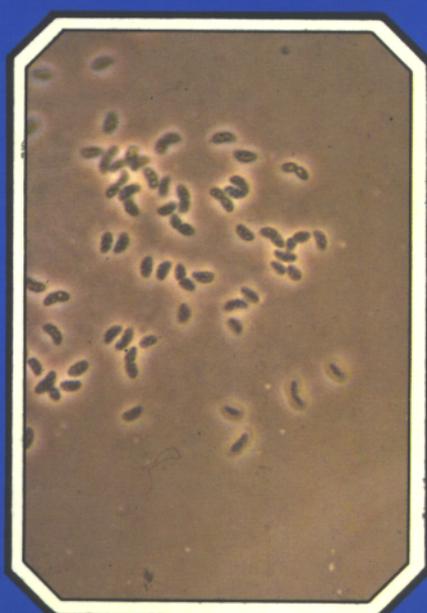
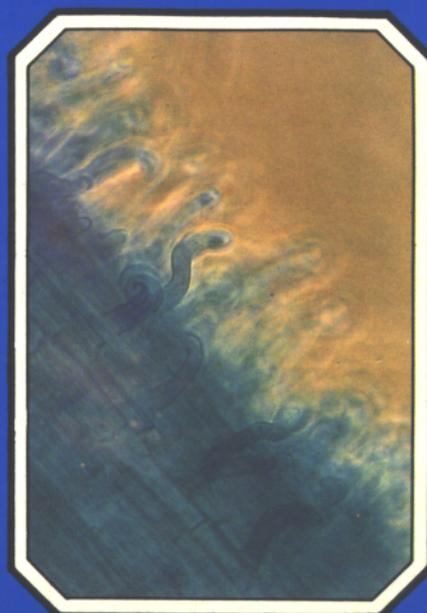
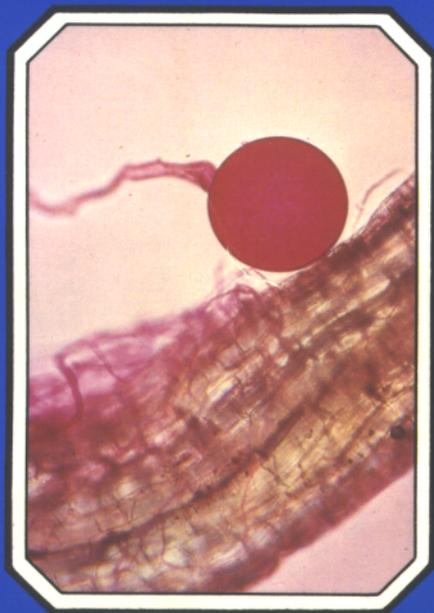


MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



INTRODUÇÃO DE GENES EM *RHIZOBIUM*Leif Skøt¹Ricardo S. Araujo²**10.1. Introdução**

Em termos agrícolas, a simbiose de rizóbio com culturas de leguminosas implica em uma menor necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, mas a simbiose é também interessante em termos de interações entre plantas e microrganismos. A análise dos genes de nodulação dos rizóbios, ao longo dos últimos 10 anos, conduziu à descoberta de diversos sinais moleculares produzidos por ambos os parceiros da simbiose. Flavonóides liberados pelas raízes da planta atuam como sinais na indução dos genes nos rizóbios; esses genes, por sua vez, são responsáveis pela síntese de moléculas de lipo-oligossacarídeos sinalizadores que induzem o encurvamento dos pelos radiculares e a divisão das células do córtex da raiz, dando origem a um meristema nodular (Lerouge et al., 1990). Os lipo-oligossacarídeos também apresentam, em sua composição, decorações químicas que atuam como determinantes de especificidade hospedeira (Fisher & Long, 1992; Spaink, 1992). A regulação dos genes envolvidos com a fixação de nitrogênio também foi investigada (Hennecke, 1990).

Apesar desse sucesso, ainda há muito o que se aprender antes que os conhecimentos resultem em uma performance mais adequada das leguminosas na agricultura. Uma das maiores barreiras para isso é o problema da competição por sítios de nodulação. Em muitas áreas do mundo é difícil se obter uma resposta à inoculação com estirpes melhoradas de *Rhizobium*, porque o solo contém uma grande população naturalizada de rizóbios competitivos (Triplett, 1990), o que faz da genética da competitividade uma área de estudos de grande importância. Uma outra área interessante é a da possibilidade de se utilizarem os rizóbios como fabricantes e excretores de determinados produtos gênicos na rizosfera ou nos nódulos das leguminosas (Mytton & Skøt, 1993). Alguns dos métodos descritos neste capítulo foram empregados em um projeto cujo objetivo era a introdução de genes envolvidos na síntese de toxinas inseticidas, clonados de *Bacillus thuringiensis*, no *Rhizobium* e nos nódulos, para o controle biológico de larvas de determinados insetos que se alimentam de nódulos (Skøt et al., 1990, 1994). Esses métodos, no entanto, prestam-se à manipulação genética dos rizóbios em geral, tendo sido selecionados devido a sua utilidade específica no caso desses organismos. Métodos generalizados de manipulação genética não serão incluídos, por haverem sido descritos em diversos manuais de metodologia.

¹Pesquisador, Ph.D., Institute of Grassland and Environment Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Dyfed, SY23 3EB, Wales, UK.

²Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

10.2. Meios de Cultura

Existe um grande número de meios de cultura complexos ou definidos (mínimos) desenvolvidos e empregados ao longo dos anos. O meio de cultura mais utilizado universalmente é, provavelmente, o Extrato de Levedura (“Yeast Extract”)-manitol (YM), um meio de simples preparo que promove crescimento rápido. Além disso, a viabilidade dos rizóbios no meio YM, após armazenamento a 4° C, é melhor que nos outros meios. A maior desvantagem desse meio é que as bactérias produzem quantidades copiosas de polissacarídeos de alta viscosidade, dificultando a obtenção de “pellets” firmes após centrifugação. O meio Triptona-Extrato de Levedura (TY) ou o Peptona (PA) são meios alternativos nos quais os rizóbios produzem menos polissacarídeos. Os rizóbios podem, ainda, apresentar taxas de crescimento mais lentas em meio PA, o que às vezes é vantajoso.

Meios complexos (quantidades para 1 litro de meio de cultura)

a) Extrato de levedura-manitol: EM ou YM (Vincent, 1970) (ver capítulo 2)

b) Triptona-extrato de levedura: TY (Beringer, 1974)

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
CaCl ₂ · 6 H ₂ O ou (2 H ₂ O)	1,3 g (0,87 g)
Ajustar o pH para 6,8-7,0.	

c) Meio de peptona: PA (Hirsch et al., 1980)

Peptona	4,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Ajustar o pH para 6,8-7,0.	

d) Meio Luria-Bertani: LB (Maniatis et al., 1989) - para *Escherichia coli*

Tryptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	3,0 g
Ajustar o pH para 7,5.	

Meios de cultura definidos (quantidades para 1 litro)a) Meio de sais com MOPS: MS (Jordan, 1984)

Macronutriente	Quantidade (g)	Conc. Estoque
MOPS	8,37	10X
KOH	1,12	
NH ₄ Cl	1,07	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,98	100X
K ₂ HPO ₄	0,21	100X
KH ₂ PO ₄	0,05	100X

Preparar uma solução estoque com MOPS e KOH juntos, e esterilizá-la por filtração; preparar, em separado, soluções estoque dos outros sais. Para o preparo do meio, observar a diluição necessária das soluções estoque. Por exemplo: se o estoque for 10X, empregar 100 mL por litro de meio de cultura.

Fonte de carbono: succinato de sódio, 2,43 g.

Micronutriente (estoque 100X)	Quantidade (mg)
NaCl	5,0
H ₃ BO ₃	1,0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,5
MnSO ₄ · H ₂ O	0,5
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	1,0

Preparar a solução estoque conforme composição acima. Esta solução estoque é concentrada 100X; utilizar 10 mL por litro de meio de cultura.

Outros ingredientes:

CaCO ₃	20,0 g	
EDTA	10,0 g	1000X
Fe NaEDTA	2,0 g	

CaCO₃ e NaFeEDTA devem ser adicionados diretamente ao meio de cultura; preparar solução estoque (1000X) de EDTA (observar condições de pH para dissolver) e empregar 1 mL por litro de meio de cultura.

Vitaminas	µg/L	1000X
Biotina	75	
Ácido pantotênico	75	
Tiamina	75	

Preparar a solução de vitaminas e esterilizar, por filtração, em membrana de 0,22 µm; empregar 1 mL por litro de meio de cultura esterilizado.

Preparar o meio sem adicionar o MOPS e o KOH e autoclavar. Adicionar a quantidade apropriada da solução de MOPS-KOH filtrada ao meio após autoclavagem. Adicionar as vitaminas ao meio somente após autoclavagem. NÃO AUTOCLAVAR AS SOLUÇÕES ESTOQUE, E ARMAZENÁ-LAS A 4° C. Após a adição da solução de MOPS-KOH o pH do meio deverá estar em torno de 7,2.

b) Meio BSM (Bergersen, 1961) - quantidades para 1 litro

Manitol	10 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,45 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Solução de ferro do meio YM	1 mL
Ácido glutâmico	1,1 g
Solução de tiamina	1 mL
Solução de biotina	1 mL

As soluções de vitaminas (tiamina e biotina) são feitas, separadamente, à concentração de 1 mg/mL, dissolvidas em água, e filtradas em filtro miliporo; só devem ser misturadas ao meio de cultura quando este estiver frio o suficiente para receber antibióticos (45° C a 55° C). É EXTREMAMENTE IMPORTANTE AJUSTAR O pH DESTE MEIO PARA 7,0, OU NÃO HAVERÁ SOLIDIFICAÇÃO PORQUE O ÁGAR É HIDROLISADO PELA ACIDEZ.

c) Meio Y (Diebold & Noel, 1989) - quantidades para 1 litro

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
K ₂ HPO ₄	0,22 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04 g
Glutamato de sódio	1,00 g
Succinato de sódio	1,00 g
Solução de vitaminas	10 mL
Ajustar o pH para 7,0	

A solução de vitaminas é preparada com 100 mg/L de cada uma das vitaminas (biotina, tiamina e pantotenato de cálcio) e filtrada em filtro miliporo antes de incorporá-la ao meio de cultura.

10.3. Plasmídeos

Os rizóbios normalmente contêm alguns plasmídeos cujos tamanhos variam entre 100 e 500 kilobases (kb). A maior quantidade de plasmídeos é encontrada em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* e *phaseoli*. No *R. meliloti* normalmente se encontram dois plasmídeos muito grandes, o maior deles contendo cerca de 1.500 kb. Os genes envolvidos na nodulação (*nod*) e fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) estão localizados em um desses plasmídeos (denominado plasmídeo simbiótico - pSym). O *R. loti* contém um plasmídeo grande mas, ao contrário das espécies mencionadas acima, esse plasmídeo não carrega os genes *nod*, *nif* e *fix*. O *Bradyrhizobium*, de crescimento lento, não parece conter nenhum grande plasmídeo. A presença, em plasmídeos, de genes relevantes para a simbiose, em diversas espécies de *Rhizobium*, em sua forma natural, provocou um grande interesse pela identificação e análise desse material genético. A seguir, serão descritos alguns métodos para a visualização e análise de DNA de plasmídeos dos rizóbios. O primeiro é bastante rápido, mas gentil o suficiente para permitir, inclusive a visualização dos maiores plasmídeos encontrados em *Rhizobium*. O método é baseado no procedimento originalmente descrito por Eckhardt (1978), com modificações introduzidas por P. Hirsch (comunicação pessoal) para adequá-lo à eletroforese em géis horizontais de agarose.

10.3.1. Géis “Rápidos” para Visualização de Plasmídeos em *Rhizobium*

10.3.1.1. Meios, tampões e soluções

1. Meio PA (ver composição seção 10.2, item c).

2. 10X TBE - Tampão para eletroforese:

108 g Tris-base;

55 g ácido bórico;

9,3 g EDTA (sal dissódico);

água destilada suficiente para 1 L;

pH 8,3 é automático.

3. Tampão Tris-sacarose para ressuspender células.

Dissolver 25% (p/v) de sacarose em uma solução 25 mM de TrisCl, pH 8,0. O estoque de Tris deve ser preparado com a concentração de 1 M e o pH ajustado para 8,0 com HCl. Os tampões contendo Tris devem ser autoclavados. Dividir a solução de Tris-sacarose em pequenas alíquotas para armazenagem.

4. Solução estoque de lisozima.

Utilizar lisozima do tipo SIGMA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), referência L-6876 cristalizada.

Preparar uma solução estoque na concentração de 20 mg/mL em água destilada esterilizada e dividir em alíquotas de 50 µL para armazenagem a -20° C. Cada alíquota só deve ser descongelada uma ÚNICA vez para utilização.

5. Solução estoque de ribonuclease (RNase).

Utilizar ribonuclease A do tipo SIGMA, referência R-5503, com 50 a 75 U/mg de proteína. Preparar a solução na concentração de 400 µg/mL em tampão de RNase (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl). Ferver por 15 min e deixar resfriar à temperatura ambiente; este tratamento inativa as DNases. Dividir em alíquotas de 50 µL e armazenar a -20° C.

6. Tampão de ressuspensão (preparar imediatamente antes do uso):

1 mL de estoque Tris-sacarose

50 µL de estoque de lisozima

50 µL de estoque de RNase.

7. Brometo de etídio

Preparar uma solução estoque na concentração de 10 mg/mL em água destilada, e armazenar no escuro. CUIDADO, este reagente é cancerígeno e mutagênico.

8. Corante

30% de glicerol

50 mM Na₂EDTA pH 8,0

0,25% (p/v) azul de bromofenol

0,25% (p/v) cianol de xileno

Armazenar a 4° C.

9. Agarose

Preparar a agarose dissolvendo-a na concentração de 0,7% em TBE 1X (partindo do estoque 10X, fazer uma diluição em água destilada). A quantidade de agarose a ser preparada vai depender do tamanho da caixa de gel. Por exemplo, uma caixa de 15 cm x 15 cm consome cerca de 150 mL de agarose. Dissolva a agarose através de fervura ao fogo ou no forno de microondas.

10. SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-agarose

Preparar uma solução de agarose a 0,4% com SDS em TBE 1X. A forma mais fácil de preparar esta solução é tomando-se 2 mL da solução de agarose a 0,7% (depois de derretida) e adicionando-se 1,15 mL de TBE 1X, 0,35 mL de uma solução de SDS a 10% (p/v) e 100 µL de corante. Manter a solução derretida a 65° C até o momento de empregar.

10.3.1.2. Preparação do *Rhizobium*

1. Multiplicar as culturas de *Rhizobium* em 5 mL de meio PA, com aeração, a 28° C, até a metade da fase logarítmica de crescimento (a concentração desejada é cerca de 10⁷ céls./mL); normalmente são necessárias 14 a 16 horas de crescimento.

2. Transferir 0,5 mL a 1,0 mL (dependendo da densidade óptica da cultura) para um tubo de microcentrífuga e centrifugue à velocidade máxima por 30 segundos. Descartar o sobrenadante.

3. Ressuspender as células em 30 µL de tampão de ressuspensão e transferir para o gel.

10.3.1.3. Preparação do Gel

1. Limpar a bandeja com etanol e selar as extremidades com fita adesiva (tipo fita-crepe).
2. Limpar o pente e o formador de sulcos com etanol, e monte o conjunto. Transfira o conjunto para a bandeja, certificando-se que há um espaço de 0,5 a 1,0 mm entre o pente e a bandeja.
3. Despejar a solução de agarose a 0,7% e deixar solidificar. Remover o formador de sulcos e preencher o sulco resultante, atrás das cavidades, com a solução de agarose a 0,4% + 1% SDS, deixando solidificar. Remover o pente formador das cavidades e a fita de vedação.
4. Transferir o gel para a caixa de eletroforese. Encher a caixa com tampão para eletroforese (TBE 1X) até que o gel esteja coberto por cerca de 1 mm de tampão. Aplicar as bactérias ressuspendidas às cavidades do gel e deixá-lo correr sob 75 a 100 V (75 a 100 mA) até que a linha do indicador azul de bromofenol tenha saído do gel, cerca de quatro a cinco horas. O indicador cianol de xileno indica a posição aproximada de fragmentos lineares de DNA cromossômico. Levar o gel para colorir com solução contendo 0,5 µg/mL de brometo de erídio durante 20 a 40 min. Deixar descolorir em água destilada por 20 min. Examinar o gel sob luz ultravioleta para visualização das bandas correspondentes aos plasmídeos.

DICAS: 1) Quando estiver ressuspendendo culturas de bactérias através de pipetagens, ser gentil para evitar a quebra de plasmídeos grandes e frágeis. 2) Certificar-se de usar tampão TBE a 1X; Maniatis et al. (1989) defendem o uso de TBE a 0,5X para eletroforese em géis de agarose, o que é bom para a maioria dos casos, mas não serve para os géis de plasmídeos.

10.3.1.4. Isolamento de Plasmídeos de *Rhizobium*

O método descrito acima só é útil para a visualização dos plasmídeos nos rizóbios. Já os seguintes permitem o isolamento de DNA plasmidial em quantidade suficiente para manipulações futuras (ex.: clonagem de fragmentos). Todavia, o manuseio e as etapas envolvidas normalmente permitem que sejam isolados intactos apenas os menores plasmídeos e alguns cosmídeos.

Método Nº 1

1. Crescer as culturas em 200 mL de meio PA por 2 a 3 dias a 28° C, com aeração, até a metade da fase logarítmica de crescimento.
2. Colher as células por centrifugação a 8000 rpm durante 15 min. Lavar o pélete com T₅₀E₂₀ (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 20 mM Na₂EDTA). Ressuspender o pélete em 16 mL de T₅₀E₂₀ em um béquer pequeno.
3. Adicionar 2 mL de pronase B (5 mg/mL em T₅₀E₂₀, pré-digerida por 1 hora a 37° C) e 2 mL de SDS (10% p/v em T₅₀E₂₀). Tampar.

4. Incubar, a 37° C, durante 1 hora, ou até que haja clarificação da suspensão (indica que houve quebra das células), agitando, gentilmente de vez em quando. A solução se tornará muito viscosa.

5. Elevar o pH para 12,4 com solução 3 M de NaOH (são necessários cerca de 0,5 mL), agitando de um modo gentil, mas completamente, com um bastão de plástico ou pipeta, até que a leitura no potenciômetro se estabilize. Deixar descansar por 20 minutos à temperatura ambiente.

6. Ajustar o pH para 8,5 utilizando solução 2 M de Tris-HCl, com pH 7,0 (são necessários cerca de 2 mL).

7. Decantar para um tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL. Adicionar solução gelada de NaCl a 5 M de forma a obter concentração final de 1 M (ou seja, são necessários cerca de 5,5 mL para 20 mL de mistura de células rompidas). Misturar, por meio de inversões dos tubos e deixar repousar, em gelo, por quatro horas.

8. Centrifugar o preparado de células lisadas (os sedimentos de NaCl/SDS), centrifugando a 15000 rpm por 20 minutos, com a centrífuga a 4° C. Decantar o sobrenadante para um tubo limpo (repita a operação se ainda houver resíduos de SDS/NaCl).

9. Adicionar 50% p/v de PEG (polietileno glicol, peso molecular 8000) para uma concentração final de 10%. Misture invertendo os tubos e guardar no gelo até o dia seguinte.

10. Sedimentar a mistura de PEG e DNA por centrifugação a 7000 rpm, por cerca de 15 min a 4° C. Descartar o sobrenadante e secar os tubos completamente. Adicionar cerca de 0,5 mL de T₅₀E₂₀ ao pélete e deixe no gelo para redissolver. A dissolução pode ser acelerada girando-se os tubos gentilmente.

11. Transferir a solução de DNA para um tubo de microcentrifuga por meio de uma pipeta de 5 mL invertida ou através da ponta cortada de um bico plástico para pipetador automático de 1 mL.

12. Transferir uma amostra (30 µL de DNA + 6 µL de solução de azul bromofenol 6x: 0,25% azul de bromofenol em 40% p/v sacarose em água destilada esterilizada) para um gel com 0,7% de agarose para correr. Este procedimento visa confirmar a presença de DNA plasmidial na preparação.

Método N° 2 (Holmes & Quigley, 1981)

1. Partindo de culturas frescas, inocular meio de cultura TY líquido (3 mL a 5 mL) adicionado de antibióticos (5 µg/mL), quando possível e/ou necessário para manter a pressão seletiva para os plasmídeos em estudo, e multiplicar as bactérias por 6 a 8 horas (*E. coli*), ou durante a noite (*Rhizobium*).

2. Transferir 1,5 mL da cultura para um tubo de microcentrifuga esterilizado e centrifugar na velocidade máxima por 5-10 segundos se for *E. coli*, ou 2 min se for *Rhizobium*.

3. Se estiver trabalhando com *Rhizobium*, lavar as células uma vez com uma solução de SARKOSYL a 0,1%.

4. Ressuspender o pellet em 350 µL de solução STET (ver a seguir).

5. Adicionar 5 µL de uma solução de lisozima a 50 mg/mL, preparada em tampão TE (10 mM TrisCl e 1 mM EDTA) com pH 8,0 no caso *E. coli*, e 10 µL, para *Rhizobium*.
6. Misturar invertendo o tubo, NÃO USAR O VÓRTEX.
7. Incubar à temperatura ambiente por 2-5 min no caso de *E. coli*, e 15 min para *Rhizobium*.
8. Transferir os tubos para banho-maria a 90°-99°C (assim que parar de ferver) e deixá-los ali por 45 segundos se estiver extraíndo cosmídeos, ou 90 segundos no caso de estar extraíndo plasmídeos menores.
9. Centrifugar na velocidade máxima por 10-15 min à temperatura ambiente.
10. Retirar, com um palito esterilizado, e jogar fora o pélete branco e viscoso que se formará no fundo do tubo.
11. Adicionar 40 µL de uma solução 3 M de acetato de sódio, e 400 µL de isopropanol à temperatura ambiente.
12. Misturar por inversão do tubo e incubar em gelo por cerca de 3 min.
13. Centrifugar na velocidade máxima por 5 min e descartar o sobrenadante.
14. Lavar o pélete duas vezes com etanol a 70%. Se for usar os plasmídeos para transformação, é recomendável fazer mais uma lavagem com etanol a 70% para remover o excesso de detergente (Triton X-100).
15. Secar o pélete e ressuspender o DNA em 20 µL de tampão TE a pH 8,0, e usar 10 µL numa digestão, ou ressuspender em 100 µl e usar tudo para a transformação.
16. Para ter certeza da completa ressuspensão do DNA, incubar os tubos em um banho-maria a 65° C por 10 min, antes de usar em digestões ou transformações.

Solução STET

- 8% Sacarose
- 5% Triton X-100
- 50 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10.3.2. Plasmídeos de Amplo Espectro para Estudos Genéticos de *Rhizobium*

Desde que Beringer (1974) relatou a transferência do plasmídeo RP4, do grupo de incompatibilidade P, entre duas estirpes de *R. leguminosarum*, houve o desenvolvimento de muitos plasmídeos para a manipulação dos rizóbios. Os plasmídeos mais utilizados para a transferência de DNA nos rizóbios pertencem aos grupos de incompatibilidade P e Q. Seria necessário um texto muito longo para a elaboração de uma lista completa dos plasmídeos empregados em genética molecular dos rizóbios, razão pela qual só serão mencionados, nesta parte, alguns dos mais utilizados. Para maiores detalhes sobre plasmídeos promíscuos em bactérias Gram-negativas, o leitor deve procurar o artigo de Thomas (1989) e, para aqueles específicos para a análise dos rizóbios, o artigo de Martinez et al. (1990).

Um dos vetores de clonagem mais populares na preparação de bibliotecas genômicas em *Rhizobium* é o cosmídeo pLAFR1 (Friedman et al., 1982). Este vetor permite a clonagem de fragmentos de 15 kb a 30 kb, e seu empacotamento em cabeças vazias do fago λ . Infelizmente, esse vetor contém apenas um sítio de restrição com *EcoRI* para a clonagem. Outros derivados com mais sítios de restrição para clonagem foram preparados como, por exemplo, pLAFR3 (Staskawicz et al., 1987) e pCP13 (Darzins & Chackrabarty, 1984). Outros plasmídeos de uso generalizado com aplicações diversas são o pKT230 (Bagdasarian et al., 1981), o pSUP104 (Priefer et al., 1985) e o pLA2917 (Allen & Hanson, 1985), utilizados com sucesso para a construção de bibliotecas genômicas de *R. etli* (Araujo, 1993), *R. l. bv. phaseoli* (Beattie, 1991) e *R. tropici* (Milner et al., 1992). Os fragmentos clonados normalmente inativam um gene para resistência a antibióticos por sua inserção nesses vetores. Recentemente, foram desenvolvidos diversos plasmídeos destinados à análise da atividade de promotores em *Rhizobium*. A maioria desses plasmídeos são modificações de plasmídeos dos grupos de incompatibilidade P e Q, contendo a seqüência que codifica para a produção de β -galactosidase (*lacZ*) e sítios únicos de restrição em seu terminal 5', que permitem a inserção de DNA dos rizóbios em estudo (Spaink et al., 1987; Labes et al., 1990). Foram, também, construídos vários vetores de expressão gênica com amplo espectro de hospedeiros. Estes são derivados de pSUP104 e contêm promotores, como por exemplo o do gene para resistência à kanamicina, imediatamente acima (“upstream”) de um sítio de clonagem múltipla, no qual se pode clonar a seqüência gênica de interesse (Labes et al., 1990).

Plasmídeos que podem ser transferidos, mas não podem ser mantidos nos rizóbios são extremamente úteis para a inserção de transposons como o Tn5. Esses plasmídeos têm uma estreita gama de hospedeiros, mas contêm genes de mobilização provenientes de um plasmídeo com muitos hospedeiros. Podem-se transferir esses plasmídeos através de conjugações em que a estirpe doadora (normalmente *Escherichia coli*) contém os genes de transferência (*tra*) *in trans* (contido em uma molécula de DNA diferente daquela que contém o gene de interesse ou o transposon). Quando transferido para o rizóbio, o transposon se solta do plasmídeo com uma certa freqüência e se insere, ao acaso, no genoma, enquanto o plasmídeo é perdido, por incompatibilidade, da população de rizóbios. Se o transposon se inserir em um gene ativo, ele causará sua inativação. Esta propriedade transformou os transposons em armas poderosas para a execução de mutagênese, ao acaso, de genes rizobianos (Martinez et al., 1990). A primeira transferência do Tn5 para o rizóbio foi relatada por Beringer et al. (1978) mas, hoje, existem vetores mais confiáveis para essa finalidade, como pSUP101 e pSUP102 (Simon et al., 1986).

A região central da molécula do Tn5 não é essencial para a transposição ou inserção. Por isso, esse transposon tem servido como veículo para a inserção de seqüências gênicas úteis como genes marcadores (Simon et al., 1986; Cresswell et al., 1994) ou genes de mobilização (Simon, 1984). O último caso é particularmente útil porque os plasmídeos nativos dos rizóbios (que normalmente não são transmissíveis), contendo a seqüência Tn5-Mob, podem ser mobilizados e transferidos para outras

estirpes, desde que os genes de transferência estejam presentes *in trans* no doador, o que pode ser obtido mais facilmente, com a introdução do plasmídeo auxiliar com ampla gama de hospedeiros, RP4-4, na estirpe doadora (Simon, 1984).

Um outro derivado do transposon Tn5, contendo as genes *sacR* e *sacB* de *Bacillus subtilis*, tem sido muito útil na seleção de rizóbios que sofreram a cura de um de seus plasmídeos nativos. Este derivado foi desenvolvido por Hynes et al. (1989, 1990) e se beneficia do fato que os genes *sacR* e *sacB* tornam as bactérias Gram-negativas, que os carregam, incapazes de metabolizar a sacarose como fonte de carbono. Uma estirpe de *Rhizobium* marcada com Tn5-Sac em um de seus plasmídeos é exposta a um meio contendo uma alta concentração de sacarose. As colônias que crescerem nesse meio são então analisadas quanto à perda do plasmídeo marcado com o Tn5-Sac.

Finalmente, o transposon Tn5 também tem sido utilizado para a introdução de genes úteis, de outros organismos, nos rizóbios (e em outras bactérias Gram-negativas). Exemplos desses genes incluem a α -toxina de *Bacillus thuringiensis*, com propriedades inseticidas, para o controle biológico de insetos que se alimentam especificamente de nódulos radiculares (Skøt et al., 1990, 1994). O Tn5 inserido no genoma do *Rhizobium* é mantido de forma mais estável que um plasmídeo com ampla gama de hospedeiros. Os plasmídeos são perdidos com muita facilidade de seus hospedeiros se não houver pressão seletiva constante para sua presença (Triplett & Sadowsky, 1992; Skøt et al., 1994).

10.3.3. Transferência de Genes para o *Rhizobium*

Ao contrário do que acontece para *Escherichia coli*, não existem métodos eficientes para a transformação genética de *Rhizobium*. A clonagem e a manipulação do DNA são realizadas em *E. coli* como hospedeiro e os plasmídeos são, subseqüentemente, transferidos para os rizóbios por conjugação. Entretanto, muitos plasmídeos com ampla gama de hospedeiros só podem ser mobilizados se houver genes de transferência *in trans*. Existem duas maneiras de se atingir esse objetivo: 1) Através de cruzamentos triparentais que incluem a estirpe doadora e uma outra estirpe auxiliar (*tra*⁺) de *E. coli*. Um plasmídeo auxiliar bastante utilizado é pRK2013 (Ditta et al., 1980); 2) Através de cruzamentos biparentais quando a estirpe doadora de *E. coli* carrega os genes de transferência em seu genoma. A estirpe S17-1 tem todo o plasmídeo RP4 incorporado ao seu cromossomo (Simon et al., 1983), sendo a doadora preferencial de plasmídeos não transmissíveis, de ampla gama de hospedeiros, para o *Rhizobium*. A seguir, serão descritos dois métodos para a realização de cruzamentos bi ou triparentais em *Rhizobium*, através de conjugação.

Método N° 1

Dia 1

Inocular um tubo com meio TY sólido inclinado com a cultura de *Rhizobium* apropriada e deixar crescer a 28° C (culturas de *Bradyrhizobium* devem ser iniciadas de 4 a 6 dias antes da conjugação).

Dia 2

Inocular um frasco contendo 5 mL de meio LB líquido (adicionado dos antibióticos apropriados) com a estirpe doadora de *E. coli*, e incubar por uma noite a 37° C com aeração vigorosa (200 rpm).

Dia 3

1. Transferir 1 mL da cultura de *E. coli* para um tubo para microcentrifuga esterilizado e centrifugar por 1 min. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 200 µL de solução de NaCl a 0,8%. Não usar agitador do tipo “vórtex”, apenas tocar os tubos com os dedos para ajudar a ressuspensão.

2. Colher as células de *Rhizobium* dos tubos inclinados suspendendo-as em 3 mL de água destilada esterilizada.

3. Misturar 100 µL da suspensão de células de *Rhizobium* com 100 µL da suspensão de células de *E. coli* em um tubo para microcentrifuga esterilizado. Com uma pipeta transferir a mistura para um filtro de nitrocelulose de 25 mm de diâmetro colocado sobre uma placa de Petri contendo meio TY sólido, sem antibióticos. Deixar a placa, sem a tampa, em uma câmara de fluxo laminar até que o líquido na superfície do filtro seque (cerca de 15 a 30 min). Repor a tampa na placa e incubar por 24 horas a 28° C. Alternativamente, a mistura de células pode ser forçada sobre o filtro de nitrocelulose com a ajuda de uma seringa; neste caso, a membrana é retirada do suporte com uma pinça e transferida para uma placa com TY sólido para incubação.

Dia 4

1. Transferir com uma pinça de pontas chatas o filtro de nitrocelulose contendo as células para um frasco esterilizado contendo 3 mL de água destilada esterilizada, e agitar vigorosamente em agitador tipo “vórtex” para ressuspendê-las completamente.

2. Fazer diluições apropriadas (ex.: 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶) em água destilada esterilizada. Espalhar 100 µL da diluição 10⁻⁶ em uma placa de TY ou MS contendo apenas o antibiótico para a checagem da estirpe doadora de *E. coli*. O número de colônias que aparecerem nessa placa indica a concentração de células recipientes de *Rhizobium* na mistura. Espalhar 100 µL de uma ou mais das outras diluições, dependendo da frequência esperada para a transferência do plasmídeo, em placas com TY ou MS, contendo antibiótico para a checagem de *E. coli* e, também, o antibiótico para a seleção positiva do plasmídeo em questão. Deixar incubando a 28° C até que apareçam colônias.

3. Após o aparecimento de colônias nessas placas, elas devem ser purificadas em meio seletivo repetidamente para remover células de *E. coli* que tenham permanecido na mistura.

Comentários: no caso de cruzamentos triparentais, misturar 75 µL de cada uma das três estirpes de bactérias antes de aplicar a mistura sobre os filtros de nitrocelulose. Se não houver disponibilidade de filtros de nitrocelulose, a mistura pode ser aplicada diretamente sobre a superfície do meio, tornando-se ligeiramente mais difícil a recuperação quantitativa das células (este problema pode ser

contornado aumentando-se o número de cruzamentos nos casos em que se deseja obter um número elevado de transconjugantes). O plaqueamento em meio definido, como por exemplo o MS, auxilia na contraseleção das estirpes de *E. coli* empregadas como doadoras, já que a maioria dessas estirpes é portadora de mutações que as tornam auxotróficas, isto é, incapazes de crescer em meio de cultura definido. Nos casos de conjugações entre duas estirpes de *Rhizobium*, ambas são crescidas em meio TY.

Método Nº 2 (Selvaraj & Iyer, 1983)

1. Repicar as estirpes a serem utilizadas para placas seletivas (contendo antibióticos aos quais as estirpes sejam resistentes; se não houver resistência a antibióticos, usar meio sem seleção). *Rhizobium* é multiplicado em meio de cultura YM, e *E. coli* em LB com pH 7,5, ambos em placas. É importante lembrar que *E. coli* cresce durante uma noite a 37° C, e portanto deve ser retirada da incubadora e armazenada em geladeira até que o *Rhizobium* multiplique-se.

2. Repicar as estirpes das placas acima para placas de meio de cultura rico, porém com pouco carbono. A conjugação é mais efetiva quando as bactérias são multiplicadas em meio rico, pois o baixo teor de carbono reduz a produção de exopolissacarídeos pelo *Rhizobium*. Os rizóbios são repicados para placas de TY, e *E. coli* para placas de LB; se houver marcas de resistência a antibióticos, elas devem ser usadas nesta etapa. Crescer o *Rhizobium* a 28° C por 48 a 72 horas, e *E. coli* a 37° C por 24 horas. A maneira mais fácil de se proceder é repicar o *Rhizobium* em um dia, e *E. coli* um ou dois dias depois. NÃO USAR CULTURAS VELHAS.

3. Após crescimento, ressuspender, separadamente, mais ou menos 1/4 de uma alça de platina de cada estirpe em 3 mL a 5 mL de água destilada esterilizada, em tubos de ensaio esterilizados. Ajustar a densidade óptica das suspensões para 0,1 (absorbância a 600 nm) com água esterilizada.

4. Misturar 1 mL de cada suspensão (recipiente + doador no caso de conjugação biparental, ou recipiente + doador + assistente, no caso de conjugação triparental) com densidade óptica de 0,1 em um tubo de ensaio esterilizado e agitar levemente. A mistura pode, então, ser forçada através de um filtro de nitrocelulose esterilizado com uma seringa esteril. Este método propicia melhor aproveitamento das suspensões em conjugação, mas diminui o número de eventos considerados independentes. A membrana é, então, colocada, com a face contendo as bactérias voltada para cima sobre uma placa de meio de cultura TY sem antibióticos, e incubada por 24 horas a 28° C.

Alternativamente, podem-se pingar, com pipetador, gotas de 10 a 20 µL sobre placas de meio de cultura TY sem antibióticos. Cada gota é considerada um cruzamento independente e cada placa pode receber até 10 gotas. As placas são, então, incubadas a 28° C por 24 horas.

5. Após a incubação, transferir cada membrana filtrante ou cada grupo de 5 a 10 gotas depositadas na superfície da placa para um tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada esterilizada. Agitar o tubo vigorosamente. Espalhar alíquotas de 100 µL na superfície das placas seletivas. Pode ser necessário fazer uma ou duas diluições decimais para obter maior quantidade de colônias

transconjugantes isoladas. A maior parte das estirpes de *E. coli* usadas em procedimentos genéticos é auxotrófica para certos nutrientes e sua checagem é facilmente efetuada por se usar meio de cultura mínimo (ex.: BSM) para o espalhe das células mutagenizadas. Incubar as placas a 28° C por tempo necessário para multiplicação do rizóbio.

6. Fazer diluições decimais das suspensões obtidas dos filtros ou gotas, após a conjugação, para que se possa estimar o número de células recipientes e calcular as freqüências. O cálculo da freqüência de ocorrência das mutações é um dado fundamental em trabalhos de genética microbiana.

7. Confirmar as marcas de resistência a antibióticos e a pureza dos transconjugantes selecionados para trabalhos futuros. Fazer estoques dos transconjugantes de interesse adicionando 15% de glicerol esterilizado para proteção das bactérias, e manter os estoques no congelador a -20° C.

10.4. Extração de DNA de *Rhizobium*

Tendo-se obtido e purificado os transconjugantes putativos de *Rhizobium*, a presença dos genes introduzidos deve ser verificada. Para isso normalmente se emprega a análise de Southern (“Southern blot”), que envolve a hibridização de fragmentos de DNA, após digestão por endonucleases de restrição. O primeiro método de extração descrito a seguir é derivado daquele descrito por Chua et al. (1985). Apesar de ter sido desenvolvido para *Rhizobium*, este método pode ser empregado com sucesso para outras bactérias Gram-negativas, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Acetobacter*. O segundo método foi descrito e desenvolvido por Cook et al. (1989) para *Pseudomonas*, e adapta-se muito bem ao *Rhizobium*.

Método Nº 1

1. Inocular um frasco contendo 5 mL de meio PA líquido com células retiradas de uma placa nova e deixar multiplicar por dois a três dias a 28° C, com aeração vigorosa.

2. Colher as células por centrifugação em um tubo apropriado, esterilizado, a 8000 rpm, a 20° C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 5 mL de T₁₀E₁ (10mM TrisCl pH 8,0; 1 mM Na₂EDTA). Adicionar 17,5 µL de lisozima (30 mg/mL em T₁₀E₁) e deixar incubando a 37° C por 30 min, com agitação.

3. Adicionar 30 µL de proteinase K (20 mg/mL em T₁₀E₁) e 250 µL de sarkosyl (10% em T₁₀E₁), e deixar incubar até o dia seguinte em um banho-maria a 50° C.

4. Transferir 750 µL para um tubo de microcentrifuga, pipetando para dentro e para fora para cortar o DNA.

5. Extrair duas vezes o DNA com uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), e duas vezes com clorofórmio. Para fazer a extração, adicionar ao primeiro tubo (com 750 µL) uma mesma medida de fenol:clorofórmio, agitar no “vórtex” e centrifugar por 5 min. Transferir cuidadosamente (usar ponteiras de pipetadores com as pontas cortadas ou uma pipeta de 5 mL invertida) o sobrenadante para um outro

tubo de microcentrífuga e repetir a operação. TER CUIDADO PARA NÃO TRANSFERIR A INTERFACE, pois ela contém proteínas desnaturadas e lixo celular. Após a segunda extração, transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar um volume igual de clorofórmio. Misturar por inversão (não leve ao “vórtex”) e centrifugue por 5 min. Transferir o sobrenadante para um outro tubo e repita a operação.

6. Após a segunda extração com clorofórmio transferir 500 μL da fase aquosa (superior) para um tubo de microcentrífuga esterilizado e adicionar 50 μL de uma solução 3 M de acetato de sódio e 1 mL de etanol p.a. gelado. Misturar bem (por inversão) e levar à incubação até o dia seguinte a -20°C (o DNA deve precipitar nesta etapa).

7. Centrifugar por 10 min em microcentrífuga e redissolver o pélete, após secagem, em 50 μL de $T_{10}E_1$ (a secagem pode ser realizada em dessecador a vácuo ou em concentradores a vácuo do tipo “Speedvac”). Determinar a concentração de DNA na amostra.

Método N° 2

1. Multiplicar as bactérias em 5 mL de meio de cultura TY ou YM líquido (com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico se houver resistência) até o final da fase logarítmica, ou começo da fase estacionária.

2. Transferir 1,5 mL para um tubo de microcentrífuga esterilizado e centrifugar na velocidade máxima por 2 min.

3. Lavar as células duas vezes com uma solução 1 M de NaCl para remover o excesso de polissacarídeos, e depois lavá-las uma vez com tampão TEN (ver a seguir), para remover o excesso de NaCl.

4. Se for necessário interromper a extração, parar aqui e guardar as células no freezer a -20°C até o momento da extração.

5. Ressuspender o pélete em 400 μL de tampão TEN.

6. Adicionar 13,6 μL de uma solução de sarkosyl a 30%, e 4 μL de uma solução de proteinase-K a 10 mg/mL, em água (a solução de proteinase K deve ser pré-digerida a 37°C por 1 hora).

7. Misturar tudo no vórtex e deixe incubar a 37°C por 1 hora, ou até que haja diminuição da turbidez da suspensão (nem sempre se detecta diminuição da turbidez, mas as células estarão rompidas).

8. Adicionar 400 μL de uma solução 4 M de acetato de amônio e misturar bem, no vortex.

9. Extrair com um volume aproximadamente igual de fenol tamponado (ver a seguir), misturando muito bem, no vórtex.

10. Centrifugar por 3 min na velocidade máxima; o DNA estará na fase superior, aquosa.

11. Transferir cuidadosamente a fase aquosa para outro tubo de microcentrífuga usando ponteiras de pipetas com as pontas cortadas (não se deve forçar o DNA a passar pelo pequeno orifício da ponteira, pois isso pode causar sua fragmentação). Tomar o cuidado de não transferir material da interface. Manter uma idéia do volume transferido.

12. Repetir a extração mais duas vezes, sempre adicionando um volume aproximadamente igual de fenol tamponado, e sempre transferindo a fase aquosa para um novo tubo de microcentrifuga.
13. Após a última extração, adicionar um volume igual de clorofórmio e misturar bem, sem passar no vórtex.
14. Centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto e transferir a fase superior, aquosa, para um novo tubo de microcentrifuga.
15. Adicionar um volume igual de isopropanol e misturar bem, sem passar no vórtex. O DNA vai precipitar agora. Deixar incubando por 10 minutos à temperatura ambiente.
16. Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
17. Ressuspender o pélete em 100-200 μ L de solução 0,1 M de acetato de sódio com pH 6,0.
18. Adicionar 2 volumes de ETANOL ABSOLUTO FRIO para reprecipitar o DNA.
19. Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
20. Deixar o pellet secar para remover o excesso de etanol.
21. Ressuspender o pélete em 50 μ L de tampão TE com pH 8,0. Pode ser necessário deixar o pélete resuspender por 24 horas. Depois disso, guardar o DNA no freezer a -20° C.

Fenol tamponado (também pode ser adquirido pronto)

1. Derreter fenol de alta qualidade a 65° C.
2. Misturar volumes iguais de fenol derretido e uma solução 1 M de TRIS, pH 8,0.
3. Adicionar 8-hydroxiquinolina para a concentração de 0,1%.
4. Decantar a camada de TRIS e repetir a extração mais duas vezes.
5. Extrair com solução 0,1 M de TRIS a pH 8,0, três vezes.
6. Decantar a camada de TRIS e guardar o fenol tamponado em garrafas escuras, recoberto com uma fina camada fresquinha de solução 0,1 M de TRIS a pH 8,0, em geladeira.

Tampão TEN

- 50 mM TRIS, pH 7,5
- 10 mM NaCl
- 10 mM EDTA, pH 8,0

10.5. Detecção de Produtos Gênicos em *Rhizobium*

Os produtos gênicos resultantes da expressão de genes introduzidos no *Rhizobium* são, geralmente, proteínas. Se houver disponibilidade de anticorpos específicos para os produtos gênicos, em sua forma purificada, pode-se empregar análise do tipo “immunoblot” para detectar e quantificar a expressão do produto no *Rhizobium*. Neste tipo de análise as proteínas são separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e fixadas, e as membranas são tratadas com os anticorpos marcados por radioatividade ou por métodos enzimáticos.

Os métodos descritos a seguir foram empregados, com sucesso, na análise da expressão da toxina inseticida de *Bacillus thuringiensis*, transferida para o *Rhizobium* por engenharia genética (Skøt et al., 1990, 1994). Os volumes descritos na preparação dos géis de SDS-poliacrilamida para eletroforese são suficientes para dois minigéis a serem corridos no aparelho “Mini Protean II” da fábrica Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA). Foi empregada a célula “Trans-Blot” da mesma Bio-Rad para a transferência eletroforética das proteínas para as membranas de nitrocelulose. Se forem utilizados outros equipamentos para a realização desta etapa os volumes deverão ser ajustados.

10.5.1. Extração das proteínas do *Rhizobium*

1. Inocular 5 mL de TY líquido com a estirpe apropriada de *Rhizobium*, e deixar multiplicar a 28° C com aeração vigorosa (200 rpm) por 3 dias.

2. Transferir a suspensão para tubos de polipropileno para centrifuga, com capacidade para 10 mL, e centrifugar a 14.000 rpm por 15 min, a 20° C. Ressuspender o pélete em 1 mL de solução de NaCl a 1% (p/v) e transferir para um tubo de microcentrifuga.

3. Colher as células por centrifugação durante cinco minutos na microcentrifuga. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 200 µL de tampão TES/glicerol³. **MANTER OS TUBOS EM GELO A PARTIR DESTA PONTO.**

4. Passar as células por um sonicador, aplicando-se três pulsos de 1 min cada, verificando que os tubos são mantidos frios. Verificar também se a suspensão está clarificando (um sinal de que as células estão sendo rompidas).

5. Precipitar o lixo celular por centrifugação, em microcentrifuga, durante 10 min. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e descartar o pélete, que contém os envelopes celulares e outros materiais insolúveis.

6. Determinar a concentração de proteína no sobrenadante e identificar o tubo corretamente.

7. Transferir 50 µL para um novo tubo para microcentrifuga, com tampa de rosca, adicionar 25 µL de tampão de solubilização (6 M de uréia, 5,76 M de β-mercaptoetanol) e 25 µL de tampão de gel 4X (0,25 M de TrisCl pH 6,8; 8% de SDS; 2 mg/mL azul de bromofenol). Identificar o tubo e lembrar-se de que a concentração de proteína aqui é a metade daquela no tubo com o sobrenadante original.

8. As amostras estão prontas para serem analisadas em gel de poli(acrilamida)/SDS.

Tampões:

1) Tampão de gel 4X (5 mL)

Azul de bromofenol	10 g
1 M TrisCl, pH 6,8	1 mL
10% SDS	4 mL

³ Quando estiver tentando a identificação de produtos gênicos com propriedades inseticidas de *B. thuringiensis* em *Rhizobium*, este tampão deve ser substituído por: 50 mM Na₂CO₃ e 1 µL/mL de β-mercaptoetanol.

2) Tampão TES/Glicerol (100 mL)	
0,25 M TES pH 7,2	25 mL
β -mercaptoetanol	100 μ L
40% Glicerol	3,75 mL
2 M Acetato de Magnésio	0,25 mL
água destilada esterilizada	para 100 mL
3) Tampão de solubilização (10 mL)	
Uréia	3,6 g
β -mercaptoetanol	4 mL
água destilada esterilizada	para 10 mL

10.5.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Análise “Immunoblot” de Proteínas em *Rhizobium*

Tampões e soluções

1. Tampão de corrida
150 mM TrisCl pH 8,9 (8,5 g Trizma)
4 mL 10% SDS
água destilada para 100 mL
2. Tampão de empilhamento
60 mM TrisCl pH 6,7 (7,26 g Trizma)
1 mL 10% SDS
água destilada para 100 mL
3. Tampão de eletrodo
3 g Trizma
20 mL 10% SDS
14,4 g Glicina
água destilada para 1000 mL
4. Tampão de transferência
2,42 g Trizma
11,55 g Glicina
200 mL Metanol
Água destilada para 1000 mL

Dissolver a Trizma e a glicina em aproximadamente 500 mL de água destilada. Elevar o volume a 800 mL e adicionar o metanol depois.

5. Solução salina tamponada (TBS)

10 mM Tris-HCl pH 7,4 (2,42 g Trizma)

140 mM NaCl

água destilada para 2000 mL

Dissolver a Trizma e NaCl em água destilada, ajustar o pH para 7,4 com 1 M HCl e completar o volume para 2000 mL.

6. Estoque de acrilamida a 30% (50 mL)

14,6 g acrilamida

0,4 g N,N metileno bisacrilamida

CUIDADO: a acrilamida não polimerizada é extremamente tóxica; dissolver os reagentes em água, completar o volume para 50 mL e guardar a solução em frasco escuro ou coberto com alumínio, a 4° C. Usar máscaras e luvas ao manusear acrilamida e bis.

7. Persulfato de amônio a 10%

100 mg Persulfato de amônio

1 mL água destilada

Preparar esta solução diariamente.

8. Tampão para fosfatase alcalina

100 mM TrisCl pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

água destilada para 1000 mL

9. Tetrazólio nitroblue (NBT)

Dissolver 250 mg de NBT em 5 mL de 70% dimetilformamida.

Guardar a 4° C.

10. Bromocloroindolilfosfato (BCIP)

Dissolver 250 mg BCIP em 5 mL de 100% dimetilformamida.

Guardar a -20° C.

Método:

1. Montar o aparelho para gel conforme descrito pelo fabricante. As placas de vidro devem estar absolutamente limpas. Limpá-las com água destilada seguida por etanol, e enxugá-las. Não deixar impressões digitais nas placas.

2. Preparar os géis de corrida e de empilhamento de acordo com a Tabela 10.1, mas lembrar-se de que o TEMED e o persulfato de amônio são catalisadores do processo de polimerização, devendo, portanto, ser adicionados quando o gel estiver pronto para ser vertido.

TABELA 10.1. Volumes (em mL) dos ingredientes necessários para o preparo de géis de corrida e empilhamento para o aparelho Mini Protean II da fábrica Bio-Rad (de acordo com instruções do fabricante).

Componente	Gel de corrida		Gel de empilhamento	
	10%	12,5%	15%	5%
Água destilada	3,33	2,67	2,00	2,38
Estoque de acrilamida a 30%	2,67	3,33	4,00	0,63
Tampão de corrida	2,00	2,00	-	-
Tampão de empilhamento	-	-	2,00	1,00
TEMED	0,008	0,008	0,008	0,005
10% Persulfato de amônio	0,080	0,080	0,080	0,040

3. Adicionar o TEMED e APS à solução do gel de corrida, misturar, e transferir para o molde do gel com uma pipeta tipo Pasteur. Esperar que o líquido se assente. Para eliminar irregularidades na interface ar/gel e acelerar a polimerização cobrir com uma mistura de água:butanol a 1:1. Esperar polimerizar por 1 hora.

4. Quando o gel estiver polimerizado decantar a mistura de água:butanol e enxaguar toda a superfície com bastante água destilada. Secar, gentilmente, com papel de filtro. Juntar o TEMED e APS à solução para o gel de empilhamento, misturar, e transferir para cima do gel de corrida. Introduzir o pente formador de cavidades e aguardar até que o gel esteja polimerizado (1 hora). Ao retirar o pente lavar bem as cavidades com água destilada.

DICAS: As soluções de poli(acrilamida) para o preparo de géis devem ser desgaseificadas sob vácuo por 15 min, antes da adição do TEMED e APS, pois a presença de oxigênio pode interferir com a polimerização, atrasando-a. Para se saber se a polimerização está ocorrendo, deixar o restante das soluções para o preparo dos géis polimerizando nos recipientes onde foram preparadas (esta etapa é necessária de qualquer modo, pois não se deve descartar acrilamida não polimerizada nas redes de escoamento do laboratório).

5. Ferver as amostras a serem analisadas (com exceção dos marcadores moleculares pré-coloridos que podem ser adquiridos da Bio-Rad ou outros fornecedores) por 5 min e deixar resfriar à temperatura ambiente.

6. Transferir o suporte com os géis para o tanque de eletroforese e encher com o tampão de eletrodo. Certificar-se de que não há bolhas de ar sob o gel, pois elas podem interferir na passagem da corrente elétrica; as bolhas devem ser eliminadas pelo uso de uma seringa com a agulha dobrada. Transferir as amostras para o gel com uma seringa ou pipetador automático. O máximo volume de amostra que pode ser aplicado (neste aparelho) é de 16 μL .

7. Correr o gel sob corrente de 200 V por aproximadamente, 45 min a 1 hora, ou até que a linha azul do indicador tenha acabado de sair do gel.

8. Parar a eletroforese e separar as duas placas de vidro de modo a retirar o gel. Cortar fora a parte correspondente ao gel de empilhamento e transferir o gel de corrida para um recipiente contendo tampão de transferência frio. Deixar permanecer por pelo menos 30 min a 4° C.

9. Umedecer o papel absorvente, os papéis de filtro (em pedaços de 10 cm x 7,5 cm) em tampão de transferência frio. Usar luvas. Preparar o sanduíche de transferência (Figura 10.1). Transferir todo o conjunto para o tanque. Encher o recipiente plástico com gelo e colocá-lo próximo ao conjunto no tanque. Encher o tanque com tampão de transferência frio até que a superfície do líquido esteja acima dos orifícios mais altos no aparelho. Por uma barra para agitador magnético dentro do tanque, tampar e transferir para um agitador magnético. Proceder à transferência a 100V por 1 hora. Se possível, manter todo o conjunto refrigerado durante a transferência.

10. Desmontar o conjunto e transferir o filtro de nitrocelulose para um recipiente contendo TBS. Deixar incubando em um agitador orbital por 5 a 10 min.

11. Descartar o TBS e adicionar 100 mL de TBS com 2% (p/v) de leite em pó desnatado (agente bloqueador). Deixar incubando até o dia seguinte a 4° C. Depois, enxaguar algumas vezes com TBS.

12. Incubação com o anticorpo primário: descartar o TBS e adicionar 20 mL de TBS com 3% (p/v) de albumina de soro bovino. Juntar 20 μL (1:1000, a quantidade pode variar de acordo com o título do anti-soro) do anti-soro primário. Deixar incubando em um agitador orbital por 45 a 90 min.

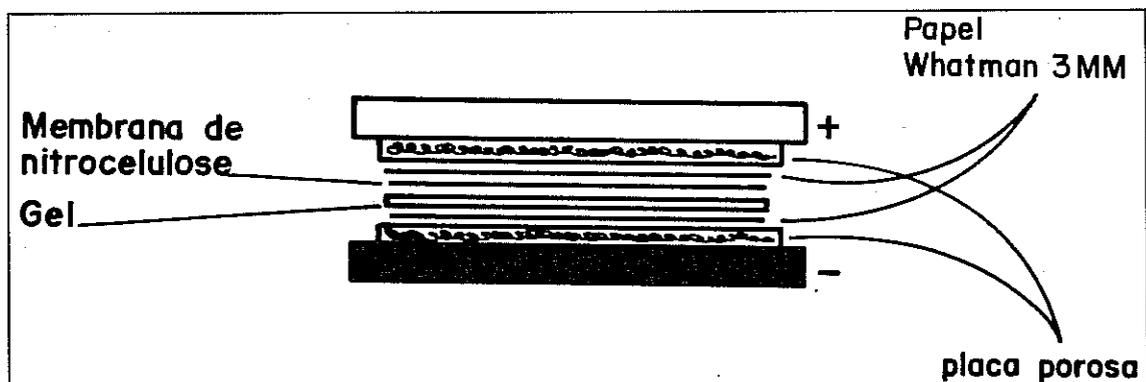


FIGURA 10.1. "Sanduíche" de transferência para detecção imunológica de produtos gênicos em membrana de nitrocelulose.

13. Enxaguar com seis trocas de TBS durante 30 min (6 x 5 min).
14. Incubação com o anticorpo secundário: descartar o TBS do último enxágüe e adicionar 20 mL de TBS contendo 3% (p/v) de albumina de soro bovino. Juntar 10 µL do anti-soro secundário e deixar incubando num agitador orbital por 45 min.
15. Enxaguar 3X por 5 min com TBS.
16. Descartar o TBS do último, enxaguar e deixar incubando com tampão para fosfatase alcalina por 2 min.
17. Descartar o tampão e deixar colorir com 10 mL de reagente de fosfatase alcalina:
 - 10 mL de tampão para fosfatase alcalina
 - 66 µL de tetrazólio nitroblue (NBT)
 - 66 µL de bromocloroindolilfosfato (BCIP)

Deixar incubando no escuro sem agitação. Para parar a reação, descartar o reagente e enxaguar com T₁₀E₁.

Comentários: o anti-soro secundário, obviamente, deve ser composto de imunoglobulinas do mesmo animal que foi utilizado para gerar o antisoro primário. Existem, também, outras opções, além da marcação com fosfatase alcalina, para a obtenção de sinais. Por exemplo, a peroxidase da raiz-forte (*Nasturtium amaracea*) também é muito popular.

10.6. Considerações Finais

O objetivo deste capítulo foi a compilação de métodos específicos para estudos de biologia molecular em *Rhizobium*. Outros métodos de uso mais geral em biologia molecular, como clonagem, hibridização de Southern, e extração e purificação de vetores de *E. coli* para clonagem são disponíveis em livros de metodologia em biologia molecular como por exemplo Maniatis et al. (1982) e Berger & Kimmel (1987). O fato de alguns métodos não estarem listados para trabalhos com *Rhizobium*, não significa que não sejam adequados. Entretanto, é sempre recomendável a realização de experimentos-piloto a fim de verificar se a metodologia escolhida se aplica convenientemente a cada situação.

10.7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, L.N.; HANSON, R.S. Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. **J. Bacteriol.**, v.161, p.955-962, 1985.
- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado)

- BAGDASARIAN, M.; LURZ, R.; RUKERT, B.; FRANKLIN, F.C.H.; BAGDASARIAN, M.; FREY, J.; TIMMIS, K.N. Specific purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. **Gene**, v.16, p.237-247, 1981.
- BEATTIE, G.A. **Quantitative and molecular analysis of nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1991. (Tese de Doutorado).
- BERGER, S.L.; KIMMEL, A.R., ed. Guide to molecular cloning techniques. **Methods in Enzymol.**, Vol.152. San Diego: Academic Press Inc, 1987. 813p.
- BERGERSEN, F.J. Growth of *Rhizobium* on synthetic medium. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.14, p.349-360, 1961.
- BERINGER, J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.84, p.188-198, 1974.
- BERINGER, J.E.; BEYNON, J.L.; BUCHANAN-WOLLASTON, A.V.; JOHNSTON, A.W.B. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. **Nature**, v.276, p.633-634, 1978.
- CHUA, K-Y.; PANKHURST, C.E.; MACDONALD, P.E.; HOPCROFT, D.H.; JARVIS, B.D.W.; SCOTT, D.B. Isolation and characterisation of transposon Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. **J. Bacteriol.**, v.162, p.335-343, 1985.
- COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.2, p.113-121, 1989.
- CRESSWELL, A.; SKØT, L.; COOKSON, A. The construction, detection and use of bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains. **J. Appl. Bacteriol.** (in press).
- DARZINS, A.; CHAKRABARTY, A.M. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.159, p.9-18, 1984.
- DIEBOLD, R.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. **J. Bacteriol.**, v.171, p.4821-4830, 1989.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKI, D.R. Broad host range DNA cloning system from Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.7347-7351, 1980.

- ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v.1, p.584-588, 1978.
- FISHER, F.F.; LONG, S.R. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, v.357, p.655-660, 1992.
- FRIEDMAN, A.M.; LONG, S.R.; BROWN, S.E.; BUIKEMA, W.J.; AUSUBEL, F.M. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. **Gene**, v.18, p.289-296, 1982.
- HENNECKE, H. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. **FEBS Lett.**, v.268, p.422-462, 1990.
- HIRSCH, P.R.; VAN MONTAGU, M.; JOHNSTON, A.W.B.; BREWIN, N.J.; SCHELL, J. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.120, p.403-412, 1980.
- HOLMES, D.S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.**, v.114, p.193-197, 1981.
- HYNES, M.F.; MCGREGOR, N.F. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. **Mol. Microbiol.**, v.4, p.567-574, 1990.
- HYNES, M.F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M.P.; PÜHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v.78, p.111-120, 1989.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. ed., **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v.1, p.234-244, 1984.
- LABES, M.; PÜHLER, A.; SIMON, R. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. **Gene**, v.89, p.37-46, 1990.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C.; DENARIE, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature**, v.344, p.781-784, 1990.
- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982.
- MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.9, p.59-93, 1990.

- MILNER, J.L.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. **Mol. Microbiol.**, v.6, n.21, p.3137-3147, 1992.
- MYTTON, L.R.; SKØT, L. Breeding for improved symbiotic nitrogen fixation. In: HAYWAR, M.D.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. ed., **Plant Breeding. Principles and Prospects**. London: Chapman and Hall, 1993. p.451-472.
- PRIEFER, U.B.; SIMON, R.; PÜHLER, A. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. **J. Bacteriol.**, v.163, p.324-330, 1985.
- SELVARAJ, G.; IYER, V.N. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. **J. Bacteriol.**, v.156, p.1292-1300, 1983.
- SIMON, R. High frequency mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. **Mol. Gen. Genet.**, v.196, p.413-420, 1984.
- SIMON, R.; O'CONNELL, M.; LABES, M.; PÜHLER, A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Meth. Enzymol.**, v.118, p.640-659, 1986.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v.1, p.784-791, 1983.
- SIMON, R.; QUANDT, J.; KLIPP, W. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. **Gene**, v.80, p.161-169, 1989.
- SKØT, L.; HARRISON, S.P.; NATH, A.; MYTTON, L.R.; CLIFFORD, B.C. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the δ -endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. **Pl. Soil**, v.127, p.285-295, 1990.
- SKØT, L.; TIMMS, E.; MYTTON, L.R. The effect of toxin-producing *Rhizobium* strains, on larvae of *Sitona flavescens* feeding on legume roots and nodules. **Pl. Soil** (in press).
- SPAINK, H.P. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and and questions. **Plant Mol. Biol.**, v.20, p.977-986, 1992.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid PRL1JI. **Plant Mol. Biol.**, v.9, p.27-39, 1987.

- STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. **J. Bacteriol.**, v.169, p.5789-5794, 1987.
- THOMAS, C.M. ed., **Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria**. London & San Diego: Academic Press. Inc, s/a. 276p.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p.199-206, 1990.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.399-428, 1992.
- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.