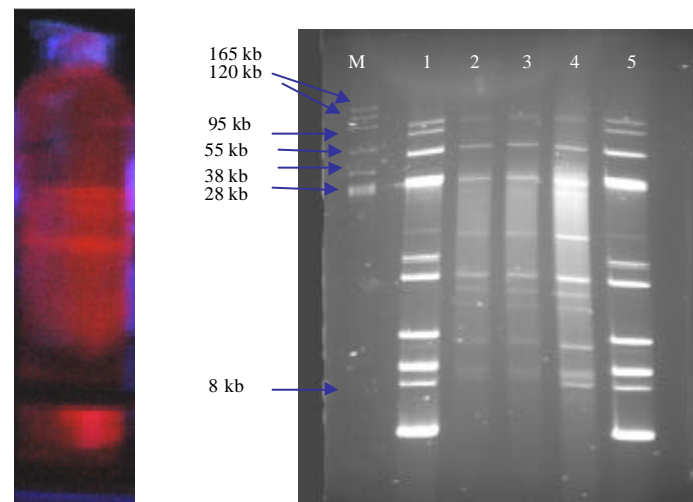


Purificação de DNA Plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por Ultracentrifugação em Gradiente de Cloreto de Césio



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana

Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

José Ivo Baldani

Chefe Geral

Eduardo Francia Carneiro Campello

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rosângela Stralio

Chefe Adjunto Administrativo

WELTER, C.; MEESE, E.; BLIN, N. Rapid step-gradiente purification of mitochondrial DNA. **Molecular Biology Reports**, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 117-120, 1998.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-6709
Outubro/2005

Purificação de DNA Plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por Ultracentrifugação em Gradiente de Cloreto de Césio

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 08

Patrícia de Medeiros Gitahy
Gláucia Manoella de Souza Lima
Jean Luiz Simões Araújo
Marlene Teixeira de-Souza
José Ivo Baldani

Seropédica – RJ

2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Kátia Regina dos Santos Teixeira

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2005): 50 exemplares

G536p Gitahy, Patrícia de Medeiros

Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por Ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο / Gláucia Manoella de Souza Lima, Jean Luiz Simões de Araújo, Marlene Teixeira de Souza, José Ivo Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 08).

ISSN 1676-6709

1. Bactéria. 2. DNA. 3. Ácido nucléico. I. Souza, G. M. de, colab. II. Araújo, J. L. S. de, colab. III. De-Souza, M. T., colab. IV. Baldani, J. I., colab. V. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). VI. Título. VII. Série.

CDD 579.3

© Embrapa 2005

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice***. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-69.

LERECLUS, D.; LECADET, M. M.; RIBIER, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystaliferous strains. ***Molecular and General Genetics***, New York, v. 186, p. 391-398, 1982.

MAHILLON, J.; REZSOHAZY, R.; HALLET, B.; DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. ***Genetica***, The Hague, v. 93, p. 13-26, 1994.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. ***Agrociência***, Chapingo, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; MARTINELLI, S.; OMOTO, C.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. ***Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento***, Uberlândia, v. 6, n. 31, p. 18-27, 2003.

RHOTMAN, R. H. **Large-Scale Purification of Plasmids pRIT4501 and pRIT4502 by Cesium Chloride Density Gradient Centrifugation.** Disponível em <http://www.rit.edu/~rhrsbi/GEPages/LabManual?QiagenPlasmidprep.pdf> Acesso em: 21 jun. 2005.

SAMBROOK, J.; FRIETSCH, E. F.; MANIATIS, T. ***Molecular Cloning : A Laboratory Manual***. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHOLLE, M. D.; WHITE, C. A.; KUNNIMALAIYAAN, M.; VARY, P. S. Sequencing and characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 69, n. 11, p. 6888-6898, 2003.

SLACK, J. M.; LAWRENCE, S. D. Purification of DNA for the transfection of a *Spodoptera frugiperda* cell line. ***Methods in Cell Sciences***, Burlington, v. 24, p.155-163, 2002.

GARGER, S. J.; GRIFFITH, O. M.; GRILL, L. K. Purification of plasmid DNA y a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 117, n. 3, p. 835-842, 1983.

GITAHY, P. M. **Seleção e caracterização de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* com atividade entomopatogênica para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis***. 2000. 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Centro de Ciências e da Saúde, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

GITAHY, P. M.; DE-SOUZA, M. T.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I. Isolamento e caracterização do gene *cry1ab* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76, ativa para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBM, 2003. CD ROM.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: Wiley & Sons, 2000. 350 p.

GONZALEZ JR., J. M.; BROWN, B. J.; CARLTON B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 79, n. 22, p. 6951-6955, 1982.

GONZÁLES JR., J. M.; DULMAGE, H. T.; CARLTON, B. C. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**, San Diego, v. 5, p. 351-365, 1981.

KHAN, D. W.; BUTLER, M. D.; COHEN, D. L.; GORDON, M.; KHAN, J.; WINKLER, M. E. Purification of plasmid by tangencial flow filtration. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 69, n. 1, p. 101-106, 2000.

SUMÁRIO

Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
DNA plasmidial	6
<i>Bacillus thuringiensis</i> e seus plasmídeos.....	6
Purificação de DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl).....	8
Objetivo.....	9
Material e Métodos	9
Estirpes utilizadas neste trabalho	9
Condições de crescimento e extração de DNA plasmidial.....	10
Preparo do DNA plasmidial e ultracentrifugação gradiente de CsCl.....	11
Identificação e coleta das bandas de interesse.....	12
Análise eletroforética.....	14
Resultados e Discussão.....	14
Conclusões.....	15
Agradecimentos.....	16
Referências Bibliográficas.....	17

Purificação de DNA Plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por Ultracentrifugação em Gradiente de Cloreto de Césio

Patrícia de Medeiros Gitahy¹
Gláucia Manoella de Souza Lima²
Jean Luiz Simões de Araújo³
Marlene Teixeira De-Souza⁴
José Ivo Baldani³

Resumo

Bacillus thuringiensis é uma bactéria que sintetiza delta-endotoxinas letais para diferentes grupos de insetos, sendo a maior responsável pelo mercado mundial de bioinseticidas. As proteínas tóxicas são codificadas por genes denominados *cry*, presentes em plasmídeos conjugativos com mais de 30 MDa, e que geralmente, são difíceis de serem purificados pelos métodos rotineiros de extração e purificação. O objetivo deste trabalho foi ajustar uma metodologia para obtenção dos plasmídeos presentes nas estirpes de *B. thuringiensis*, a partir da técnica de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio. Neste caso, foram usados como modelo as estirpes HD-1 e S76 da subespécie *kurstaki*. O método de lise alcalina e purificação em gradiente de cloreto de césio empregado, permitiu a obtenção de grandes quantidades de DNA plasmidial com alto grau de pureza. Foram realizadas adaptações no protocolo original que tornaram o protocolo utilizado para as estirpes HD-1 e S76 uma técnica menos laboriosa e mais rápida. Ainda houve redução significativa na quantidade de brometo de etídeo empregada e na quantidade de resíduos químicos sólidos contaminados com essa substância, extremamente tóxica, que foram usados no processo. O procedimento de purificação descrito foi um método adaptado para purificação dos pequenos e grandes plasmídeos de *B. thuringiensis* e foi usado com sucesso para as estirpes HD-1 e S76.

Referências Bibliográficas

- AGUILAR-CORDOVA, E.; FONTES, J. Rapid isolation of substrate-quality plasmid DNA without CsCl-dye density gradients. **Biotechniques**, Natick, v. 9, n. 5, p.538-540, 1990.
- AZEVEDO, M. O. Centrifugação. In: AZEVEDO, M O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A.; DE-SOUZA, M. T. (Ed.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Editora da UnB, 2003. p. 21-34.
- BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A; HOLDEN, M. T.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.
- BIRNBOIN, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 15, p. 13-25, 1979.
- CARLSON, C. R.; JOHANSEN, T.; LECADET, M. -M.; KOLSTØ, A. -B. Genomic organization of the enthomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715. **Microbiology**, New York, v. 142, Part 7, p. 1625-1634, 1996.
- CARLTON, B. C.; GONZÁLEZ JR., J. M. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In: DURBAU, D. (Ed.). **The molecular biology of bacilli**. New York: Academic, 1985. v. 2. p. 211-249.
- FIÚZA, L. M. Ecologia de *Bacillus thuringiensis* e sua aplicação no manejo de insetos pragas agrícolas e urbanas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 9., 2004, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2004. p. 12.

¹ Doutoranda em Biotecnologia vegetal – UFRJ; Bolsista na Embrapa Agrobiologia

² Doutoranda em Biologia molecular – UnB; Departamento de Biologia Celular – UnB

³ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Rod. BR 465, km 07 – Seropédica/RJ

⁴ Departamento de Biologia Celular – UnB

3. Houve uma redução na concentração de EtBr de 925 µg/mL para 555 µg/mL. Esta é uma característica vantajosa neste protocolo, uma vez que o EtBr é uma substância extremamente tóxica e a descontaminação dos resíduos no laboratório é um procedimento trabalhoso e de alto custo.
4. Na metodologia original a remoção de EtBr após a ultracentrifugação é feita com lavagens sucessivas em butanol saturado com NaCl e transferência da fase aquosa para um novo tubo enquanto que nesse protocolo foi utilizada a mesma solução para remoção desse contaminante, porém, com a retirada da fase orgânica (butanol/NaCl). Dessa forma foi diminuída a quantidade de resíduos químicos sólidos como, por exemplo, microtubos tipo “Eppendorf” e ponteiras.
5. Vários autores ajustaram o método de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério para purificação dos plasmídeos em diferentes organismos e utilização dessas moléculas em inúmeros processos, como técnicas de clonagens, PCR, seqüenciamento, transfecção de células, entre outras (GARGER et al., 1983; AGUILAR-CORDOVA & FONTES, 1990; BERRY et al., 2002; SLACK & LAWRENCE, 2002; SCHOLLE et al., 2003). O procedimento de purificação proposto é um método válido para purificação dos grandes e pequenos plasmídeos de *B. thuringiensis* com elevada pureza e alto rendimento.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro oferecido pela Capes, CNPq, Programa “Cientista do Nosso Estado” FAPERJ, e suporte técnico proporcionado pela Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal – UFRJ, Departamento de Biologia celular e molecular e Departamento de Microbiologia – UnB e Laboratório de Genética e Bioquímica – Embrapa Agrobiologia.

Plasmid DNA purification of *Bacillus thuringiensis* by ultracentrifugation in Cesium Chloride gradient

Abstract

Bacillus thuringiensis is a Gram positive bacterium that synthesizes delta-endotoxins lethal to different groups of insects therefore has been the largest responsible for the world market of bioinsecticides. The toxic proteins are coded by genes denominated *cry*, presents in conjugative plasmids with more than 30 MDa and that generally are difficult to be purified by the routine methods of extraction and purification. The objective of this work was to adjust the ultracentrifugation methodology in gradient of cesium chloride to obtain purified plasmids in HD-1 and S76 strains of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. The procedure allowed to obtain great amounts of plasmids DNA from HD-1 and S76 strains with high degree of purity. In addition, it was less laborious and much faster. Besides, there was significant reduction in the amount of ethidium bromide and of solid chemical residues contaminated with the toxic substance. The described protocol is a modification of a purification method for small and big plasmids of *B. thuringiensis* strains and could be applied with success for strains the HD-1 and S76.

Index terms: Plasmids, Gram positive, cesium chloride gradient.

Introdução

DNA plasmidial

Plasmídeos são moléculas de DNA circular, extracromossômica, que têm origem de replicação autônoma, encontradas em bactérias. Geralmente contém genes que conferem vantagens adaptativas e são habitualmente empregadas na engenharia genética, principalmente como veículos para clonagem (AZEVEDO et al., 2003). Os plasmídeos podem ser classificados pelo tamanho, em pequenos com menos de 10 Kb, não-conjugativos e normalmente presentes em múltiplas cópias na célula hospedeira, ou grandes plasmídeos com mais de 30 Kb, geralmente conjugativos e presentes em uma ou duas cópias.

Em função da importância dessas moléculas nas células hospedeiras e no uso como ferramentas moleculares, várias técnicas para a extração e purificação dos plasmídeos tem sido otimizadas.

Bacillus thuringiensis e seus plasmídeos

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, entomopatogênica, aeróbia ou aeróbia facultativa e ubíqua, sendo encontrada em diversos substratos naturais como solo, plantas, água, fezes e carcaças de animais, grãos, produtos armazenados e em larvas de insetos hospedeiros (FIÚZA, 2004). Este microrganismo tem sido utilizado como bioinseticida há aproximadamente cinco décadas, sendo responsável, atualmente, por mais de 90% do faturamento mundial desse mercado (POLANCZYK et al., 2003; POLANCZYK & ALVES, 2003). A principal atividade entomocida dessa bactéria é atribuída as delta-endotoxinas ou proteínas Cry, letais e extremamente específicas para diferentes ordens de insetos e outros invertebrados. Essas toxinas se acumulam no citoplasma das células em esporulação, em forma de inclusões cristalinas protéicas (ICPs), e quando ingeridas pelos insetos susceptíveis provocam a morte dos mesmos (GLARE e O'CALLAGHAM, 2000).

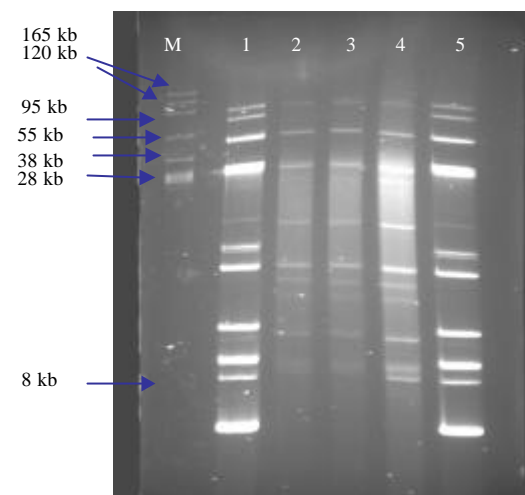


Figura 3: Perfil DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em gel de agarose (0,5%). Os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e purificados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. M: marcador supercoiled (*Bac-tracker*TM-Epicentre, Austrália); linhas 1 e 5: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1; linhas 2, 3 e 4: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76.

Conclusões

1. Protocolo tradicional para purificação de plasmídeos por gradiente de CsCl (SAMBROOK et al., 1989) foi um dos primeiros métodos bioquímicos desenvolvidos e pode ser utilizado para obtenção de plasmídeos de vários microrganismos (SLACK & LAWRENCE, 2002). É um método lento e laborioso e vários protocolos já foram ajustados a partir deste procedimento. Nesse trabalho, foi aprimorado o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989), para a purificação de rotina dos plasmídeos de DNA de *B. thuringiensis*. De acordo com as adaptações realizadas o método otimizou a técnica nos seguintes pontos:
2. Tempo de ultracentrifugação sugerido por SAMBROOK et al. (1989), foi reduzido de 16 horas para 4 horas.

Análise eletroforética

As amostras foram analisadas em gel de agarose (0,5%), com 5 mm de espessura e 24 cm de comprimento em tampão TAE 1x (Tris base 0,04 M, EDTA 0,001 M, ácido acético glacial 1,14 mL). Foram aplicados 10 µg de DNA plasmidial da amostra *Btk* S76 e 3,7 µg da amostra *Btk* HD-1. As condições de corrida foram: 20 V por 1h seguido de 40 V por 22h. Em seguida o gel foi corado em uma solução EtBr 0,5 µg/mL por 1 h e o excesso de EtBr foi removido em água destilada por 2 h. O DNA plasmidial foi observado em transiluminador de luz UV e fotografado em fotodocumentador Kodak Gel Logic 100®.

Resultados e Discussão

Após a ultracentrifugação, com auxílio do transiluminador, foi possível visualizar a formação de 2 bandas distintas e coleta da banda inferior, de maior intensidade, contendo o DNA plasmidial de interesse. O rendimento das preparações variou de concentrações de 100 até 1400 ng/µL.

Análise de eletroforese demonstrou que a estirpe S76 de *B. thuringiensis* apresentou perfil plasmidial semelhante à estirpe HD-1, ou seja de pelo menos dez plasmídeos (Figura 3). Os resultados foram semelhantes aos obtidos por GITAHY et al. (2003), e confirmaram as observações de CARLTON & GONZALEZ (1985), em que estirpes da mesma subespécie com atividade bioinseticida diferentes podem apresentar perfil de plasmídeos semelhantes. O *B. thuringiensis* é conhecido por apresentar um grande número de DNA extracromossomal (de um a pelo menos dezessete plasmídeos) e tamanho entre um e mais de 600 kb na maioria das subespécies (GONZÁLES JR. et al., 1981; CARLSON et al., 1996).

Estudos de cura plasmidial relacionaram a produção das ICPs com a presença de plasmídeos (GONZÁLES JR. et al., 1981). A maioria das subespécies de *B. thuringiensis* apresenta de um, a pelo menos, dezessete plasmídeos com massa molecular entre um e mais de 300 megadaltons (MDa) (CARLSON et al., 1996), isto é, cerca de 1,52 a 600 quilobases (kb). Os plasmídeos de *B. thuringiensis* podem representar cerca de 10 a 20% do genoma, que varia de 2,4 a 6,9 megabases (Mb) (CARLSON et al., 1996). Baseado em homologia de seqüência, LERECLUS et al. (1982) observaram que plasmídeos de diferentes subespécies de *B. thuringiensis* se enquadram em duas categorias, que não apresentam relação molecular entre si. A primeira é constituída de plasmídeos com massas moleculares inferiores a 15 MDa, na maioria crípticos, e a segunda de plasmídeos com massas moleculares superiores a 15 MDa. Os genes *cry* que codificam as delta-endotoxinas estão localizados em plasmídeos com mais de 30 MDa, que se replicam pelo mecanismo teta e com baixo número de cópias (CARLTON & GONZÁLES JR., 1985). Muitos desses são conjugativos ou podem ser co-transferidos com outros plasmídeos. Além do mais, os genes *cry* estão freqüentemente associados a elementos genéticos móveis, como seqüências de inserção (IS) e transposons (GONZÁLES JR. et al., 1982; LERECLUS et al., 1993; MAHILLON et al., 1994). As duas últimas características desses elementos extracromossomais podem justificar, pelo menos em parte, a diversidade e complexidade do espectro de atividade de *B. thuringiensis*. BERRY et al. (2002), realizaram um trabalho pioneiro no qual foi totalmente seqüenciado um plasmídeo de 128 kb portador de genes *cry* (pBtoxis), originário de uma estirpe de *B. thuringiensis israelensis*. O plasmídeo pBtoxis ainda codifica um grande número de genes cujos produtos estão envolvidos na formação do cristal e na viabilidade celular.

Em função da importância, complexidade e possível aplicabilidade desses plasmídeos para fins biotecnológicos, torna-se necessária a otimização da metodologia utilizada para extração e purificação dessas moléculas, principalmente os grandes plasmídeos de *B. thuringiensis* que contém os genes *cry*.

Purificação de DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)

Plasmídeos de grande massa molecular requerem preparações de extração mais elaboradas a fim de que a purificação seja capaz de separar essas moléculas de possíveis contaminações com o DNA cromossomal. O método descrito originalmente para a purificação de DNA plasmidial baseado na ultracentrifugação em gradiente de equilíbrio de densidade (ultracentrifugação isopícnica), utilizando o cloreto de céσιο como sal de alta massa molecular é laborioso e lento (GARGER et al., 1983). Desse modo, uma série de modificações na metodologia tem sido propostas com o objetivo de tornar os protocolos mais simples, rápidos e seguros (AGUILAR-CORDOVA & FONTES, 1990; KHAN et al., 2000; SLACK & LAWRENCE, 2002; WELTER et al., 1998). Essa metodologia é adequada para separar DNA cromossomal, DNA plasmidial, RNA de diferentes espécies, bem como lisossomos e ribossomos (AZEVEDO et al., 2003).

Os ácidos nucléicos podem ser extraídos das células usando diferentes métodos, em seguida misturados à solução de CsCl e submetidos a ultracentrifugação. Quando o interesse está na separação de partículas de densidade diferentes, como é o caso da separação do DNA cromossomal e do plasmidial, o método de escolha é a ultracentrifugação isopícnica. Nesse caso, as moléculas analisadas movem-se em um gradiente até encontrarem um ponto, denominado ponto isopícnico, onde flutuam em um “colchão” formado pelo gradiente de CsCl (esse é o ponto do gradiente igual ao ponto de flutuação da molécula). Esse ponto de flutuação, também denominado densidade boiante, é a razão entre a densidade da molécula e a densidade do CsCl (AZEVEDO et al., 2003). A densidade, por sua vez, é uma função da razão do conteúdo de AT/GC e também da conformação circular superenovelada (forma I), circular relaxada (forma II) ou linear (forma III) da molécula de DNA (ROBERT & RHOTMAN, 2004).

O DNA plasmidial e o cromossomal apresentam densidades de flutuação muito próximas e não podem ser separados facilmente no estado de equilíbrio. Portanto, é necessária a adição de brometo de

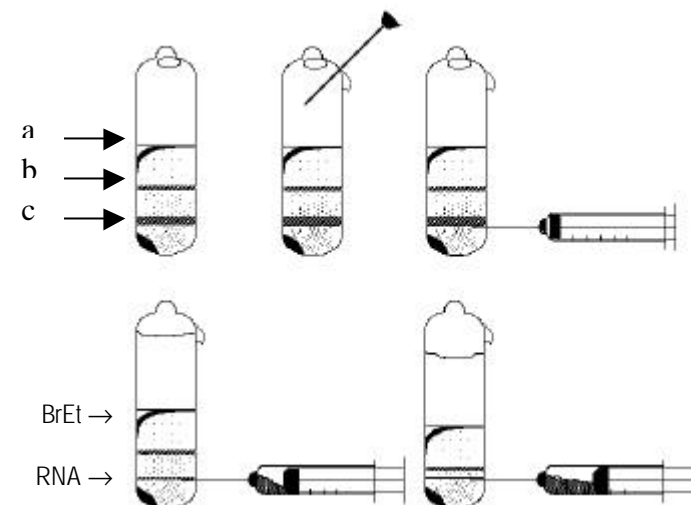


Figura 2. Perfil de bandas observado após a ultracentrifugação e coleta da banda de interesse contendo o DNA plasmidial. As setas a esquerda indicam a altura das bandas observadas: a) Resíduo de proteínas, b) DNA cromossomal, c-) DNA plasmidial. No fundo do tubo observa-se a deposição de RNA e na parede lateral é comum o acúmulo de EtBr. Esquema adaptado (ROBERT & RHOTMAN, 2004).

As principais diferenças entre o protocolo original descrito por SAMBROOK et al. (1989), e o procedimento aqui proposto estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Diferenças principais descritas no protocolo de purificação plasmidial em gradiente de cloreto e céσιο descrito por SAMBROOK et al. (1989) e o procedimento proposto neste trabalho.

Etapas modificadas / Protocolo utilizado	Protocolo SAMBROOK et al. (1989)	Modificações propostas
Rotor	Vti65 (Beckman)	Vti 65.2 (Beckman)
Rotação	45000 RPM	65000 RPM
Tempo de ultracentrifugação	16 h	4h
Quantidade de EtBr	925 µg/mL	555 µg/mL
Remoção do EtBr	Lavagens sucessivas em butanol saturado com NaCl e transferência da fase aquosa para novos tubos.	Foi utilizada a mesma solução para remoção do EtBr, porém, com a retirada da fase orgânica (butanol/NaCl).

Identificação e coleta das bandas de interesse

Com auxílio do transiluminador UV (UVGL-58) é possível visualizar a formação de 2 bandas distintas. A banda superior contém DNA cromossomal residual, que não é removido durante a lise alcalina. A banda inferior, de maior intensidade, contém o DNA plasmidial de interesse. É possível observar no fundo do tubo RNA e proteínas residuais que se localizam acima da banda referente ao DNA cromossomal (apresentado esquematicamente na figura 2). O tubo foi colocado em um suporte fixo e a banda do plasmídeo foi recuperada com agulha 18G de forma cuidadosa para não desfazer o perfil obtido e evitar a contaminação com RNA. Foi necessária a introdução de uma agulha de calibre menor na porção superior do tubo, evitando-se assim o colapso do mesmo.

A remoção do EtBr foi realizada por lavagens sucessivas com butanol saturado com NaCl 1 M (1:1). Foi adicionado 1 V de butanol saturado à solução contendo o DNA em microtubo de 1,5 mL (Eppendorf, modelo 5402). As fases orgânica e aquosa foram misturadas por inversão e centrifugadas a 200 x *g* por 3 min. à temperatura ambiente. A fase orgânica (superior) foi retirada e ao tubo foi acrescentado o mesmo volume de butanol. Este procedimento foi repetido de 3 até 8 vezes, até que a fase orgânica estivesse completamente limpa. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e foram adicionados 3 V de TE (para diluição do CsCl). Os plasmídeos foram precipitados com 2 V de EtOH absoluto gelado por 2 h a -20°C ou durante a noite. Após centrifugação, a 17.400 x *g* por 25 min., o precipitado foi lavado com EtOH 70% gelado. O DNA plasmidial foi re-suspendido em 50 a 150 µL de TE e quantificado em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 11®) a 260 nm.

etídeo (EtBr) à solução de CsCl. O EtBr é um análogo de base que se intercala à fita dupla de DNA e emite fluorescência quando excitado com luz ultravioleta (UV). O EtBr promove redução na motilidade do DNA de forma linear e circular relaxada, uma vez que, a essas formas, um número maior de moléculas de EtBr pode se ligar, quando comparada a mesma molécula na forma circular superenovelada. Dessa maneira, a ligação promove aumento no tamanho e na rigidez dessas formas II e III. A presença do EtBr intercalado as diferentes formas de DNA é utilizada para distinguir o DNA circular superenovelado dos demais topoisômeros. Assim, é possível a separação e posterior visualização de duas bandas: uma referente ao DNA plasmidial mais denso (banda inferior) e outra referente ao DNA cromossomal de menor densidade (banda superior).

A metodologia original de purificação de plasmídeos em gradiente de CsCl tem sido utilizada para diferentes organismos. Diversos autores fizeram ajustes para obtenção de plasmídeos extraídos de cepas de *Escherichia coli* (GARGER et al., 1983; AGUILAR-CORDOVA & FONTES, 1990; KHAN et al., 2000). SLACK & LAWRENCE (2002) ajustaram a técnica para obtenção de plasmídeos de *E. coli*, com alta pureza, para expressão em baculovírus. WELTER et al. (1998) purificaram DNA mitocondrial usando o gradiente de CsCl.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi adaptar um protocolo para purificação de DNA plasmidial de *B. thuringiensis* de modo a otimizar algumas etapas em relação ao protocolo original proposto por SAMBROOK et al. (1989), e torná-lo mais rápido e menos trabalhoso.

Material e Métodos

Estirpes utilizadas neste trabalho

Foram utilizadas como modelo as estirpes HD-1 e S76. A primeira é conhecida como padrão comercial para insetos lepidópteros, enquanto que a S76 foi isolada na cidade de Padre Bernardo – GO,

depositada no Banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e selecionada pela elevada atividade larvicida para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (GITAHY, 2000).

Condições de crescimento e extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina. Duas culturas de cada estirpe, S76 e HD-1, de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foram crescidas em 200 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion - Becton, Dickinson and Company®, USA, cat. # 237500,) em “erlenmeyers” com capacidade para 2 L, até D.O_{600nm} entre 1,5 e 2,0, a 28°C, sob agitação de 200 rpm. As células foram centrifugadas a 7.740 x g (Rotor Beckman J-21C) por 10 min. a 4°C, e cada precipitado re-suspendido em 10 mL da solução de TES (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 5 mM; sacarose 20%) contendo 15 mg/mL de lisozima (preparada na hora do uso) e incubado a 37°C por 1h a 1h30 para a obtenção de 10 a 50% protoplastos (quantidade suficiente para um bom rendimento). A formação dessas estruturas foram monitoradas por microscopia óptica. As duas amostras de cada estirpe foram reunidas em um mesmo tubo e a esse, adicionados 40 mL de NaOH 0,2 M / SDS 0,1% (preparada na hora, tendo cuidado para não precipitar o SDS e evitar a formação de espuma). A amostra foi agitada gentilmente e mantida à temperatura ambiente por 5 min. (nesse momento observa-se que a amostra toma a consistência de clara de ovo). Foram adicionados 20 mL de acetato de potássio 5 M, pH 5,5. A amostra foi homogeneizada gentilmente e mantida no gelo por 15 min. (nesse momento há formação de flóculos de cor esbranquiçada). Após centrifugação a 7.740 x g por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi filtrado para eliminar os flocos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,6 V (volumes) de isopropanol, sendo a mistura incubada por 1 h a -20°C, ou por 20 min. a -70°C, e centrifugado a 7.740 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente até completa evaporação do isopropanol. O precipitado foi re-suspendido em 4,3 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) (protocolo adaptado de BIRNBOIN & DOLY, 1979).

Preparo do DNA Plasmidial e Ultracentrifugação em Gradiente de CsCl

Após a completa dissolução do precipitado contendo o DNA, foi adicionado 1,1 g de CsCl. Essa solução foi incubada a 37°C para facilitar a dissolução. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de EtBr 10 mg/mL, para obter uma concentração final de 555 µg/mL. A densidade dessa solução deve estar entre 1,555 e 1,70 g/mL ou índice de refração entre 1,386 e 1,393. Com auxílio de agulha 18G (não utilizar agulha com o calibre menor porque provoca quebra mecânica dos plasmídeos maiores que 15 kb), a solução contendo o DNA foi transferida para tubo “Polyallomer Quick Seal” 13 x 51 mm (catálogo # 342412, Beckman), com cuidado para não formar bolhas. Esses tubos foram fechados com seladora (Tube Tooper®) (Figura 1) e as amostras resolvidas em ultracentrifuga (L8-80M Beckman), rotor VTi 65.2, a 416.000 x g por 4 h, aceleração 3 e desaceleração 1, temperatura entre 16-20°C. Em seguida, os tubos foram retirados do rotor com cuidado para não desfazer o gradiente

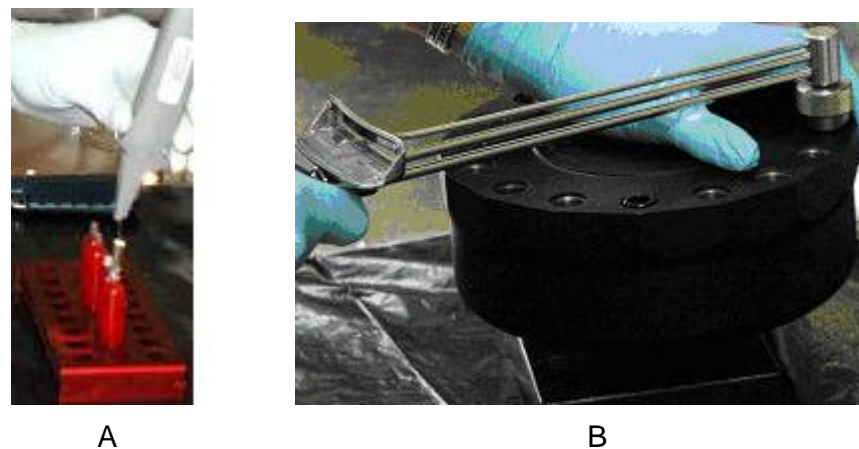


Figura 1: **A)** Tubos Polyallomer Quick Seal (# 342412, Beckman) contendo o DNA extraído por lise alcalina e misturado à solução de CsCl e EtBr. Os tubos foram fechados com seladora (Tube Tooper®, Beckman). **B)** Rotor VTi 65.2 (Beckman) e ferramenta para vedar o rotor (Torque Wrench, 200, Beckman).