



Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Controle de pragas: Clonagem do gen de  $\alpha$ -amilase  
de *Rhyzopertha dominica* (L.)

Fernanda Correia de Castro

Brasília-2003

Centro Universitário de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Bacharelado em Biologia

Controle de pragas: Clonagem do gen de  $\alpha$ -amilase de  
*Rhyzopertha dominica* (L.)

Fernanda Correia de Castro

Monografia apresentada como requisito  
para a conclusão do curso de Biologia  
do Centro Universitário de Brasília

Orientação: Dra. Luciane Vieira Mello Rigden (EMBRAPA)  
Prof. Cláudio Henrique Cerri e Silva (UniCEUB)

Brasília – 2º semestre/ 2003

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais uma etapa vencida, a conclusão do Bacharelado em Biologia.

À minha família pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Luciane V. Mello Rigden que confiou em meu trabalho e dedicou grande parte de seu tempo a discussões e idéias valiosas para a confecção dessa monografia.

À Embrapa – Cenargen, em especial, ao laboratório da Dra. Maria de Fátima Grossi de Sá, local onde desenvolvi esse projeto como estagiária.

Aos professores e aos meus grandes amigos que conquistei durante o curso.

O término é apenas o começo, desejo continuar estudando, me aperfeiçoando como profissional, este é o caminho que quero seguir, e acredito ser o certo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente à minha formação, muito obrigada !

## RESUMO

No período de desenvolvimento em que o país se encontra, a procura pela obtenção de qualidade e eficiência na produção de grãos, torna-se cada vez mais importante reduzir o alto nível de perdas existentes. Somente a perda causada por insetos é de 13% , sendo os coleópteros o maior grupo das pragas de armazenagem. *Rhyzopertha dominica* é considerada a pior praga que ataca cereais armazenados no Brasil, sendo classificada como uma praga primária. Uma forma de proteção dos grãos é o uso de produtos agroquímicos, de forma a controlar a população de insetos. Outra tecnologia para manter a qualidade dos grãos durante o seu armazenamento é o desenvolvimento de cereais recombinantes que possuiriam proteínas ativas que impedem o crescimento de insetos, reduzindo a população das pestes. Proteínas bioativas, como inibidores de amilases são alvo de estudo visando proteção contra *R. dominica*. No entanto, existe uma certa especificidade dos inibidores em relação às enzimas. Dados existentes mostram que inibidores conhecidos se apresentam indiferentes em relação à atividade enzimática desta praga. Assim, é necessário um melhor conhecimento das bases moleculares das amilases, de forma a se obter controle deste inseto. Desta forma, este trabalho demonstra como foi isolado o gen de  $\alpha$ -amilase de *Rhyzopertha dominica* a ser utilizada em futuros experimentos de atividade contra diferentes inibidores, também para a determinação de sua estrutura.

Palavras-chaves: pragas, proteínas, amilase, inibidores, clonagem.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Introdução geral .....	1
2. Controle Biológico .....	3
3. Pragas de grãos em estudo .....	3
3.1 <i>Rhizopertha dominica</i> .....	3
3.2 <i>Acanthoscelides obtectus</i> .....	5
3.3 <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	5
4. Amido .....	5
5. Proteínas .....	6
6. Amilase .....	7
7. Inibidor de $\alpha$ -amilase .....	8
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
1. Metodologias utilizadas .....	9
1.1 Extração de RNA .....	9
1.2 RT-PCR .....	10
1.3 PCR .....	10
1.4 Ligação .....	11
1.5 Placas .....	11
1.6 Transformação por Eletroporação.....	11
1.7 Inóculo .....	12
1.8 Mini-preparação de DNA .....	12
1.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição .....	13
1.10 Gel de agarose .....	13
2. Métodos de procedimento para isolamento do gene .....	14
III. RESULTADOS .....	17
IV. DISCUSSÃO .....	19
V. CONCLUSÃO .....	20
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

## I – Introdução

### 1. Introdução geral

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de grãos do mundo. Segundo o IBGE, a produção de grãos no país para 2003 é de aproximadamente 116,298 milhões de toneladas. Estima-se que na agricultura mundial 37% da perda da produção é causada por pragas e doenças, sendo que destes, 13% devido a insetos (FAO 2002). Dentre eles, está *Rhizopertha dominica*, hoje considerada a pior praga que ataca grãos armazenados em nosso país, sendo encontrado também em várias partes do mundo. É um inseto que é capaz de reduzir o grão a pó. Adapta-se facilmente em diversas condições climáticas e é bastante resistente. Além deste, há também *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, ambos considerados as maiores pragas do feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os danos causados por pragas aos grãos armazenados são caracterizados por alguns aspectos como: redução de peso e da higiene, perda da capacidade germinativa e redução da qualidade do produto. Os métodos tradicionais de controle se baseiam principalmente em produtos agroquímicos associados a linhagens de plantas mais resistentes (Da Silva 2002).

