Comunicado Técnico 137

ISSN 1517-8862
Seropédica, RJ
Outubro, 2011

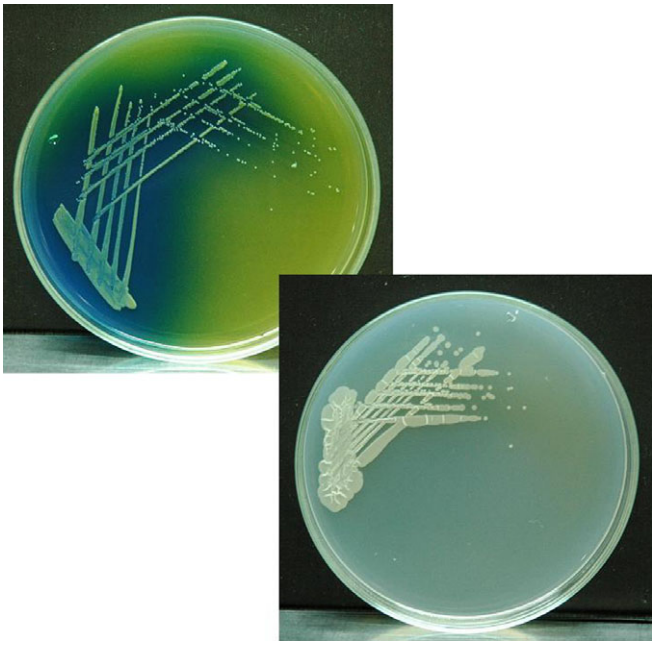

Foto: Natalia Chamarelli Valente

Extração de RNA total de células de *Azospirillum amazonense* estirpe CBamc fixando nitrogênio para estudos de expressão gênica

Stefan Schwab[1]
Ana Luíza Rivello Crivelaro[2]
Aline Vieira de Matos Macedo[3]
Jean Luiz Simões de Araújo[1]
José Ivo Baldani[1]

Introdução

O gênero *Azospirillum* abrange espécies bacterianas de vida livre que podem estimular o crescimento de diversas plantas economicamente importantes através de características fisiológicas diversas como, por exemplo, a produção de fito-hormônios ou a fixação de nitrogênio (revisto por BASHAN e DE-BASHAN, 2010). *Azospirillum amazonense* é uma bactéria que foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras cultivadas na Amazônia e no estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, foi também isolada de plantas de arroz, milho e sorgo, cultivadas em Seropédica, RJ (MAGALHÃES et al., 1983; BALDANI e BALDANI, 2005), de cana-de-açúcar no Havaí e na Tailândia, de palmeiras na região amazônica e também de abacaxi e banana (BALDANI et al., 2005). Verificou-se que o consórcio de *A. amazonense* com outras quatro espécies de bactérias endofíticas diazotróficas é capaz de promover o crescimento vegetal quando inoculado em plantas de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002, 2006). Além disso, mostrou-se o potencial da bactéria como inoculante agrícola através de ensaios de inoculação de arroz em casa-de-vegetação, que indicaram uma contribuição significativa da fixação de nitrogênio pelo microrganismo como efeito responsável pelo estímulo do crescimento vegetal (RODRIGUES et al., 2008). Como consequência, *A. amazonense* CBamc passou a fazer parte do inoculante para cana-de-açúcar lançado pela Embrapa.

Alguns estudos sobre a genética da fixação de nitrogênio em *A. amazonense* têm sido conduzidos, tendo-se detectado os operons *nifHDK*, *nifUSV*, *nifENX*, *nifA*, *fixABC* e *glnB* (POTRICH et al., 2001). O sistema DRAG/T de controle pós-traducional da

[1] *Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, km 7, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mails: sschwab@cnpab.embrapa.br, jean@cnpab.embrapa.br, ibaldani@cnpab.embrapa.br*
[2] *Bolsista de Iniciação Científica CNPq-INCT, curso de Ciências Biológicas da UFRRJ, aluiza.rivello@hotmail.com*
[3] *Analista da Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, km 7, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. Email: aline@cnpab.embrapa.br*

Embrapa

nitrogenase não foi encontrado, sendo que a atividade desta enzima somente é inibida parcialmente pela presença de amônio, característica esta favorável na utilização do microrganismo como biofertilizante/ inoculante (HARTMANN et al., 1986). Recentemente, a sequência de DNA genômico da estirpe Y2 foi determinada, o que revelou seu potencial genético e metabólico (SANT'ANNA et al., 2011). Em relação à fixação de N_2 e metabolismo geral de N, genes previamente caracterizados foram confirmados pelo sequenciamento do genoma, e novos genes em potencial foram identificados. Contudo, o sequenciamento do genoma por si só não é suficiente para confirmar o envolvimento de genes em determinada via metabólica ou atividade. Este seria o papel dos estudos de genômica funcional como, por exemplo, da transcriptômica.

