número 2, 6 μ L de 1Kb DNA "Ladder" (Fermentas);e número 3, 130 μ L de DNA.



Figura 15: Perfil eletroforético de gel de agarose do DNA eluído . O número 1 corresponde 6 μ L de 1Kb DNA "Ladder" (Fermentas), 2 é DNA eluído e 3 e 4 respectivamente 50ng e 100ng de pGEM

Após a quantificação do DNA eluído do gel preparativo para seleção de tamanho dos insertos a serem clonados, efetuou-se a ligação dos insertos no vetor plasmídeo. Em seguida o DNA ligado foi transformado em células DH5 α , o meio com as células ficou sob agitação durante uma hora e posteriormente o meio com as células transformadas foi transferido para placas de Petri, em meio de cultura sólido, contendo antibiótico, X-Gal e IPTG para seleção dos transformantes.

Foram coletados 1632 clones, armazenados em placas (96 "wells") contendo meio de cultura com antibiótico, e estes foram estocados em freezer -80°C . Foram então realizadas extrações de DNA plasmídial das placas da sub-biblioteca para realizar em seguida as reações de PCR se sequenciamento e a análise dos dados.

4.9 Sub_clonagem e análise dos resultados

O sequenciamento dos clones da sub-biblioteca foram feitos para encontrar genes relacionados a hidrólise da celulose, as seqüências foram analisadas pelo pacote phredPhrap/Consed. Foram seqüenciados 864 clones dos 1344 clones da sub-biblioteca, entre os 864 clones, o inserto seqüenciado possui em aproximadamente 40.000pb foram gerados 305 contigs.

A anotação dos genes foi realizada de forma manual através da utilização do programa Artemis Release 10. A seqüência de aminoácidos em formato FASTA foi submetida ao banco de genes do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), através do programa BLASTP, para comparação com seqüências homólogas de proteínas depositadas no banco de dados. Todas os 305 contigs foram analisados e foi encontrado resultado positivo nos contigs 33, 109 e 184.

As possíveis proteínas foram identificadas pelo programa Artemis e sua provável classificação funcional esta na tabela abaixo.

Tabela 1: Relação dos possíveis genes relacionados a hidrólise da celulose.

Contigs	Função proposta de possíveis proteínas similar	Bactéria fonte da proteína similar	Similaridade/ Identidade (%)	nº de acesso da proteína similar
Contg33	cellulose synthase operon protein YhjU	<i>Salmonella enterica subsp.</i>	80/87	Ref YP_02660285.1
	hypothetical protein EcolC_0178	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	94/95	Ref YP_001723187
Contg109	PTS system, N,N'-diacetylchitobiose-specific IIC component	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Agona str. SL483	95/93	Ref YP_02664041.1
Contg184	PTS system, N,N'-diacetylchitobiose-specific IIC component	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar Agona str. SL483	95/93	Ref YP_02664041.1

No contig 33 proteína celulose synthase o fragmento possui 753 bases e 250 aminoácidos e não apresenta domínio conservado, mas sabe-se que dois genes são codificados que sua função esta atribuída à hidrólise de

celulose insolúvel, os genes são: celulose 1,4 –betacellobiosidase (*celK*) e betaglucosidase (*bglH*). (Figura 16)

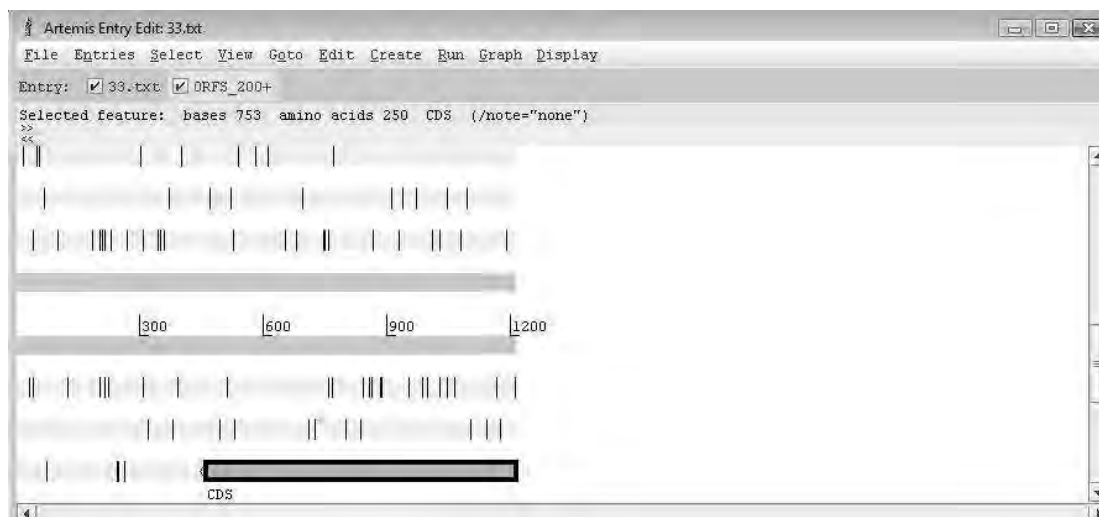


Figura16: Esquema ilustrado da posição do fragmento do contig 33.

O contig 109 aprestou a formação de dois fragmentos que se complementam e formam a proteína PTS, esses fragmentos têm 705 bases e 234 aminoácidos e 679 bases e 226 aminoácidos. Esse esquema foi visualizado no programa Artemis 10 (Figura17).

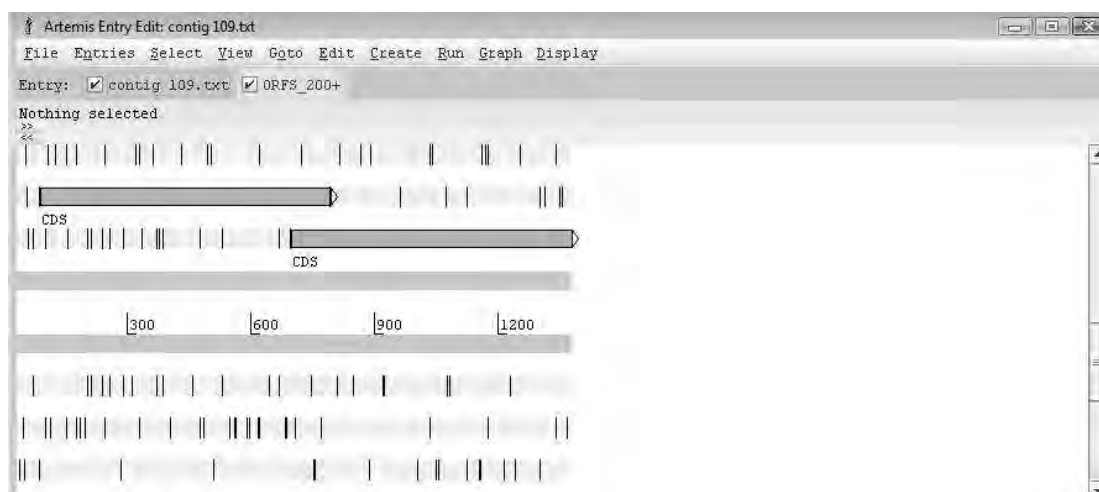
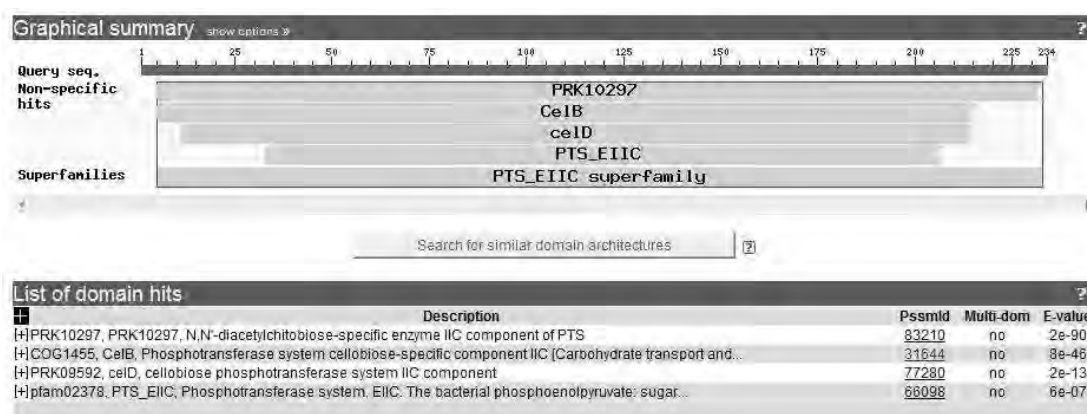


Figura17: Esquema dos fragmentos encontrados no contig 109.

Nos contigs 109 foi encontrado o sistema PTS que é uma fosfotransferase, responsável pelo transporte e fosforilação de carboidratos,

esse sistema é acoplado ao PEP (fosfoenolpiruvato). O sistema é responsável pela “quebra” de moléculas grandes e insolúveis em água como é o caso da celulose, o sistema também utiliza parte do carbono liberado pela quebra dos compostos nas ligações β -1,4.

(A)



(B)

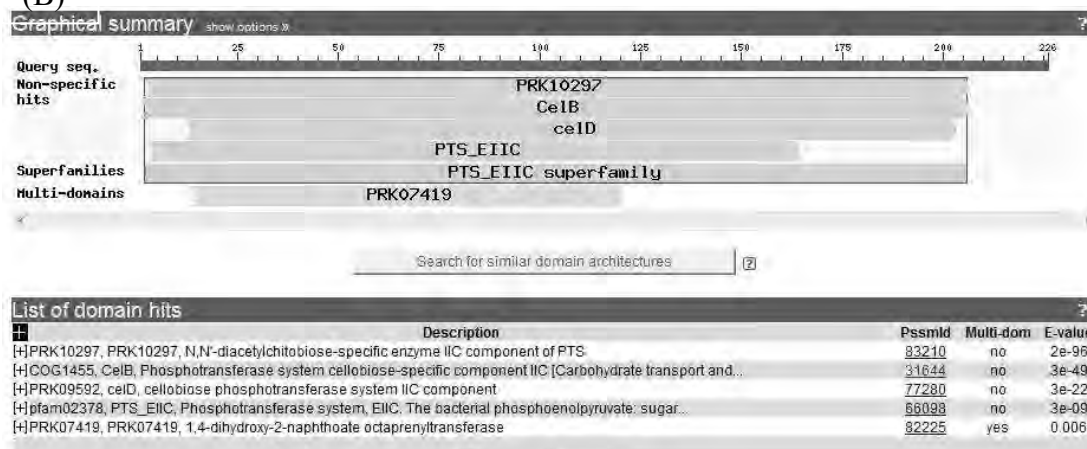


Figura 18: Esquema das seqüências do contig 109 após serem submetidas ao BLASTP.

O sistema PTS é bem complexo e conta com auxílio de dois conjuntos de enzimas, enzima I (EI) e HPr, e enzima II(EII) que é formada por três domínios A,B e C.

O que pode ser visualizado na figura 16, alguns domínios encontrados estão relacionados com IIC, essa enzima é responsável pela proteção integral da membrana.

PRK é um domínio onde o sistema PTS atua, mas nesse caso ele quebra estrutura da quitina.

Os genes *celB* e *celD*, fazem parte de um *operon cel*, que é composto por cinco genes *celA*, *celB*, *celC*, *celD* e *celF*. A função dos genes *celB* codifica o produto do gene que é requerido para o transporte e a fosforilação fosfoenolpiruvato-dependente de celobose, e *celD* codifica o repressor do transporte.

V - Conclusão

Os testes bioquímicos realizados nesse trabalho foram de grande importância para fazer uma seleção dos clones que foram testados posteriormente.

Para obter confirmação mais precisa sobre os clones positivos em testes bioquímicos, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por seqüências previamente selecionadas. Os iniciadores foram capazes de amplificar um produto entre 800 e 900pb para o controle positivo *Bacillus subtilis*, que era o produto esperado para amplificação do gene da β -glucosidase. E também mostra sua eficiência quando testado nos clones da biblioteca.

Através das reações de PCR foi possível selecionar o clone para a construção da sub-biblioteca, através das análises de bioinformática foi possível identificar gene envolvendo celobiose e β -Glucosidase que são polissacarídeos relacionados na hidrólise da celulose.