As plantas, em geral, têm um grupo de proteínas que faz parte de seu mecanismo de defesa contra doenças e insetos. Mas, agricultura moderna tende a reduzir a diversidade genética e assim, também se perde a capacidade de produzir novas moléculas de defesa. Então, com o passar do tempo, as plantas vêm diferindo dos caracteres de seus parentes selvagens. Durante a evolução, alguns insetos co-evoluíram em resposta ao mecanismo de defesa das plantas. E para que não haja prejuízo, o produtor usa defensivos agrícolas juntamente com linhagens resistentes de plantas domesticadas. Por outro lado, há uma grande pressão da sociedade para que se desenvolva uma agricultura que não use agentes químicos e também não deixe vestígios tóxicos no meio ambiente. Uma alternativa seria o controle biológico através de estratégias moleculares (Futuyma 1997, Franco *et al* 1999).

Neste trabalho será demonstrado o isolamento do gene da  $\alpha$ -amilase (proteína que digere o amido) do bruquídeo *Rhizopertha dominica*. Para que

futuramente este gene possa ser expresso e utilizado em experimentos de atividade contra diferentes inibidores de  $\alpha$ -amilase.

O objetivo geral desse trabalho é compreender a especificidade existente entre  $\alpha$ -amilase/inibidor.

O objetivo específico é isolar o gen  $\alpha$ -amilase de *R. dominica* para a determinação de sua estrutura molecular e ser utilizado em inibidores específicos.

## **2. Controle Biológico**

O homem já cultiva plantas há cerca de 11.000 anos, iniciando-se na região compreendida entre Líbano e Síria. (Raven *et al* 2001). Com o passar do tempo, as plantas diferiram alguns caracteres dos seus parentes selvagens. Hoje, domesticadas, são em parte incapazes de se defenderem contra pragas. E também, ao longo da evolução, insetos desenvolveram capacidade de atacar maior variedade de espécies vegetais. Conseqüentemente, capazes de responder a uma gama de diferentes inibidores vegetais.

O controle químico vem sendo o método mais usado pelos produtores e também o que mais causa danos ao meio ambiente. Uma das alternativas para esse problema é o desenvolvimento de plantas recombinantes. A manipulação de genes de interesse, juntamente com a transformação genética de plantas é uma área de grande destaque no controle de pragas. Mas, atualmente pesquisadores recorrem à linhagens selvagem das espécies para que a verdadeira origem de cada cultura não se perca (Franco *et al* 1999).

## **3. Pragas de grãos em estudo**

### 3.1 *Rhyzopertha dominica*

### 3.2 *Acanthoscelides obtectus*

### 3.3 *Zabrotes subfasciatus*

### 3.1 *Rhyzopertha dominica*

*Rhyzopertha dominica* ou “besourinho dos cereais” como é popularmente conhecido é um inseto de 2-3 mm de comprimento, a coloração é castanho-escura, tem corpo cilíndrico e cabeça globular, normalmente escondida pelo protórax (Figura 1). A antena possui os três últimos segmentos visivelmente maiores que os demais. As fêmeas põem de 300-400 ovos ao longo de sua vida que são colocados nas superfícies ou entre os grãos. As larvas são de cor branca com a cabeça escura, dotadas de patas capazes de perfurarem e se instalarem no interior dos grãos. Onde também passam a fase de pupa e a cor desta varia de branca a

castanha (Figura 2). O ciclo de vida do inseto em média é de 60 dias, o período de incubação dos ovos é de 15 dias a 26 °C e de 4 dias a 36 °C, sendo de 13% a umidade relativa do grão. A duração do período larval é de, aproximadamente, 22 dias, e o período pupal é de 5 dias e a longevidade do adulto atinge 29 dias, a 30 °C a 70% de umidade relativa. Os adultos têm excelente capacidade de vôo, adaptam-se rapidamente às mais diversas condições climáticas, suportam temperaturas de 18-38 °C, sendo a ótima de 34 °C, a umidade relativa ótima varia de 60-70% , contudo a larva pode suportar até 9% de umidade (Tecnigran 2002) .



Figura 1 - Adulto de *Rhizopertha dominica*, tamanho real: 2-3 mm.

Fonte: <http://www.uky.edu/Agriculture/Entomology/entfacts/fldcrops/ef137.htm>



Figura 2 - Larva de *Rhizopertha dominica*, tamanho real: 3-4 mm.

Fonte: <http://www.uky.edu/Agriculture/Entomology/entfacts/fldcrops/ef137.htm>

Esse inseto é hoje considerado a pior praga que ataca grãos armazenados no Brasil. Atacam grãos do tipo trigo, milho, cevada, arroz, aveia, amendoins, castanhas e outros. É uma praga primária, pois, tanto adultos como larvas reduzem os grãos ao pó, diminuindo também a qualidade do produto estocado (Tecnigran 2002).

A ocorrência é no mundo inteiro, ou seja, uma praga cosmopolita e extremamente voraz, sendo capaz de consumir de 5 a 6 vezes seu peso em trigo, em uma semana.

A principal característica da presença deste inseto nos armazéns é a grande quantidade de um pó farináceo em mistura com material fecal, com o cheiro adocicado, existente entre os grãos atacados.

### 3.2 *Acanthoscelides obtectus*

Conhecido como o caruncho do feijão, os insetos adultos medem de 3,0 a 3,5 mm de comprimento e chegam a viver por 13 dias. As fêmeas podem pôr até 63 ovos durante sua vida. O ciclo de vida é de 20 a 40 dias. São predominantes de regiões de clima temperado e sub tropical. A região do embrião da semente é o alvo dessa praga, incapacitando a germinação da semente (Da Silva 2002).

### 3.3 *Zabrotes subfasciatus*

Ou caruncho do feijão mexicano, a fêmea é maior que o macho e deposita em média 36 ovos. Vivem, geralmente, por 8 dias e apresentam o ciclo de vida de 26 dias. Os adultos medem de 1,8 a 2,5 mm. São facilmente encontrados em regiões de clima tropical (Chrispeels 1998).

## **4. Amido**

O amido consiste de uma mistura de cadeias lineares de moléculas de glicose ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (amilose) e  $\alpha$ -1,6 (amilopectina), sendo que esta última ocorre apenas nas ramificações e a forma  $\alpha$ -1,4 (Figura 3) surge nas demais ligações da cadeia. (Ucko 1992).

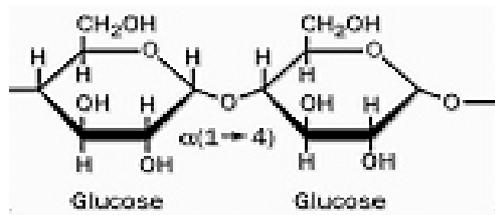


Figura 3 – Ligação  $\alpha 1 \rightarrow 4$  (Lehninger 2002).

O amido é a principal forma de armazenamento de glicose nos vegetais. A amilose e amilopectina são ambas constituintes da maltose (glicose + glicose), sendo a maltose o produto principal da hidrólise do amido (Lehninger 1996).

## **5. Proteínas**

As proteínas são moléculas de presença essencial para as reações biológicas e desempenham importantes papéis como:

1. *Catalisam enzimas*
2. *Auxiliam no transporte e armazenamento*
3. *Fazem movimentos coordenados*
4. *Mecânica de sustentação*
5. *Fazem proteção do sistema imunológico*
6. *Geram e transmitem impulsos nervosos*
7. *Fazem o controle do crescimento e da diferenciação* (Stryer 1995).

São moléculas complexas e relativamente grandes formadas por longas cadeias de aminoácidos. Vinte aminoácidos participam da formação das proteínas.

As proteínas são formadas por estruturas que lhes dão conformações peculiares. Estrutura primária é a seqüência de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, determinada pelo código genético.

A estrutura secundária é a forma helicoidal ou enrolada que a proteína tende a assumir, devido às ligações peptídicas e aos arranjos tridimensionais dos aminoácidos ligados. A estrutura secundária pode formar ainda a  $\alpha$ -hélice e a folha  $\beta$ -pregueada. A  $\alpha$ -hélice consiste do enrolamento de uma cadeia polipeptídica em um arranjo em espiral. Esta forma em espiral é mantida por ligações de oxigênio de um grupo carboxila de um aminoácido a um hidrogênio do grupo amina de outro aminoácido adjacente na cadeia. Este tipo de estrutura é bastante flexível e elástico. A folha  $\beta$ -pregueada resulta da formação de pontes de hidrogênio entre duas cadeias de proteína que correm paralelamente entre si. Essas duas cadeias podem se dispor no mesmo sentido, formando folha  $\beta$  paralela ou em sentidos opostos, formando folha  $\beta$  antiparalela. É de estrutura flexível, mas não elástica (Ucko 1992, Alberts *et al* 1996, Stryer 1996, Lehninger 2002).

A estrutura terciária é a sua forma tridimensional, resultado das dobras da cadeia polipeptídica. A interação entre as cadeias laterais dentro da proteína determina as ligações e suas propriedades.

Algumas proteínas têm mais de uma cadeia polipeptídica e cada cadeia isolada é chamada de subunidade. A estrutura quaternária demonstra a maneira em que as subunidades estão arranjadas na proteína (Oliveira 1995).

## **6. Amilase**

A  $\alpha$ -amilase é uma proteína de estrutura secundária em forma de hélice, com a função de enzima e pertence à classe das hidrolases – (endoglicosidase). Enzimas são catalisadores biológicos, ou seja, aumentam a velocidade das reações. Hidrolases catalisam hidrólises, ou seja, reação de um substrato com água (Ucko 1992). A amilase pertence ao tipo de enzima digestiva Carboidrase, mais especificamente, Polissacaridase que hidrolisa ligações glicosídicas de carboidratos de cadeias longas (Randall *et al* 2000).

A  $\alpha$ -amilase é uma a proteína que degrada o amido e o glicogênio. Ela decompõe muitos grupos das cadeias moleculares da amilose e da amilopectina, presentes no amido. A  $\alpha$ -amilase decompõe o amido em fragmentos de polissacarídeos e depois em maltose e glicose, dissacarídeo. Com relação ao

glicogênio, a enzima quebra as ligações  $\alpha$ -1,4 internas e assim, reduzindo-se a vários dissacarídeos (Stryer 1995, Alberts *et al* 1996).

## **7. Inibidores de $\alpha$ -amilase**

A  $\alpha$ -amilase é de extrema importância para os insetos que se alimentam de grãos e sementes ricos em amido. Estudos têm sido realizados com a intenção de elucidar o funcionamento das  $\alpha$ -amilases e assim, descobrir proteínas atuantes na inibição dessas enzimas.

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase são encontrados em cereais, leguminosas e outros tipos de vegetais. Entre os inibidores mais estudados estão os encontrados no trigo (0.19 e 0.53), encontrado no feijão comum ( $\alpha$ -AI1) e encontrado no feijão selvagem ( $\alpha$ -AI2) (Franco *et al* 2002).

Até o momento, tanto o inibidor 0.19 como o 0.53 são ativos contra a atividade da  $\alpha$ -amilase de *A. obtectus*. Mas, dos inibidores encontrados em trigo, apenas o inibidor 0.53 é ativo contra a  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* e incapaz de inibir a  $\alpha$ -amilase de mamíferos (PPA) (Franco *et al* 1999).

Testes demonstraram que o tipo  $\alpha$ -AI1 é capaz de inibir a amilase de alguns mamíferos e insetos, mas incapaz de inibir a  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus*. Enquanto o tipo  $\alpha$ -AI2 bloqueia completamente a atividade da  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus*. Esses inibidores agem no sistema digestivo dos insetos, causando a baixa absorção de nutrientes (Da Silva 2002).

Estudos mostraram que insetos submetidos a uma dieta contendo inibidores específicos de  $\alpha$ -amilase, apresentaram crescimento e desenvolvimento reduzidos, além de alto índice de mortalidade (Franco *et al* 1999).

No entanto, nenhum desses inibidores acima citados é capazes de inibir a ação da  $\alpha$ -amilase de *R. dominica*..

## II. Material e métodos

### 1. Metodologias utilizadas

Há dois métodos para se obter o gen de  $\alpha$ -amilase de *R. dominica*. O primeiro seria a extração diretamente do inseto, a chamada proteína bruta. E o segundo método é o isolamento do gene por meio do RNA. Devido ao tamanho do bruquídeo e a inviabilidade do processo de extração propriamente dita, foi escolhido o método de isolamento do gen por meio de técnicas moleculares. Os procedimentos descritos a seguir foram retirados de protocolos da Gibco e Promega.

#### 1.1. Extração de RNA

Coleta e esterilização de larvas de *R. dominica* (gentilmente cedidas pelo Dr. Lorini da Embrapa Trigo), congelamento destas em Nitrogênio líquido. Para conservação do material genético, guardar em freezer de temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$ .

1. Diluir a amostra em 1 mL de TRIzol por 50-100 mg de amostra, até ficar bem homogênea.
2. Centrifugar 12.000 xg por 10 minutos. O “pellet” resultante deverá ser desprezado, pois contém proteína, gordura, polissacarídeos e o sobrenadante contém o RNA.
3. Fase de separação: Incubar a amostra homogênea por 5 minutos de 15 a  $30^{\circ}\text{C}$  para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Adicionar 0,2 ml de clorofórmio por ml de TRIzol. Misturar vigorosamente, centrifugar as amostras. Haverá 3 fases:
  - A fase vermelha (orgânica), ficará abaixo, onde se concentra o DNA;
  - A fase fenol-clorofórmio, como intermediária;
  - A fase incolor (aquosa), acima. O RNA permanecerá nessa fase.
4. Precipitação do DNA: Transferir a fase aquosa (incolor) para um novo tubo. Adicionar 0,5 ml de álcool isopropil por 1 ml de trizol usado.

Incubar as amostras por 10 minutos de 2 – 8 °C . O precipitado de RNA, invisível antes da centrifugação, formará um “pellet”.

5. Limpeza do RNA: Remover o sobrenadante. Lavar o “pellet” de RNA com etanol 75% adicionando 1 ml de TRIzol. Misturar a amostra e centrifugue.
6. No final do procedimento, secar rapidamente o “pellet” e dissolver o RNA em água RNase free.

## **1.2. RT-PCR**

O RNA total ou o RNA poli (A)<sup>+</sup> podem ser usados como molde inicial, mas precisam estar intactos e livres de quaisquer contaminações.

### 1º passo:

Depois de extraído o RNA das larvas, o cDNA é sintetizado através da transcriptase reversa. Nesse passo, têm-se duas fitas de cDNA: uma com o "primer" “M3” e outra com o “Oligo T”.

### 2º passo: Purificação do cDNA

Foi feita com a enzima AMV-RT, com “Buffer RT” (tampão da enzima) e dNTP.

### 3º passo:

#### Reação de Tailing

Nessa reação, são acrescentadas `as 2 fitas de cDNA uma “cauda” do nucleotídeo A (adenina), na extremidade 5’ dessa fita.

Obs.: Na 1ª etapa, foram utilizados 2 tipos de RTs, o cDNA com “M3” e com “Oligo T” . Eram para serem testados e o que apresentasse melhor resultado continuaria no processo.

## **1.3. PCR**

Reação em cadeia da Polimerase – Forma rápida de clonagem de seqüências específicas de DNA sem a presença de células vivas. Essa técnica só é

possível se uma parte da seqüência já for conhecida, pois será usada para sintetizar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos (“primers”). É necessária também uma enzima especial, a DNA Polimerase, que faz a síntese do DNA a partir de um molde. No início de cada ciclo da reação há um breve aquecimento para a separação das fitas de DNA e cada “primer” vai se ligar a uma fita. Então, o DNA (fita separada) mais a DNA Polimerase e os quatro tipos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) começam a sintetizar o DNA.

1. Separação das fitas - Aquecimento da mistura (95 °C) por 5 minutos, 1 ciclo;
2. Desnaturação do DNA (95 °C), anelamento dos “primers” (55 °C) e a extensão das fitas (72 °C) por 90 segundos, no total de 30 ciclos;
3. Extensão final (72 °C) por 10 minutos, 1 ciclo.

No primeiro PCR, foram usados 2 “primers”: o dTAP (sem o G) e o Rhy1, sendo esse último um “primer” específico. O dT serve para anelar-se à “calda” de A e o AP serve para adicionar à extremidade 5’ uma seqüência X.

No segundo PCR, os “primers” usados foram o AP e o Rhy 2. Esse último também é um “primer” específico. O AP é necessário para anelar-se à seqüência X.

#### **1.4. Ligação**

Reação em que se ligam o vetor (plasmídeo) e o DNA inserto. A enzima essencial neste processo é a T4 DNA Ligase, pois cataliza a junção de 2 fitas de DNA entre os grupos fosfato- 5’ e hidroxil- 3’. O vetor usado foi pGEM T-Easy (Kit Promega). A temperatura ótima de atividade da enzima é de 4 °C.

#### **1.5. Placas**

O meio de cultura LB que foi usado, continha: Triptona, extrato de Levedura, NaCl e glicose.

- O antibiótico usado foi: Ampicilina (100µg/µL).

### **1.6. Transformação por Eletroporação**

Processo em que o plasmídeo de DNA é inserido em uma célula de bactéria competente por meio de um choque elétrico. O choque é importante para que a bactéria abra seus poros e o DNA entre, se ligando ao seu plasmídeo. Com a multiplicação do procarioto, será multiplicada também a quantidade do gen de interesse.

1. Adicionar 3 $\mu$  (1,8 $\mu$ g/ $\mu$ L) de DNA (resultante da Ligação) a 40 $\mu$  de células competentes de *E. coli* (XL1-Blue). O DNA deve estar diluído em água destilada estéril ou em baixa concentração salina;
2. Colocar a mistura em uma cubeta de eletroporação;
3. Eletroporar as células com o equipamento ajustado às seguintes condições: Resistência de 200 $\Omega$  e capacitância de 25 $\mu$ F. Aplicar um pulso;
4. Adicionar 1 ml de meio LB e transferir para um microtubo;
5. Incubar a 37 °C por 1 hora;
6. Plaquear 100 $\mu$  em meio contendo antibiótico;
7. Incubar as placas a 37 °C por 12-16 horas.

### **1.7. Inóculo**

Colocar as colônias de bactérias (*E. coli*) já transformadas em um meio de cultura contendo o antibiótico selecionado (Ampicilina 100 $\mu$ g/ $\mu$ L) em temperatura ótima (37 °C). Deixar agitando de 8-12 horas para que haja multiplicação destas colônias.

### **1.8. Mini-preparação de DNA**

A extração e purificação do DNA plasmidial (bacteriano) foram feitas usando as soluções **A**, **B** e **C**.

Componentes das soluções:

**A** - Tris 1M (pH 8,0); Glucose 2 M; EDTA 0,5 M; Lisozima (50 mg/ml) e água destilada.

**B** - NaOH 10 M; SDS 10% e água destilada.

**C** - Acetato de Amônia; Rnase A (10 mg/ml).

1. Encher o microtubo (1,5 ml) por completo com a cultura do inóculo e centrifugar por 1 minuto à 6.000 rpm. Descartar o líquido;
2. Ressuspender o “pellet” em 200µl da solução A e agitar;
3. Acrescentar 400µl da solução B pelas paredes do tubo;
4. Adicionar 300µl da solução C, deixar no gelo por 20 minutos;
5. Centrifugar por 20 minutos a velocidade de 13.000 rpm. Transferir para novos microtubos;
6. Completar o volume com Isopropanol. Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
7. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos;
8. Lavar o precipitado com adição de 300µl de Etanol 70% à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar em rotação máxima por 10 minutos;
9. Descartar o líquido e deixar o etanol evaporar;
10. Ressuspender o precipitado em 20µl de água destilada. Guardar à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **1.9. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

Em um microtubo:

- Amostra de DNA
- Tampão 10X
- Enzima *EcoRI* (10 u/µl)
- Banho-maria na temperatura de ativação da enzima por 4 horas.

O fragmento de DNA foi liberado do vetor por ação da enzima de restrição *EcoRI* que corta o plasmídeo em lugares específicos.

### **1.10. Gel de agarose**

As amostras de DNA (carregadas negativamente) ficam presas no gel, então a cuba de eletroforese produz corrente elétrica no sentido Negativo-Positivo. Isso faz com que as proteínas sejam “arrastadas” de acordo com seu tamanho.

A visualização do material genético é feita com irradiação de luz ultravioleta sobre o gel.

- gel de agarose 0,7% em T.A.E. 1x;
- aplicar as amostras nos poços do gel e ligar a corrente elétrica.

## 2. Métodos de procedimento para isolamento do gene

Em uma primeira etapa, através de um programa de computador, MOTIFS, foram desenhados “primers” baseados em regiões conservadas e de consenso de amilases de vários insetos, como: *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Diabrotica*, *Phaedon*, *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthocelides obtectus*, *Bombix mori*, *Ostrinia*, *Aedes aegypti* e *Apis mellifera*. Esses “primers” foram denominados M1, M2 e M3 (figura 4) todos eles com 25 MER (nucleotídeos).



Figura 4 - Representação dos “primers” no gene de amilase e suas orientações.

Foram coletadas 7.000 larvas de *Rhyzopertha dominica* usando lupa que foram lavadas com água bi-destilada e esterilizadas com Etanol 70%, em seguida congeladas em nitrogênio líquido, aliquotadas de 300 – 500 indivíduos por tubo (ependorff de 1,5 ml) e guardadas no freezer de temperatura -80 °C.

Para a extração do RNA, foram utilizadas aproximadamente 2.000 larvas. Vários produtos químicos foram usados, dentre eles o TRIzol, que permitiu continuar o processo em temperatura ambiente e sem que o RNA fosse contaminado com RNase e se degradasse. Para os “primers” M1, M2 e M3 foram utilizados para a obtenção do cDNA através do RT-PCR. O cDNA ou DNA complementar é a molécula de DNA produzida a partir do mRNA. É isento de íntrons (parte não-codificante do DNA genômico). É o molde usado na primeira rodada de PCR.

Amplificação do gen (PCR), inserção de DNA em plasmídeo de *E. coli* (eletroporação), crescimento de colônias de bactérias (inóculo) e isolamento do plasmídeo de bactérias (miniprep) foram procedimentos também usados. Obtendo-se então, o fragmento interno do gen.

A partir do fragmento obtido, novos “primers” foram desenhados na direção anti-senso para pegar a extremidade 5’ do gen. Denominados de Rhy1 (19 MER), Rhy2 (18 MER) e Rhy3 (19 MER) (figura 5).

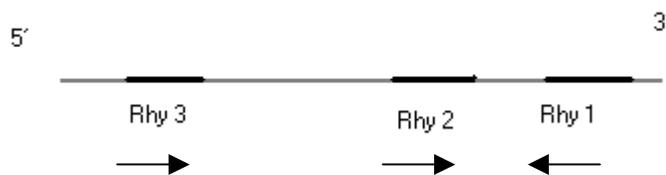


Figura 5 – Esquema dos “primers” anti-senso no gen de amilase.

Para a obtenção da região 5' do gen, utilizou-se a técnica 5' RACE. Essa etapa foi começada pelo Sistema RT-PCR usando os “primers” M2 e Rhy1. No PCR 1ª rodada foram usados os “primers” M2 e Rhy1, no PCR 2ª rodada, os “primers” Rhy2 e Rhy3 e também dT-AP. Foi feita a ligação no vetor pGEM T-Easy. transformação (eletroporação), inóculo e miniprep foram procedimentos repetidos. Obteve-se, então, o início do gen de  $\alpha$ -amilase (resultado não ilustrado). Outros 3 “primers” foram desenhados a partir desse novo fragmento isolado, extremidade 5' do cDNA: 1º - envolvendo região não codificadora + ATG, 2º - iniciando-se no ATG (Metionina, aminoácido em que começa a proteína) e 3º – a partir do início da proteína madura (sem o peptídeo sinal) (Figura 6).

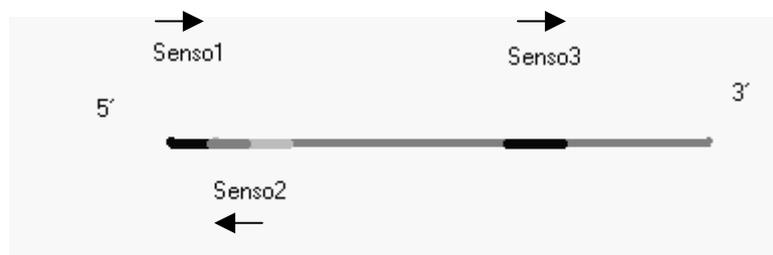


Figura 6– Esquema da disposição dos “primers” senso no início do gen de amilase.

Identificação: Rhy-senso1: 21 MER

Rhy-senso2: 22 MER

Rhy-senso3: 24 MER

Para a obtenção do final do gen, foi realizado novo RT-PCR usando a técnica 3'RACE com dT-AP(-G). Nos PCRs 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> rodada foram usados os "primers" Rhy-senso1 e Rhy-senso2, além de AP "primer". Foi feita a Ligação no vetor pGEM T-Easy. Novamente, os procedimentos de eletroporação, inóculos e minipreps foram repetidos. A digestão foi feita com a enzima EcoRI e amostras de DNA foram seqüenciadas. Foi assim, então obtido o restante do gen de  $\alpha$ -amilase.

### III. Resultados

O fragmento interno do gen foi obtido através de RT-PCR com os “primers” M2 e M3 (Figura 7).



Figura 7 – Sequência interna do gen de  $\alpha$ -amilase obtida por RT-PCR . As bases que flanqueiam o gene são correspondentes a sítios de restrição do vetor de clonagem pGEM T-Easy. 1, 2 e 3 correspondem a região do “primer” Rhy-Race 1, 2 e 3 a serem utilizados na próxima etapa de obtenção da região de 5’ do gene.

A região de 5’ do gene foi obtida por meio de RT-PCR com os “primers” M2 e Rhy1 (Figura 8).



Figura 8 – Sequência inicial do gen de  $\alpha$ -amilase obtida por RT-PCR. As bases mostradas no gene correspondem a sítios de restrição do vetor pGEM T-Easy. 1, 2 e 3 correspondem a região do “primer” Senso 1, 2 e 3 que serão utilizados na próxima etapa de obtenção da região de 3’ do gene.

Abaixo é mostrada a foto do gel de eletroforese da Digestão do fragmento obtido do começo do gen (Figura 9).

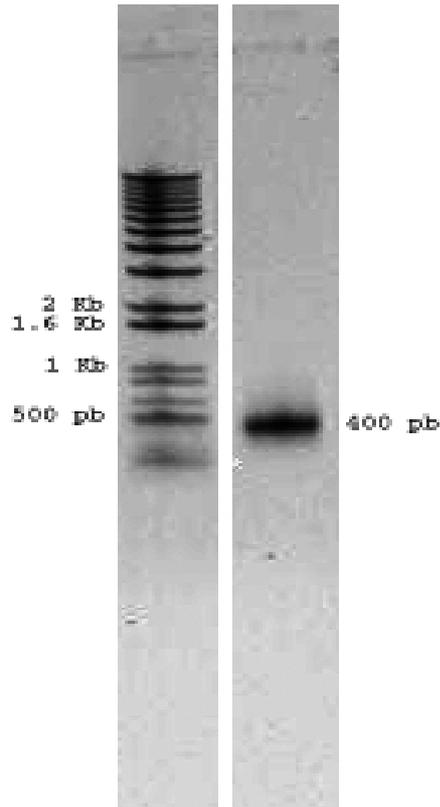


Figura 9 - Análise eletroforética em gel de agarose do produto de amplificação do 5' RACE. O fragmento de 400 pb foi amplificado utilizando-se os “primers” dT-AP e 5' RACE 3.

A região 3' do gene foi obtida por meio de RT-PCR com os “primers” Rhy-Senso1 e Rhy-Senso2 (Figura 10) e análise eletroforética (Figura 11).

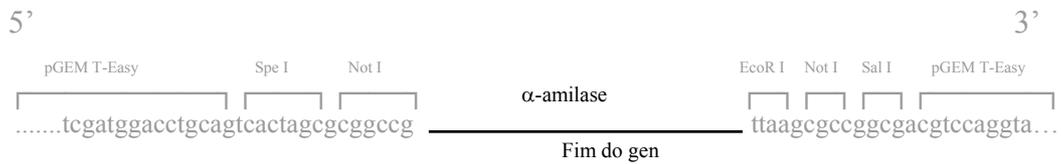


Figura 10 – Seqüência final do gen de α-amilase obtida por RT-PCR. As bases mostradas no gene correspondem a sítios de restrição do vetor pGEM T-Easy.

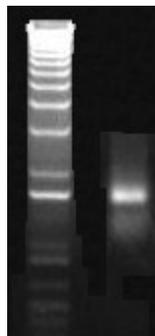


Figura 11- Análise eletroforética em gel de agarose. Gen completo de 1.600 pares de base.

#### **IV. Discussão**

O fragmento interno obtido com os “primers” M2 e M3 continha 600 pares de base. O fragmento inicial obtido com os “primers” M2 e Rhy1 era de 400 pares de base. O último fragmento obtido, com os “primers” Rhy Senso1 e Rhy Senso2, era de 1.600 pares de bases, ou seja, o gene completo. Um alinhamento do gene traduzido de *R. dominica* utilizando-se o programa Clustalw foi realizado, mostrando grande homologia com outros insetos.

O uso do controle biológico vem se mostrando promissor pela segurança e eficiência oferecida, principalmente, por ser uma alternativa economicamente viável e sem a necessidade de produtos químicos que deixam resíduos no meio ambiente.

Quando for expresso o gen isolado, serão feitos modelos complexos por meio de técnicas de modelagem molecular para que estudos se aprofundem e seja encontrado o inibidor específico dessa proteína. Sendo assim, possível, diminuir consideravelmente o ataque desta praga em lavouras e armazéns de estoque de grãos.

## **V. Conclusão**

Parte do projeto já está concluído. Apesar de não constar na literatura sobre o isolamento do gen de  $\alpha$ -amilase de *R. dominica*, este foi isolado com sucesso.

O gen de  $\alpha$ -amilase obtido será futuramente expresso em Baculovírus (células de inseto) usando o vetor pFast. E assim, será possível determinar a estrutura molecular da proteína para ser testada em experimentos de atividade contra diferentes inibidores.

Com esses projetos em andamento de pesquisadores sobre plantas recombinantes e inibidores de proteínas, definitivamente, espera-se diminuir a perda de grãos armazenados causados por ataque de insetos.

## **VI. Referências Bibliográficas**

ALBERTS, Bruce; Bray, Dennis; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; D. Watson, James. **Biologia Molecular da Célula.** 3<sup>a</sup> ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre-RS, 1996. 1294p.

CHRISPEELS, Marteen J.; GROSSI-DE-SÁ, Maria de Fátima; HIGGINS, T. J. V. **Genetic engineering with  $\alpha$ -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids** *Seed Science Research*, n. 8, p. 257-263. 1998.

Da SILVA, Maria Cristina Mattar . **Interações entre  $\alpha$ -amilase de insetos e inibidores de  $\alpha$ -amilase de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*): aspectos molecular e estrutural.** Tese (Doutorado Biologia Molecular)- Instituto de Ciências Biológicas, UnB, Brasília-DF, 2002. 116p.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* Disponível em: <<http://www.fao.org>> . Acesso em: 04 de nov. 2002.

**FRANCO, Octávio; MELO, Francislete; Da SILVA, Maria Cristina Mattar; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos: Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia*, ano 2, nº11. nov/dez. 1999.**

**FRANCO, Octávio; RIGDEN, Daniel; MELO, Francislete; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, nº 269, p. 397-412. 2002.**

FUTUYMA, Douglas J. **Biologia Evolutiva.** 2<sup>a</sup> ed., gráfica Paym, São Paulo-SP, 1997. 630p.

**GIBCO BRL** – Life Technologies – “Essential Technologies for the science of life”. 2002.

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 10 de maio de 2003.

LEHNINGER, Albert L. **Bioquímica: Biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato.** 2<sup>a</sup> ed., Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1996. 426p.

LEHNINGER, Albert L. **Princípios de Bioquímica.** 3<sup>a</sup> ed., Editora Sarvier, São Paulo-SP, 2002. 975p.

OLIVEIRA, Fátima. **Engenharia genética: O Sétimo dia da Criação.** 6<sup>a</sup> ed., Editora Moderna, São Paulo-SP, 1995. 135p.

PROMEGA – Protocols and applications guide – **The Source for Discovery** – Biological Research Products. 3<sup>a</sup> ed., Madison, WI. 1996.

RANDALL, David; BURGGREN, Warren; FRENCH, Kathleen. **Eckert – Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações.** 4<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2000. 1104p.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal.** 6<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2001. 659p.

**TECNIGRAN** – *Proteção de grãos e sementes.* Disponível em: <<http://www.tecnigran.com.br>> . Acesso em 04 de nov. 2002.

STORER, Usinger; Nibakken, Stebbins. **Zoologia Geral**. Editora Nacional, São Paulo, SP. 2000. 723p.

STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 4<sup>a</sup> ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 1996. 1000p.

UCKO, David A. **Química para as Ciências da Saúde**. 2<sup>a</sup> ed., Editora Manole Ltda., São Paulo-SP, 1992. 562p.

**UKY**. Disponível em: <<http://www.uky.edu/Agriculture/Entomology/entfacts/fldcrops/ef137.htm>>. Acesso em 10 de nov. 2002.