As análises de RNA constituem ferramenta básica em estudos de expressão gênica. Os avanços recentes em técnicas de genética molecular têm permitido conhecer a expressão gênica global de um tipo celular sob uma dada condição, nos chamados estudos de transcriptômica, envolvendo a análise de todo o conteúdo de RNA da bactéria (PASSALACQUA et al., 2009; YAN et al., 2010). Por outro lado, análises de transcrição reversa seguida de reação em cadeia com polimerase (RT-qPCR) permitem quantificar transcritos a partir de genes individuais de modo sensível e econômico (UDVARDI et al., 2008). Estas estratégias requerem procedimentos de extração e preparo das amostras que possibilitem a obtenção de um RNA de alta qualidade.

Este documento descreve a padronização de um procedimento para a extração de RNA total de células da estirpe CBamc de *A. amazonense* (BR11145) (REIS JR. et al., 2004) fixando nitrogênio, para a obtenção de amostras de alta qualidade.

Condições de cultivo, monitoramento da atividade de nitrogenase e coleta das amostras

A bactéria foi inicialmente cultivada em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido LGI (MAGALHÃES et al., 1983) suplementado com sacarose 5 g/L e glutamato de sódio 2 mM como fonte única de nitrogênio e incubado sob agitação a 120 rpm, 30ºC. O crescimento celular foi acompanhado medindo-se a densidade ótica da cultura a 600 nm ($D.O._{600}$), e a atividade de nitrogenase foi monitorada através de ensaios de redução de acetileno (ARA). Após se verificar altos níveis de atividade de nitrogenase (Fig. 1), adicionou-se glutamato de sódio 15 mM (concentração final) de modo a inibir a atividade dessa enzima. Alíquotas de 15 mL da suspensão bacteriana foram coletadas antes e cerca de 90 min após a adição do glutamato[(1)] para tubos tipo Falcon, e estes foram centrifugados a 5.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi prontamente congelado em banho de nitrogênio líquido, e armazenado a -70ºC.

Extração de RNA e avaliação das amostras resultantes

RNA total de *Azospirillum amazonense* estirpe CBamc fixando N_2: 1) método do fenol a quente (SCHERRER e DARNELL, 1962); 2) método do reagente Trizol (Invitrogen, manual e procedimento disponíveis em http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/

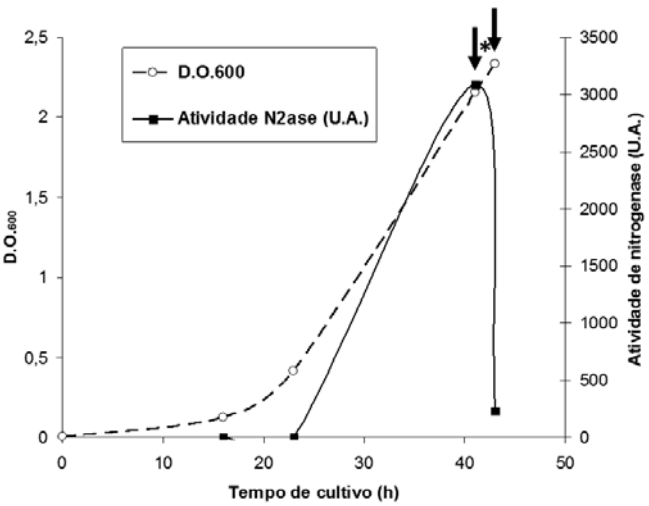

Fig. 1. Perfil de crescimento e atividade de nitrogenase da bactéria *Azospirillum amazonense* estirpe CBamc nas condições deste estudo. As setas indicam os pontos de coleta para a extração do RNA total, enquanto o asterisco (*) mostra o ponto de adição de glutamato de sódio 15 mM (concentração final).

[(1)] Futuramente, pretende-se comparar estas duas condições (pré- e pós-adição de glutamato, ou "fixação de N_2" versus "abundância de N") para a caracterização de genes envolvidos na fixação de nitrogênio em *A. amazonense*. Em *Escherichia coli*, 90 minutos (período de tempo, no presente trabalho, para a coleta da amostra "pós-adição de glutamato") é suficiente para alterações do conteúdo de RNA frente a determinado estímulo ambiental (GOLDING et al., 2005); pressupôs-se no presente estudo que em *A. amazonense* o tempo de resposta seja semelhante.

trizol_reagent.pdf); 3) método modificado do reagente Trizol (com o reagente utilizado a quente, 65°C); 4) uso do reagente *RNAprotect Bacteria* (Qiagen, manual disponível em http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=179) seguido do método modificado do reagente Trizol (com o reagente a quente); 5) método modificado do reagente Trizol (com o reagente a quente) seguido do uso do *kit RNeasy Mini* (Qiagen, manual disponível em http://www.qiagen.com/hb/rneasymini); e 6) método padronizado, desenvolvido e apresentado neste documento, mesclando parte do método modificado do reagente Trizol (com o reagente a quente) com o método do *kit RNeasy Mini*. O RNA extraído através dos seis procedimentos foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta em