

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**SILENCIAMENTO DOS GENES *LDH* E *ACK* DE *CLOSTRIDIUM
THERMOCELLUM* E *CLOSTRIDIUM THERMOSACCHAROLYTICUM* A FIM DE
AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL.**

**BARBARA MUNIZ
CLARISSA BASTOS
ÉRICA MOLFETTI
GUILHERME AUGUSTO
MARCOS HANASHIRO
MARIANA PEREIRA
NARA PADUA**

**BELO HORIZONTE
DEZEMBRO DE 2007**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	PÁG.3
2. OBJETIVOS -----	PÁG. 5
2.1. GERAIS -----	PÁG. 5
2.2. ESPECÍFICOS -----	PÁG. 5
3. RESULTADOS ESPERADOS -----	PÁG. 6
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	PÁG. 6
4.1. CULTURA DE BACTÉRIAS -----	PÁG. 6
4.2. SELEÇÃO DOS MUTANTES PARA ACK EM <i>C. THERMOSSACHAROLYTICUM</i> -----	PÁG. 6
4.3. IDENTIFICAÇÃO DO GENE RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE EM <i>C. THERMOSSACHAROLYTICUM</i> -----	PÁG. 7
4.4. IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA -----	PÁG. 11
4.5. CONSTRUÇÃO DOS VETORES KNOCKOUT -----	PÁG 12
4.6. INSERÇÃO DOS VETORES KNOCKOUT POR ELETROPORAÇÃO -----	PÁG 15
4.7. TESTAR A PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS BACTÉRIAS MUTANTES -----	PÁG 18
5. ORÇAMENTO -----	PÁG.18
6. CRONOGRAMA -----	PÁG.20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	PÁG.21

1.INTRODUÇÃO:

Um dos maiores problemas do mundo atual tem sido a questão dos combustíveis, pois sabemos que a sociedade moderna é extremamente dependente do petróleo, e que o mesmo encontra-se em iminente escassez.

Tendo conhecimento de tal dependência e sabendo de fatos como a crise do petróleo nos anos 70, em que ocorreram aumentos súbitos dos preços, viu-se que a sociedade não possuía uma fonte alternativa de energia. Diante disso passamos a perceber que deveríamos investir estudos e esforços não apenas uma única fonte de energia e diversificar esse processo de obtenção. Utilizar diversas fontes para não entrarmos em novas crises e buscar fontes renováveis e menos poluentes em busca de um desenvolvimento mais sustentável. (1)

Atualmente dentre as fontes de energia menos poluentes estão os biocombustíveis, como exemplo, álcool, biodiesel, biomassa e biogás, sendo o álcool um dos combustíveis de maior interesse por diversas vantagens. Dentre elas podemos citar sua alta volatilidade, importante para a rápida resposta dos motores de combustão interna usados nos carros atuais, apresenta alto índice de octonagem, reduz a emissão de óxidos nítricos no ambiente, emite menor quantidade de gás carbônico e de precursores de ozônio na atmosfera, libera grande quantidade de energia em sua queima, além de ser abundante por ser produto de matéria-prima renovável. (2)

A questão dos biocombustíveis deverá ser tratada com enorme atenção, pois apesar das inúmeras vantagens dos biocombustíveis, devemos lembrar que se não tomarmos os devidos cuidados, as áreas de cultivo alimentar poderão se tornar áreas para cultivo de matéria-prima para combustíveis e assim gerar uma crise alimentar, ou mesmo as florestas de hoje serem transformadas em enormes áreas de monocultura.

Diante desse cenário surgem os bioprocessos que convertem recursos renováveis tais como amido, celulose e hemicelulose em combustíveis líquidos, e por isso são de grande importância. (3)

O álcool, desde os anos 80, tem sido utilizado como combustível no Brasil e a maior parte, do mesmo, produzido no país é obtido através da fermentação a partir da cana-de-açúcar. Uma forma de otimizar esse processo e obter maior volume de álcool a partir de uma mesma quantidade matéria-prima é a produção de etanol por fermentação direta de produtos celulósicos. A utilização da celulose é extremamente interessante, pois sabemos que a quantidade de energia

solar recebida na superfície terrestre é de 2.5×10^{21} Btu/ano e a quantidade estocada através da via fotossintética é 10x maior que a necessidade mundial, além de que a celulose é o carboidrato mais abundante produzido na biosfera. (2).

Sabe-se que o material estrutural das plantas é de lignocelulose que é composta por celulose, hemicelulose e lignina. Para a utilização da celulose como substrato, é necessário quebrar os polímeros da celulose e da hemicelulose, transformando-os em açúcares para serem utilizados na via da fermentação. Atualmente duas tecnologias têm sido bastante estudadas, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. A primeira consiste em expor a matéria-prima a ácido sulfúrico diluído, no entanto a transformação se dá muito rapidamente e, devido às condições agressivas, parte dos açúcares é destruída. Já para a hidrólise enzimática é importante lembrar que as enzimas já estão presentes na própria natureza, pois as celulasas é que permitem quebrar a celulose em açúcares simples, que servem como fonte de carbono e energia para os microorganismos naturalmente. O problema dessa técnica é que a produção de celulasas em escala industrial ainda é muito caro. (4)

Uma possível alternativa para a técnica de hidrólise enzimática é a utilização de microorganismos que possuem o complexo de enzimas da celulase e ao invés da produção de enzimas artificialmente.

A bactéria *Clostridium thermocellum* é uma boa opção para realizar a hidrólise enzimática e também a fermentação para a produção de etanol. Tal bactéria foi sugerida devido a inúmeras vantagens, dentre as quais podemos citar: possuir um complexo de enzimas muito estável e capaz de degradar os cristais de celulose de maneira altamente eficaz; utilizar resíduos de lignocelulose (raridade entre os organismos vivos); ser anaeróbica (assim não é necessário um método eficiente de transferência de oxigênio no processo de fermentação, pois se sabe que uma das etapas mais caras do processo de fermentação industrial é proporcionar a quantidade adequada de oxigênio para manutenção das culturas); Tem sua temperatura ótima de crescimento em torno de 60 °c (assim os problemas de contaminação são atenuados, além de facilitar a recuperação de etanol no processo de destilação sem que seja necessário um processo de filtração para separação); possuem baixa necessidade metabólica de nutrientes assim apresentam maior conversão do substrato a etanol e por fim, aceita facilmente o estabelecimento de co-cultura com outros organismos produtores de etanol e fermentadores de pentoses. Como a *Clostridium thermocellum* não utiliza todos os resíduos produzidos a partir da celulose, utilizaremos também, em co-cultura,

a bactéria *Clostridium thermosaccharolyticum*. (2)

Mesmo apresentando grande número de vantagens a *Clostridium thermocellum* e a *Clostridium thermosaccharolyticum* possuem a via de fermentação para etanol não muito eficiente, pois os açúcares são utilizados não só para a produção de etanol como também em vias alternativas para produzir acetato e ácido láctico.

No presente projeto pretendemos silenciar os genes das enzimas responsáveis por captar parte dos substratos utilizados na via do etanol para a produção de acetato e ácido láctico, diminuindo assim a eficiência do processo de fermentação. Serão silenciados os genes das enzimas acetato cinase e lactato desidrogenase responsáveis pela existência de vias alternativas. Bloqueando essas vias, esperamos produzir um microorganismo mais eficiente para ser utilizados no processo de fermentação, obtendo assim maior quantidade de etanol a partir de uma mesma quantidade de matéria-prima.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS:

Utilizar técnicas de biologia molecular para silenciar os genes de *C.thermocellum* e *C.thermosaccharolyticum*, que codificam as enzimas acetato cinase e lactato desidrogenase, com o intuito de aumentar a quantidade de produtos que serão utilizados na via de produção do etanol.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Selecionar mutantes de *C. thermosaccharolyticum* para a produção de acetato cinase através de tratamento com nitrosoguanidina.
- Identificar o gene responsável pela produção da enzima lactato desidrogenase em *C. thermosaccharolyticum*. Para tanto pretende-se clonar o gene candidato em um plasmídeo pET16C, inseri-lo em *E.coli* para expressão, purificar a proteína resultante e verificar produção de lactato pela proteína purificada a partir de piruvato
- Construir vetores knockout para os genes *ack* e *ldh* de *C.thermocellum* e *ldh* de *C.thermosaccharolyticum*.
- Inserir o vetor knockout nas bactérias *C.thermocellum* e *C. thermosaccharolyticum* através de eletroporação. Para que este objetivo seja cumprido deve-se preparar as

culturas bacterianas, cresce-las em bactérias transformadas para estudos de viabilidade e verificação da eletrotransformação através da recuperação das culturas em meio contendo antibiótico, selecionando as bactérias transformadas através da resistência a kanamicina e Eritromicina.

- Testar a produção de etanol

3. RESULTADOS ESPERADOS

Como a técnica de clonagem de genes do gênero *Clostridium* já foi estabelecida, espera-se que a expressão do gene candidato a ser o codificante da enzima Ldh seja feita, pelo grau de homologia existente entre este gene e o gene de *Bacillus megaterium* espera-se que o gene candidato seja o gene efetivo. (Lynd et al, 1998)

Apesar da expressão heteróloga de genes de *Clostridium* em *E.coli* seja, hoje, uma técnica comum, a introdução de gene em *Clostridium* ainda é uma técnica em estágio inicial. Ainda assim, pela técnica de eletroporação estabelecida por Lynd et al em 2004, espera-se que o índice de transformação das bactérias seja de 2.2×10^5 transformantes por μg de DNA, e que a recombinação dos genes seja em uma frequência maior que 10^3 (Lynd et al, 1998).

A partir disso, espera-se que as bactérias deixem de expressar os genes codificadores das enzimas ack e Ldh, favorecendo a produção de etanol através da eliminação dos braços da sua via de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CULTURA DE BACTÉRIAS:

As culturas de *E.coli* dam+ serão mantidas em meio simples com glicerol e deverão ser congeladas. As células de *C. thermosaccharolyticum* ATCC 7956 serão cultivadas em meio CM4 contendo celobiose 1% em estufa anaeróbica a 58 °C. As células de *C. thermocellum* serão cultivadas em meio anaeróbico em estufa anaeróbica a 58 °C.

4.2. SELEÇÃO DOS MUTANTES PARA ACK EM *C. THERMOSSACHAROLYTICUM*:

Para inibir a produção de acetato pela *Clostridium thermosaccharolyticum*, não precisamos silenciar o gene que codifica a acetil cinase. Segundo estudos anteriores, é possível

produzir mutantes deficientes na produção de acetato usando o mutagênico nitrosoguanidina (NTG) e selecionando através da resistência ao fluoroacetato. Estes mutantes produzem mais etanol que a cepa parental (Rothstein, 1985). Esta mutação permite que mais Acetil-Coa esteja disponível para a produção de etanol.

Para isso cultivaremos células de *C. thermosaccharolyticum* ATCC 7956 em meio CM4 contendo celobiose 1% em estufa anaeróbica a 58 °C. Com 24 a 48 horas de cultivo (colônia confluyente), as células serão mutageneizadas com nitrosoguanidina (NTG) a uma concentração final de 500 µg/ml por 3 min. Após tratamento com NTG, as células serão lavadas e ressuspendidas em 5 ml de meio CM4-celobiose fresco e incubadas a 58 °C overnight. As culturas serão plaqueadas em placas de CM4-celobiose contendo fluoroacetato de sódio a 30 mM. As colônias serão testadas pela produção de acetato e etanol da seguinte forma: serão cultivadas separadamente por 24 hs em meio CM4-celobiose líquido, centrifugadas e o sobrenadante será testado para a presença dos produtos por cromatografia líquida de Beckman de alta pressão equipada com uma coluna de exclusão de íons ácidos orgânicos (HPX87H). Através deste teste serão selecionadas as colônias que produzirem mais etanol em comparação ao acetato. Estas colônias serão cultivadas e uma alíquota será mantida congelada em glicerol.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DO GENE RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE EM *C. THERMOSACCHAROLYTICUM*:

Após a obtenção destes mutantes, iremos silenciar a enzima lactato desidrogenase destes, para que o piruvato seja desviado para a via de produção do etanol. Para isso devemos descobrir qual é o gene que codifica tal enzima para que então possamos silenciá-lo. Em estudos anteriores, Lynd L. R. e colaboradores conseguiram obter em fragmento amplificado de 180pb de um gene que presumem codificar a lactato desidrogenase, com 32 % de semelhança de seqüência de aminoácidos com a seqüência para tal enzima em *Bacillus megaterium*. Pretendemos amplificar este fragmento e cloná-lo em *Escherichia coli* para que possamos ter certeza de que ele daria origem à uma enzima capaz transformar piruvato em lactato na colônia.

Para isso, construiremos os primers forward e reverse como usados por Lynd L. R. e colaboradores, no entanto o primers forward será acrescido com a seqüência do sítio de clivagem da enzima de restrição Xho I em sua extremidade 5' e o primer reverse será acrescido com a seqüência do sítio de clivagem de BamH I em sua extremidade 3'.

Extrairemos o DNA de *C. thermosaccharolyticum* ATCC 7956 seguindo o protocolo:

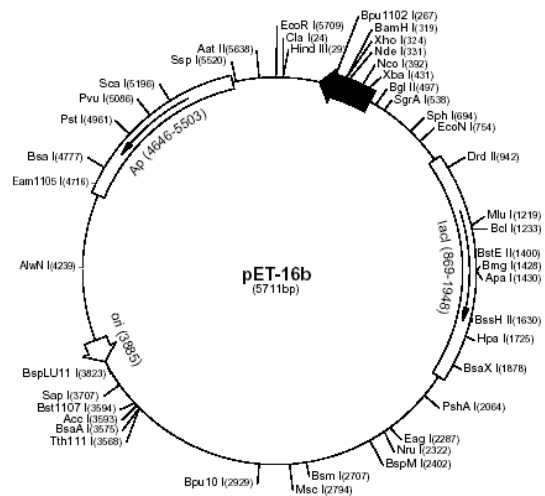
- Cultivo de *C. thermosaccharolyticum* ATCC 7956 em meio CM4 líquido
- Centrifugação e descarte do sobrenadante
- Ressuspender o pellet em 567µl de tampão TE por pipetagem. Adicionar 50µl de SDS 10% e 6µl de proteinase K 20mg/ml. Vortexar e incubar em banho-maria por no mínimo 4 horas à 55°C.
- Adicionar 100µl de NaCl 5M e homogeneizar. Adicionar 20µl de RNase 10mg/ml e incubar à temperatura ambiente por 30 minutos.
- Adicionar 80µl de solução de CTAB/NaCl (10% CTAB em 0,7M de NaCl). Homogeneizar e incubar à 65°C por 10 minutos.
- Adicionar um volume igual (780µl) de 24:1 clorofórmio/ álcool isoamílico, homogeneizar cuidadosamente por 10 minutos e centrifugar por 10 minutos à 13400 rpm.
- Transferir o sobrenadante para um novo eppendorf (com cuidado para não transferir a interfase) e acrescentar 25:24:1 fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico até completar o tubo. Homogeneizar cuidadosamente por 10 minutos e centrifugar por 10 minutos à 13400 rpm.
- Transferir o sobrenadante (sem interfase) para um novo eppendorf e acrescentar 1,0ml de isopropanol. Homogeneizar cuidadosamente. Centrifugar por 15 minutos à 13400 rpm e descartar o sobrenadante por inversão do tubo.
- Acrescentar 1,5ml de etanol 70% e centrifugar por 10 minutos à 13400 rpm. Descartar o sobrenadante por inversão do tubo e deixar secar até não haver vestígios de álcool.
- Ressuspender o pellet em 100µl de TE em banho-maria à 37°C por no mínimo 2 horas.

Realizaremos técnica de PCR utilizando os primers descritos anteriormente, tampão, dNTPs, solução de MgCl₂, Taq DNA polymerase e o A extraído de *C. thermosaccharolyticum*. O programa do termociclador será a princípio:

- 94 °C por 4 min
- 35 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min)
- 72 °C por 6 min

Este programa pode ser mudado se necessário.

O produto de PCR será clonado em vetor pET-16b, ilustrado abaixo:



Este vetor codifica uma cauda de poli-histidina fundida à proteína inserida entre os sítios de clivagem das enzimas Xho I e BamHI. Essa cauda tem afinidade por íons de Níquel, o que posteriormente será utilizado para a purificação da proteína.

Para a clonagem será seguido o seguinte protocolo:

- Precipitar a amostra com 10% v/v de Acetato de Sódio 3M, e 3X volume de etanol absoluto gelado. Incubar 10min no gelo seco ou 30min a -70° C. Centrifugar a 14.000 rpm por 10min. Ressuspender pellet em 25 µl de ddH2O.
- Modificação das extremidades. Em 100 µl de reação adicionar :
 - 25 µl do produto de PCR ressuspendido.
 - 10 µl de tampão 10X pol I (0.5M tris pH7.5, 0.1M MgCl2, 10mM DTT, 0.5 mg/ml BSA, 200µM dNTPs).

- 10 μ l de rATP 10mM.
- 10 U de T4 Polinucleotídeo Quinase e 10 U de DNA Pol. I.
- ajustar o volume para 100 μ l.
- incubar a reação a 37°C por 1 hora e parar com 1 μ l EDTA 0.5M pH8.
- Reprecipitar a amostra com 10% v/v de Acetato de Sódio 3M e 3X volume de etanol absoluto gelado. Incubar 10min no gelo seco ou 30min a -70° C. Centrifugar a 14.000 rpm por 10min. Ressuspender pellet em 25 μ l de ddH2O.

Os vetores serão digeridos com enzimas de restrição Xho I e BamH I, seguindo o protocolo:

Pra um volume de reação de 100 μ l:

- Pipetar em um tubo, 10 μ l do tampão React Buffer 10X
- adicionar o vetor (até 10 μ g) pré-aquecido a 37°C.
- acrescentar aproximadamente 2 u. de cada enzima para cada μ g de DNA.
- completar o volume final com água Milli-Q autoclavada
- incubar a 37°C por 3 horas.

Para clonagem do inserto no vetor será seguido o protocolo:

- acrescentar inserto e vetor (pré-digerido) na razão molar de 3:1
- adicionar aproximadamente 1/15 v/v de T4 Ligase
- adicionar 10% v/v tampão da Ligase 10X concentrada
- completar o volume final com ddH2O
- deixar reagir overnight a 4°C

Com os vetores prontos, bactérias *Escherichia coli* do tipo selvagem serão transformadas por técnica de eletroporação. O protocolo a ser utilizado é o seguinte:

- Colocar as cubetas de eletroporação no gelo.
- Pegar eppendorfs contendo 40 μ l de bactérias concentradas para eletroporação

armazenadas a -70 C e descongelá-las no gelo por 15 minutos.

- Acrescentar a cada eppendorf 1µl da solução contendo os vetores clonados.
 - Deixar incubando no gelo por 5 min.
 - Passar para uma das cubetas de eletroporação o conteúdo dos eppendorfs sem deixar bolhas
 - Preparar o eletroporador para utilizar 1700 volts.
 - Secar a cubeta e colocá-la na câmara.
 - Apertar duas vezes o botão de choque
 - Imediatamente após o choque, adicionar 1000 µl de meio SOC e retirar a solução da cubeta com uma pipeta Pasteur, passando-a para um eppendorf.
 - Incubar os tubos a 37 °C por 1 hora.
 - Plaquear em LB ágar contendo ampicilina. Incubar as placas por 16 - 20 h, retirando da estufa antes que se formem colônias satélites.
- As colônias obtidas serão passadas para meio LB líquido e cultivadas.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA:

Para testar a produção de lactato desidrogenase pelas bactérias transformadas é preciso inicialmente centrifugar essas bactérias *E. coli* e utilizar o sobrenadante na técnica de Cromatografia de afinidade com metal ionizante (IMAC) para purificar a proteína. Para essa técnica, será seguido o seguinte protocolo:

- A retenção de uma proteína nos diferentes metais está de acordo com a afinidade do metal pelo Imidazol. Selecionou-se o metal Ni⁺² por possuir essa característica.
- Faz-se a passagem da solução de NiCl₂ sobre a coluna do IMAC que está previamente empacotada com o gel (Sephacose 6B-epoxi-activada IDA). Em seguida, a coluna é lavada com H₂O para remoção de íons Ni⁺² em excesso e equilibrada com uma solução tampão fosfatos 50mM contendo NaCl 1M a pH 7.0
- Aplica-se o sobrenadante que contém a proteína a um caudal de 10 a 20 cm³/h.
- A coluna é lavada com a solução tampão até a A₂₈₀ apresentar um valor inferior a 0.05.
- Faz-se a eluição da proteína adsorvida na coluna pelo método do gradiente linear de Imidazol (0-30mM) no mesmo sistema de tampão.
- As proteínas que possuem a cauda de histidina irão interagir com o Ni⁺² e ficarão presas

à parede da coluna enquanto o restante precipita. A eluição é feita com um doador de elétrons (o Imidazol, nesse caso) que competiu com a proteína pela interação com o Ni^{+2} .

Com a proteína purificada, nos resta verificar se ela realmente é a enzima lactato desidrogenase. Para isso, realizamos uma reação em tubo de ensaio. Colocamos um substrato contendo piruvato, e após um certo tempo de reação verificamos a presença de lactato.

4.5. CONSTRUÇÃO DOS VETORES KNOCKOUT:

Nesta etapa os genes funcionais de Lactato dehydrogenase (Idh) e Acetato Quinase (ak) serão substituídos, via recombinação homóloga, por genes modificados de forma a se tornarem não funcionais. Esta forma de troca de DNA já foi previamente estudada em bactérias mesófilas do gênero *Clostridium*. (Lynd et al, 1998)

O sistema operativo de enzimas de restrição existentes em *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* será utilizado como forma de simplificar o trabalho. Além disso, será utilizado como vetor de propagação de plasmídeos a linhagem de *E.coli* Dam^+ evitando o ataque do DNA por endonucleases de restrição na bactéria *C. thermocellum* (Demain, Newcomb and Wu ; 2005)

A construção desse vetor se baseia na inserção de genes de resistência no interior do gene alvo de forma a manter o fenotipo observado após a transformação (Cripps, 2006). Para tanto, será feito um par de sítios de restrição ou uma digestão por exonuclease III formando um único sítio de restrição. O gene de resistência a eritromicina EM^r , originado do $\text{pAM}\beta 1$, será inserido dentro do sítio de restrição do vetor que visa nocautear o gene Idh. Já para nocautear a enzima ack será utilizado o gene de resistência a kanamicina Kan^r . É de extrema importância que cada vetor tenha inserido em seu gene alvo, marcadores diferentes para que a seleção dos organismos nocauteados para os dois genes diferentes seja mais eficiente.

Um segundo marcador de resistência será inserido no vetor externamente ao gene modificado. Devido a sensibilidade das duas bactérias a ampicilina, espera-se utilizar o gene que confere resistência a esse antibiótico (Amp^r – repressor da síntese de β -lactamase). (Kuga, Okamoto, Inoue, 1999)

O gene modificado será reintroduzido em *E.coli* Dam^+ através de plasmídeo sensível a temperatura pUB190 que já foi descrito por dar maior eficiência a transformação e seleção em organismos termofílicos. (Cripps, 2006)

Para a construção do vetor os seguintes passos serão desenvolvidos:

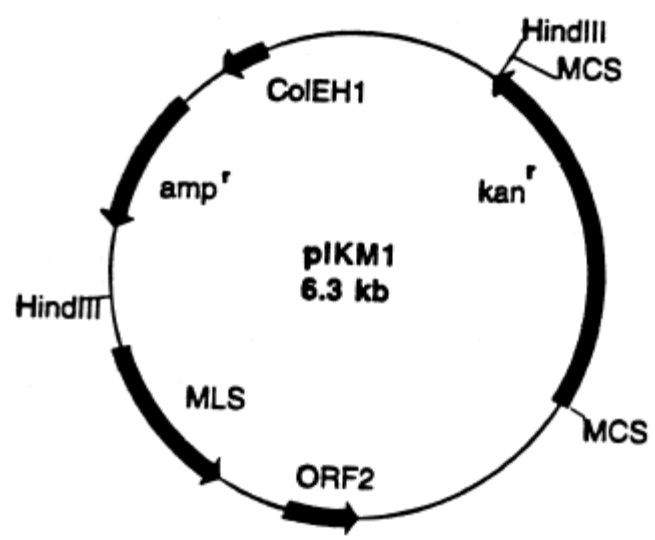
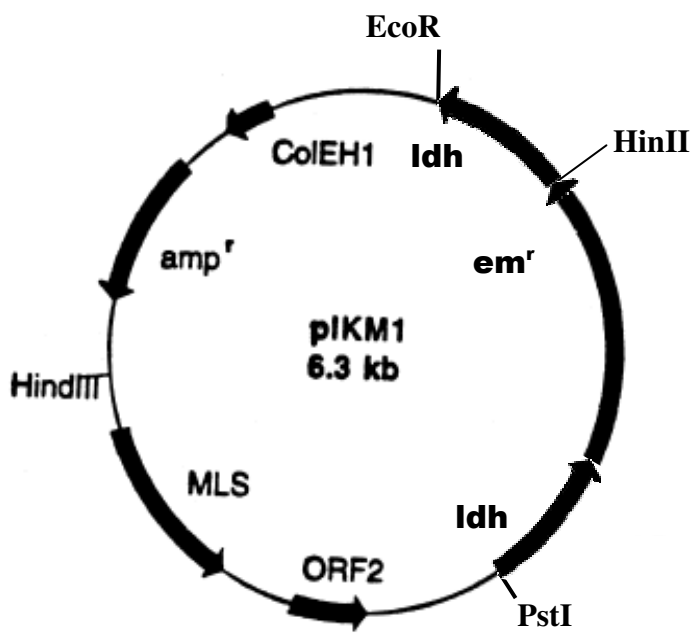
A. Uma PCR das diferentes enzimas. Os ciclos serão realizados em uma máquina de PCR a partir das seguintes características de reação:

- Ciclo 1: desnaturação a 95°C por 5 minutos; anelamento por 1 minuto a 47°C e extensão por 2 minutos a 72°C.
- Ciclo 2: desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento por 1 minuto a 47°C, extensão por 2 minutos a 72°C e, posteriormente, a amostra será incubada por 5 minutos a 72°C. Este ciclo é repetido por 30 vezes.

As enzimas utilizadas nesta reação serão uma mistura igual de *Pfu* e *Taq* polimerase. A concentração dos dNTPs e do tampão utilizados é recomendado pelos fabricantes das polimerases.

B. A purificação dos produtos da PCR através de uma eletroforese em gel de agarose, sendo que o produto da reação será diluído do gel através do QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)

C. A construção do plasmídeo pIKM1 é feita através da inserção do gene de resistência Kan^r ou Em^r através de cortes feitos pelas enzimas EcoRI/PstI no plasmídeo pIMP1. O pIKM1 contém a origem Gram- negative ColEH1, a Gram-positiva pIm13 (ORF2), eos marcadores para seleção; resistência a Ampicilina (Amp^r) e Macrolide Lincosamide Streptogramin (MLS). Este plasmídeo será usado para a transformação em uma cepa de *E.coli* Dam⁺. As colônias resistentes ao ampicilina serão selecionadas e os plasmídeos resultantes isolados serão usados para o processo de inserção do vetor nas bactérias em estudo.



Exemplo dos plasmídeos de Knockout

Tabela contendo os *primers* para amplificação dos genes necessários para a construção dos vetores knockout de *Clostridium thermocellum* (Stevenson, Weimer, 2005)

Gene or ORF	Forward primer	Reverse primer	Sequence source (reference) ^a
<i>ack</i>	CTCAGATGCTGGGCAAACCT	ACAAATACTTGCTCCGTTTCCAA	AA96952 ^e
<i>ldh</i>	TTGCAAATATTGCGGGAATTC	GAAATCTGCTCCTCGCACTGA	Q8KQC4 and NZ_ABG03000005.1 ^{d,f}

^a Unless otherwise indicated, all numbers are GenBank accession numbers.

^d Direct submission.

^f Protein sequence used to reverse translate and search the unfinished *C. thermocellum* genome sequence.

4.6. INSERÇÃO DOS VETORES KNOCKOUT POR ELETROPORAÇÃO:

As instruções para eletrotransformação de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium termosaccharolyticum* foram desenvolvidas de acordo com Michael V, 2003.

Preparação dos meios de cultura de *C. thermocellum* e *C. termosaccharolyticum*

Deve ser feita em câmara anaeróbica equipada com incubador, modelo 2000

- Caldo DSM122 (<http://www.dsmz.de/media/med122.htm>)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.30	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2.60	g
KH ₂ PO ₄	1.43	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	7.20	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.13	g
Na-β-glycerophosphate	6.00	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1.10	mg
Glutathione	0.25	g
Yeast extract	4.50	g
Resazurin	1.00	mg
Cellulose (Avicel or MN 300)	10.00	g
or Cellobiose	5.00	g
Distilled water	1000.00	ml

Ajustar o pH de 7.0 - 7.2. Atmosfera gasosa: 95% N₂ + 5% CO₂.

Deve-se fazer as seguintes modificações nesse meio:

[K₂HPO₄ x 3 H₂O] foi reduzida para 1.9 g/L

glutaciona foi substituída por cisteína-HCL de concentração final 0,5 g/L

Avicel ou celobiose 5g/L

0,58% de ágar Difeo

Para isolamento do DNA foram adicionados aos caldos de celulose e, eritromicina e kanamicina 20 µg/mL (Sigma)

Meios de cultura para E. coli

Deve ser feito em câmara anaeróbica equipada com incubador, modelo 2000

Caldo Columbia ou ágar Columbia (caldo Columbia mais 1,2% de ágar Difeo) com 200 µg ampicilina/mL

Eletrotransformação

Preparação das células:

Inocular 1mL de cultura estocada de Avicel em 10 mL de caldo de celulose e incubar até crescimento evidente.

Inocular 1mL dessa cultura em 10mL do mesmo caldo e incubar por 9 horas

Inocular 1mL da cultura resultante em 60mL de caldo de celulose e incubar overnight

Diluir a cultura 1: 3 em caldo de celulose pré-aquecido

Foi feita uma sub- cultura por 3horas em uma garrafa de 500mL com movimentação brusca na presença ou ausência de isoniacina (Sigma)

Resfriar a cultura em gelo

Coletar células para centrifugação em tubos de polipropileno de 15 mL

Centrifugar na velocidade máxima por 10min (modelo Fisher 225)

Lavar precipitado resultante 2 vezes com volume igual de 0,2M celulose pré resfriada no gelo por 5 minutos.

Decantar o sobrenadante por inversão dos tubos

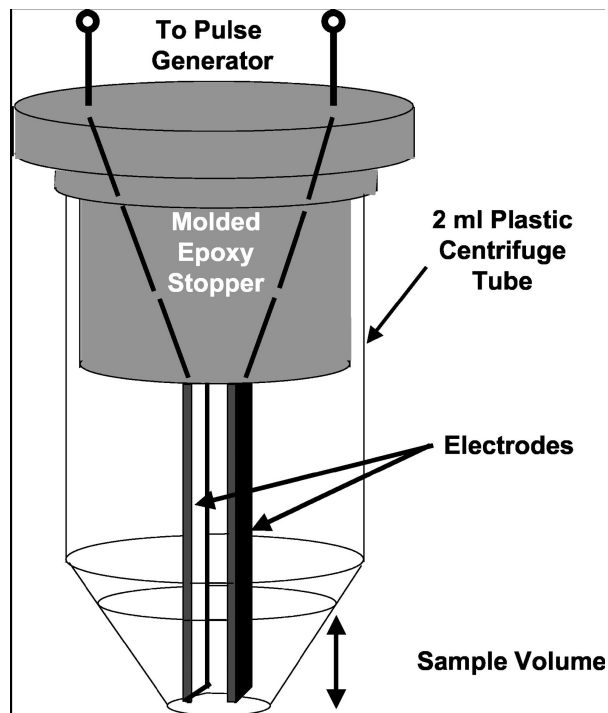
Ressuspender o precipitado no volume restante de sobrenadante (aproximadamente mesmo volume do precipitado de células)

Coletar em um tubo de polipropileno de 15mL

Colocar células em gelo até o momento de sua utilização

Aplicação do pulso elétrico

Maquinaria para eletrotransformação



Os eletrodos devem ser conectados ao gerador de voltagem que fica exteriormente à câmara anaeróbica. Eles não devem encostar na parede do tubo.

Usar tubos próprios para eletroporação, modelo sugerido Bio-Rad

90 μ L de suspensão celular devem ser adicionados ao tubo de eletroporação e colocados no gelo antes de serem usados. Utilizar tubos modificados ou tubos da Bio Rad.

Secar cuidadosamente esses tubos antes da aplicação do pulso elétrico

Adicionar 2,0 μ L de DNA plasmidial contendo aproximadamente 2,5 μ g de DNA e misturar gentilmente com a suspensão celular.

Aplicar pulso elétrico de 25kv por 10-ms

Após a eletrotransformação manter as células em um tubo não seletivo, contendo celulose, por 24 horas a 58°C para recuperação.

Diluições das amostras resultantes da eletroporação serão posteriormente resuspensas em um ágar contendo 50mg/ml de kanamicina/ eritromicina e plaqueadas em um meio também seletivo.

As culturas líquidas e plaqueadas serão incubadas por 2 dias a 60°C em um incubador estacionário contendo nitrogênio livre de oxigênio como gás atmosférico.

Validação da eletrotransformação

Para confirmar se a eletrotransformação ocorreu será realizada uma PCR feita com os primers específicos para os genes de interesse com DNA total dos clones Em^r Kan^r como molde.

Analisar a viabilidade das células tratadas de acordo com o número de unidades formadoras de colônias das amostras tratadas em relação ao controle.

4.7. TESTAR A PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS BACTÉRIAS MUTANTES:

Alíquotas de 10 ml de crescimento bacteriano, obtido a partir de caldo seletivo com kanamicina e a partir do crescimento da cultura não-mutante em meio não seletivo, serão centrifugados. O sobrenadante será submetido a uma reação enzimática para determinar a concentração de etanol.

Para tanto, utiliza-se 0,25U/ml de álcool oxidase e 2 U/ml de peroxidase em tampão fosfato (0,07% H₂PO₄ e 3,43% de HPO₄) pH 7,5 contendo 0,014% aminoantipirina e 0,056% fenol segundo metodologia descrita por Salgado et al (2000).

Os produtos desta reação serão medidos em um espectrofotômetro e o valor das absorvâncias comparados.

5. ORÇAMENTO

MATERIAL	FORNECEDOR	PREÇO/UNIDADE	QTD.	TOTAL
Cepa de <i>E.coli</i> Dam ⁺	ATCC	R\$ 378,00	1	R\$ 378,00
Bactéria <i>Clostridium thermocellum</i>	ATCC	R\$ 378,00	1	R\$ 378,00
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	ATCC	R\$ 315,00	1	R\$ 315,00
Estufa de cultura bacteriológica	Sovereign	R\$ 2000,00	1	R\$ 5000,00
100 MM dNTP Set	Invitrogen	R\$ 602,00	1	R\$ 602,00
Primer – (cada base)	Uniscience	R\$ 4,06	100	R\$ 406,00
Micropipeta regulável capacidade de 0,5-10ul	Uniscience	R\$ 220,00	1	R\$ 220,00
Micropipeta regulável capacidade de 2-20ul	Uniscience	R\$ 220,00	1	R\$ 220,00
Micropipeta regulável capacidade de 20-200ul	Uniscience	R\$ 220,00	1	R\$ 220,00
Micropipeta regulável capacidade de 100-1000ul	Uniscience	R\$ 220,00	1	R\$ 220,00
Ponteiras com capacidade de 10 ul	Uniscience	R\$ 50,00	1	R\$ 50,00
Ponteiras com capacidade de 200 ul.	Uniscience	R\$ 35,00	1	R\$ 35,00

Ponteiras com capacidade de 1000 ul	Uniscience	R\$ 45,00	1	R\$ 45,00
Luva para procedimento ambidestra média	J.PROLAB	R\$ 10,00	20	R\$ 200,00
Placa de petri 90 x 15 mm s/ div. Ps cristal	J.PROLAB	R\$ 224,00	1	R\$ 224,00
TE Buffer (100x)	Uniscience	R\$ 260,67	1	R\$ 260,67
Xho I - 5.000 unidades	Uniscience	R\$ 245,94	1	R\$ 245,94
BamH I - 10.000 unidades	Uniscience	R\$ 214,84	1	R\$ 214,84
Dodecylsulfate.Na-salt cryst., res. grade (SDS)	Uniscience	R\$ 402,39	1	R\$ 402,39
QIAGEN Proteinase K (2 mL)	Uniscience	R\$ 377,49	1	R\$ 377,49
V1 Plus - Personal bioVortex	Uniscience	R\$ 717,57	1	R\$ 717,57
RNase A - 10 mg	Uniscience	R\$ 324,10	1	R\$ 324,10
Taq DNA Polimerase com tampão Termopol 2000u	Uniscience	R\$ 721,83	1	R\$ 721,83
T4 Polynucleotide Kinase - 500 unidades	Uniscience	R\$ 214,84	1	R\$ 214,84
DNA Polymerase I (E. coli) - 500 unidades	Uniscience	R\$ 230,39	1	R\$ 230,39
T4 DNA Ligase - 400.000 U/mL - 20.000 unidades	Uniscience	R\$ 245,94	1	R\$ 245,94
DNA Polymerase I (E. coli) - 500 unidades	Uniscience	R\$ 230,39	1	R\$ 230,39
T4 DNA Ligase - 400.000 U/mL - 20.000 unidades	Uniscience	R\$ 245,94	1	R\$ 245,94
QIAGEN Genomic-tip 100/G	Uniscience	R\$ 1.151,77	1	R\$ 1.151,77
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Uniscience	R\$ 506,77	1	R\$ 506,77
EcoR I - 10.000 unidades	Uniscience	R\$ 214,84	1	R\$ 214,84
Pst I - 10.000 unidades	Uniscience	R\$ 230,39	1	R\$ 230,39
Taq Polimerase Brasil	Invitrogen	R\$ 205,00	1	
SODIUM HYDROXIDE, 5.0 M MOLECULAR* BIOLOG Y REAGENT	Sigma-Aldrich	R\$ 314,78	1	
Clorofórmio	Labsynth	R\$ 19,46	1	R\$ 19,46
Álcool Isoamílico	Labsynth	R\$ 21,75	1	R\$ 21,75
Fenol	Labsynth	R\$ 30,71	1	R\$ 30,71
Álcool Absoluto	Labsynth	R\$ 7,98	10	R\$ 79,98
Eppendorf	Labsynth	R\$ 25,60	1	R\$ 25,60
Pipeta Pasteur	Labsynth	R\$ 23,00	1	R\$ 23,00
Tubo de polipropileno de 15 mL	Labsynth	R\$ 18,56	1	R\$ 18,56
Tubo de polipropileno de 50 mL	Labsynth	R\$ 21,12	1	R\$ 21,12
Tubo de ensaio em ps 12 x 75 mm s/ tampa	Labsynth	R\$ 39,00	1	R\$ 39,00
Acetato de sódio solução aquosa 3 m para biologia molecular	Sigma-aldrich	R\$ 155,40	1	R\$ 155,40
Edta buffer ph 8 0.5m	Invitrogen	R\$ 307,63	1	R\$ 307,63
Cloreto de magnésio	Sigma-aldrich	R\$ 136,62	1	R\$ 136,62
Epoxy activated-sepharose 6b	Sigma-aldrich	R\$ 1.346,20	1	R\$ 1.346,20
Nicl 0.01m-tris-hcl ph 8.5; 0.1m peg mme 2000 20% sol.*	Sigma-aldrich	R\$ 355,52	1	R\$ 355,52
Buffer solution ph 7.0 for hpce, 50 mm s o-phosphate	Sigma-aldrich	R\$ 252,46	1	R\$ 252,46
Imidazol, 99%	Sigma-aldrich	R\$ 101,06	1	R\$ 101,06
Columbia agar, for microbiology	Sigma-aldrich	R\$ 69,50	1	R\$ 69,50
Ácido isonicotínico hidrazida (isoniazida), >=99%	Sigma-aldrich	R\$ 46,34	1	R\$ 46,34

Ampicillin trihydrate usp	Sigma-aldrich	R\$ 579,22	1	R\$ 579,22
Ezmix lb broth base	Sigma-aldrich	R\$ 122,24	1	R\$ 122,24
Lb agar ampicillin -100	Sigma-aldrich	R\$ 105,46	1	R\$ 105,46
Sodium pyruvate sol	Invitrogen	R\$ 51,63	1	R\$ 51,63
Cubetas p/eletroporação gap de 0,1 cm , caixa 1 521,85 521,85 0,00 C/50 unidades	BIOAGENCY	R\$ 521,85	1	R\$ 521,85
Sub-total				19470,41
Bolsa de iniciação científica		R\$ 300,00	36	R\$ 10800,00
Sub-total				R\$ 30270,41
Reajustes e variações (5%)				R\$ 1513,52
TOTAL				R\$ 31783,93

6. CRONOGRAMA

<i>Atividades</i>	<i>Bimestres</i>								
	<i>1°</i>	<i>2°</i>	<i>3°</i>	<i>4°</i>	<i>5°</i>	<i>6°</i>	<i>7°</i>	<i>8°</i>	<i>9°</i>
<i>Revisão bibliográfica</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
<i>1</i>	<i>x</i>	<i>x</i>							
<i>2</i>		<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>					
<i>3</i>				<i>x</i>	<i>x</i>				
<i>4</i>					<i>x</i>	<i>x</i>			
<i>5</i>						<i>x</i>	<i>x</i>		
<i>Análise dos resultados</i>					<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	
<i>Redação de artigo para publicação</i>								<i>x</i>	<i>x</i>

Atividades:

1. Selecionar mutantes de *C. thermosaccharolyticum* para a produção de acetato kinase através de tratamento com nitrosoguanidina.
2. Identificar o gene responsável pela produção da enzima lactato desidrogenase em *C. thermosaccharolyticum*. Para tanto pretende-se clonar o gene candidato em um plasmideo pET16C, inseri-lo em *E.coli* para expressão, purificar a proteína resultante e verificar produção de lactato pela proteína purificada a partir de piruvato
3. Construir vetores knockout para os genes ack e ldh de *C.thermocellum* e ldh de *C.thermosaccharolyticum*.
4. Inserir o vetor knockout nas bactérias *C.thermocellum* e *C. thermosaccharolyticum* através de eletroporação. Para que este objetivo seja cumprido deve-se preparar as culturas bacterianas, cresce-las em bactérias transformadas para estudos de viabilidade e verificação da eletrotransformação através da recuperação das culturas em meio contendo antibiótico, selecionando as bactérias transformadas através da resistência a kanamicina e Eritromicina.
5. Testar a produção de etanol

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1 http://www.unica.com.br/pages/alcool_combustivel.asp
- 2 WU,J.H David; DEMAINE, Arnold; NEWCOMB, Michael. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. Microbiology and Molecular Biology, Março.2005, p. 124–154
- 3 SIMITANI, J. , KAWAGUCHI, T. , TAKADA, G. Março,1998. Expression of Aspergillus aculeatus No. F-50 Cellohydrobiolase I (cbh I) and β -glucosidase (bg11) genes by saccharomyces cerevisiae. Biosci, Biotechnol, Biochem. p. 1615-1618.
- 4 http://www.inova.unicamp.br/inovanosmunicipios/proj_unicamp_detail.php?id=37
- LYND, Lee; DEMAINE, Arnold; GUERINOT, Mary Lou. Pathway Engineering to improve ethanol production by Thermophilic Bacteria. NSF Form 1359,1998.
- CRIPPS, Roger. Biofuel production from plant biomass derived sugars. TMO Renewables Ltda,2006.
- KUGA, Akio; OKAMOTO, Ryoichi; INOUE, Matsuhisa. ampR Gene Mutations That Greatly Increase Class C b-Lactamase Activity in Enterobacter cloacae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,Mar. 2000, p. 561–567
- STEVESON,David;WEIMER, Paul J. Expression of 17 Genes in Clostridium thermocellum ATCC 27405 during Fermentation of Cellulose or Cellobiose in Continuous Culture. Applied and Environmental Microbiology, Aug 2005, p. 4672–4678
- BADGER, P.C. Ethanol From Cellulose: A General Review. Trends in new crops and

- new uses. 2002.
- <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/67/pdf/Cromatografia%20de%20Afinidade%20com%20metal%20imobilizado.pdf>
 - Tyurin MV, Desai SG, Lynd LR. Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Feb;70(2):883-90.
 - Jiao Zhao, Tomoya Baba, Hirotada Mori and Kazuyuki Shimizu. Effect of zwf gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metabolic Engineering* 6 (2004) 164–174
 - TKISON, Antony; CRIPPS, Roger; ELEY, Kirstin; RUDD, Brian; TODD, Martin. Thermophilic microorganisms with inactivated lactate dehydrogenase gene (ldh) for ethanol production. World Intellectual Property Organization nov 2006.