

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE VETOR VIRAL PARA SILENCIAMENTO GÊNICO

GABRIELA BEHREND NEITZKE¹; ALESSA ROTH DA SILVA²; MÉLANY ANDRADE THIELO³; ANA LUISA BIANCHI⁴; ROSANE LOPES CRIZEL⁵; VANESSA GALLI⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – gabrielabneitzke@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alessarothh@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – melanythielo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – nanabianchinha@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O silenciamento é uma estratégia amplamente utilizada no melhoramento vegetal, o qual pode ser realizado por meio de vetores virais, que podem ser utilizados para promover o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS). Esta técnica funciona através de um mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional, utilizando vetores virais recombinantes para o silenciamento de RNA, de modo rápido e específico, com ação transitória, assim podendo suprimir a expressão de genes específicos de plantas. (Tengzhi; Nagalakshmi; Dinesh-Kumar, 2021).

Um dos vírus utilizados para desenvolver vetores VIGS é o tobacco rattle virus (TRV), um vírus de RNA bipartido, com RNA1 e RNA2, que são descritos como pTRV1 e pTRV2 por LIU et al. (2002). Para que ocorra o silenciamento do gene alvo de maneira transiente, o vetor é introduzido nas células da planta alvo por meio de agroinfiltração, visto que a *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada como modelo para replicação deste vírus (Ratclif et al., 2008).

O vetor viral utilizado no presente trabalho foi TRV2, o qual foi construído de acordo com Liu et al. (2002). Para sua utilização, este vetor deve ser propagado em *Escherichia coli*, da mesma forma que DNAs plasmidiais. Posteriormente, deve ser isolado para inserção da sequência de cDNA de interesse. Após, o vetor é introduzido na planta alvo por meio de agroinfiltração (*Agrobacterium tumefaciens*), para silenciamento do gene alvo de maneira transiente.

Dessa forma, diferentes protocolos de extração de DNA plasmidial (pDNA) podem ser utilizados para o isolamento deste vetor viral a partir de cultivos de *E. coli*, como o protocolo de Lise Alcalina, o kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher) e o kit comercial Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Invitex). Portanto, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar qual destas três metodologias de extração de pDNA, apresenta o resultado mais eficiente para isolamento do vetor viral TRV2 a partir de cultivo bacteriano.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular Vegetal, situado no prédio 19 da Universidade Federal de Pelotas/RS.

Para a indução do crescimento plasmidial, foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (DH5α) com vetor TRV2 em caldo Luria Bertani (LB) suplementado com 50 µg/mL de kanamicina. Foi induzido o crescimento em incubador com temperatura controlada a 37 °C e rotação de 100 rpm por 24 horas. Para que as

extrações fossem realizadas, transferiu-se 1,5 mL do cultivo de *E. coli* para microtubos de 2 mL e realizada a centrifugação por 1 minuto na velocidade máxima e descartado o sobrenadante.

Para comparar a eficiência das três metodologias de extração de pDNA, foram utilizados nove microtubos contendo amostras bacterianas, numerados de 1 a 9 e submetidos às seguintes condições:

Nos microtubos 1, 2 e 3 foi realizada a extração de plasmídeos pelo kit Invitek, de acordo com as instruções do fabricante.

Nos microtubos 4, 5 e 6, o protocolo do kit Thermo Fisher foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Nos microtubos 7, 8 e 9, realizou-se a extração de plasmídeos por Lise Alcalina de Sambrook, J. et al.(1982), com algumas modificações. O pellet foi ressuspenso em 100 uL da solução de lise I gelada, e agitado em vórtex. Em seguida, foram adicionados 200 uL da solução II, e depois, 150 uL da solução III gelada, centrifugou-se na velocidade máxima por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e para recuperação do pDNA, precipitou-se o sobrenadante com duas vezes o volume de etanol absoluto à temperatura ambiente, misturou-se no vórtex e manteve-se o tubo por 2 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi centrifugado em velocidade máxima por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O tubo foi deixado aberto deitado sobre um papel toalha até secagem completa. Por fim, adicionou-se 1 mL de etanol 70% ao pellet e inverteu-se várias vezes. O etanol foi evaporado completamente por centrifugação a velocidade máxima por 2 minutos e o DNA foi estocado a -20 °C.

Após a averiguação dos resultados da extração por Lise Alcalina, foram realizados mais 9 tubos de extração, numerados de 1 a 9, com a adição das seguintes etapas, presentes no protocolo original do livro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, J. et al. 1982): manter o lisado no gelo por 5 min após a adição da solução III; o acréscimo de 25 uL de TE contendo 20 ug/mL de RNase, para que os RNAs fossem degradados.

Posteriormente às extrações, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de agarose a 1% adicionado de brometo de etídio, por 50 min a 80V.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma forma utilizada para avaliar a extração de ácidos nucleicos é a técnica de eletroforese em gel de agarose. Essa técnica consiste na separação por corrente elétrica, que impulsiona biomoléculas carregadas através da matriz de um gel poroso, por função de carga, tamanho e formas moleculares. O adjuvante presente no gel de agarose é o tampão TBE, composto por Tris, ácido bórico e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), porém a resolução de pDNA pode ser afetada pela quantidade de EDTA (Sanderson *et al.*, 2014). Nesta técnica, quanto mais intensa a banda presente no gel, maior a concentração da amostra, e quanto maior a sua resolução, maior a integridade da amostra. Desta forma, esta técnica foi utilizada para avaliar a eficácia de extração do vetor TRV2 utilizando 3 diferentes métodos.