VI-Referências

ALLISON, S. D.; VITOUSEKI, P. M.; Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs: **Soil Biology & Biochemistry** v.37, p. 937-944, 2004.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

BAYER, E. A.; CHANZY, H.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; Cellulose, Cellulases and Cellulosome. **Current Opinion in Structural Biology**, 1998, v.8, p.548-557 .Elsevier

BEARE, M. H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A.; HENDRIX, P.F.; ODUM, E.P. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, Missouri, v. 170, p. 5-22, 1995.

BÉGUIN, P.; - Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annual Reviews in Microbiology, **Annu. Rev. Microbiol.** 1990. 44:219-48 Copyright © 1990 by Annual Reviews Inc.

BUYER, S.; A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1839-1842, 1995.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G.; THOMPSON, J.D.; Multiple sequence alignment with Clustal series of programs: **Nucleic Acids Research** v. 31, p.3497-3500, 2003.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. **Actinomycetologia**, v. 9, p. 98-117, 1995.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A.; Cellulase activity of soils: Effect of trace elements. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, p. 977-979, 1994.

DILLON, A. J. P.; Celulase, In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R.; Enzimas como Agentes Biotecnológicos, **Ribeirão Preto**, ed. Legis Summa, 2004. cap. 5, p. 243-269

FENG, Y.; DUAN, C. J.; PANG, H.; MO, X. C.; WU, C. F.; YU, Y.; HU, Y. L.; WEI, J.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. **Microbiol Biotechnol.**, v. 75 (2) p. 319-328, 2007.

HANDELSMAN, J.; RONDON M.R.; BRADY S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 5, p. R245-249, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, London, v. 14, p. 190-197, 1996.

KIM, Y. S.; JUNG, H. C.; PAN, J. G.; Bacterial Cell Surface Display of an Enzyme Library for Selective Screening of Improved Cellulase Variants. **Environmental Microbiology**, v. 66 (2): p. 788–793, 2000.

KEYHANI, N.O.; ROSEMAN, S.; Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N**-diacetylchitobiose, by expressing the *cel* operon. **Biochemistry**, v. 94, p. 14367-14371, 1997.

KNIGHT, V.; SANGIER, J.J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER,

P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 446-458, 2003.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J.; Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**. Elsevier v. 13, p.572-577, 2002.

MARMUR, L.J.; A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**. v.3, p.208-218, 1961.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; Microbiologia e Bioquímica do solo, 2ª edição, Lavras: editora UFLA, 2006. cap5, p.203-261

PARKER, L.L.; HALL, B.G.; Mechanisms of Activation of the Cryptic *cel* Operon of *Escherichia coli* K12. **Genetics Society of America**. v.124, p.473-482, 1990.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R.; Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, **Biotechnol Adv.**, v.24(5):p.452-481, 2006.

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

ROLF, D.; The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology** v.15, p.199–204, 2004.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity, **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 403-409, 1999.

RONDON, M.R., AUGUST, P.R., BETTERMANN, A.D., BRADY, S.F., GROSSMAN, T.H., LILES, M.R., LOIACONO, K.A., LYNCH, B.A., MACNEIL, I.A., MINOR, C., TIONG, C.L., GILMAN, M., OSBURNE, M.S., CLARDY, J., HANDELSMAN, J., GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2541-2547, 2000.

SAIER, M.H. Jr.; REIZER, J.; Proposed Uniform Nomenclature for the Proteins and Protein Domains of the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 1433-1438, 1992.

SAMBROOK, J.; MANIATS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

STEELE, H., L.; STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology, **FEMS Microbiology Letters** v. 247 p. 105, 2005.

TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Bias caused by using different isolation media for

assessing the genetic diversity of a natural microbial population. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 169-176, 2000.

TERZAGHI, E.; O'HARA, M. Microbial plasticity. The relevance to microbial ecology. **Advances in Microbial Ecology**, v.11, p.431-460, 1990.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J.; Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Environmental Microbiology**, v. 43(4), p. 777–780, 1982.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 10, p. 6235–6242, 2003.

WHITMAN, W. B. et al. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the Nacional Academy of Science of the United State of America**, Washington, v.95, p.6578