A extração de pDNA foi realizada por meio de três técnicas diferentes, com a utilização de dois diferentes Kits comerciais e do método de Lise Alcalina. Nas amostras 1, 2 e 3 com a extração realizada através do kit Invitek, foi possível observar bandas com pouca intensidade, conforme a Figura 1, demonstrando que este kit foi ineficiente para a extração deste vetor. Porém, segundo Pilarek *et al.*

(2012), foi observado que a extração realizada por este mesmo kit comercial foi eficiente no isolamento do plasmídeo pKS7 com um vetor de entrada Gateway. pDNA.

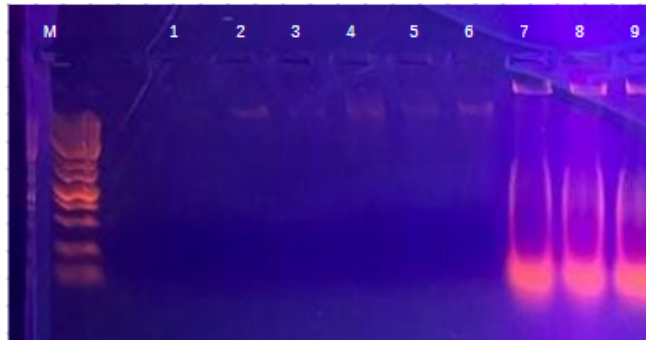


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio. M- marcador de peso molecular; 1-3: TRV2 extraído com o protocolo do Kit kit Invitex; 4-6: TRV2 extraído com o protocolo kit Thermo Fisher; 7-9 TRV2 extraído com o protocolo Lise Alcalina; e amostras do 1 a 9 coradas com brometo de etideo.

A extração realizada com o kit Thermo Fisher (amostras 4, 5 e 6) resultou em bandas mais visíveis, porém ainda em concentração inferior ao desejado (Figura 1). Tariq *et al.* (2014) relata que com o uso do presente Kit, o vetor pTZ57R/T foi eficientemente extraído, para posterior clonagem do gene 16S rRNA.

Na extração de pDNA realizada pela metodologia de Lise Alcalina (Figura 1), foi possível observar que as bandas apareceram de maneira mais forte e definida que as demais extrações; porém, exibiram um rastro grande e intenso, possivelmente devido à extração concomitante de RNA.

Tendo em vista, o resultado obtido com o protocolo de Lise Alcalina, decidiu-se realizar o protocolo original e sem modificações, visando um melhor resultado. Pode-se perceber, na Figura 2, que as bandas apresentam maior definição, sem a presença de RNA, indicando ser este um protocolo adequado para isolamento de TRV2.

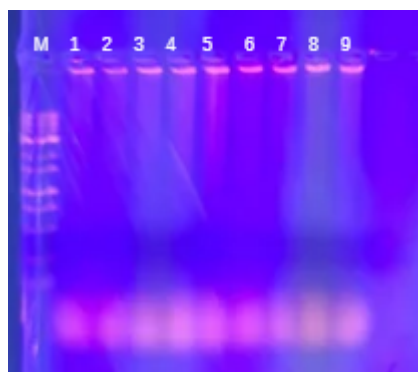


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. M- marcador de peso molecular; amostras do 1 ao 10: TRV2 extraído com Lise alcalina.

4. CONCLUSÕES

Podemos concluir no presente trabalho, que após a realização das três metodologias de extração de DNA plasmidial: Lise Alcalina, o kit comercial GeneJET

Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher) e o kit comercial Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Invitek), o melhor resultado foi obtido através da extração por Lise Alcalina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEWAN, I.; UECKER, H. A mathematician's guide to plasmids: an introduction to plasmid biology for modellers. **Microbiology**. v. 169, n. 7, 2023.

KÖSTLBACHER, S.; COLLINGRO, A.; HALTER, T.; DOMMAN, D.; HORN, M. Coevolving Plasmids Drive Gene Flow and Genome Plasticity in Host-Associated Intracellular Bacteria. **Current Biology**. v. 31, n. 2, p. 346-357, 2021.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**. v. 30, n. 4, p. 415-429, 2002.

PILAREK, M.; BRAND, E.; HILLIG, F.; KRAUSE, M.; NEUBAUER, P. Enhanced plasmid production in miniaturized high-cell-density cultures of *Escherichia coli* supported with perfluorinated oxygen carrier. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 36, p. 1079-1086, 2012.

RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Technical Advance: Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing: TRV-induced gene silencing. **The Plant Journal**, v. 25, n. 2, p. 237–245, 18 jul. 2008.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

SÁNCHEZ-SALAZAR, A. M.; TAPARIA, T.; OLESEN, A. K.; ACUÑA, J. J.; SØRENSEN, S. J.; JORQUERA, M. A. An overview of plasmid transfer in the plant microbiome. **Plasmid**. v. 127, 2023.

SANDERSON, B. A.; ARAKI, N.; LILLEY, J. L.; GUERRERO, G.; LEWIS, L. K. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**. v. 454, p. 44-52, 2014.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ZAHID, M.; ZAFAR, M. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 719-725, 2014.

TENGZHI, X.; NAGALAKSHMI, U.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS). **Encyclopedia of Virology**. v. 3, p. 123-131, 2021.

WATERHOUSE, P. M.; WANG, M.-B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 834–842, 14 jun. 2001.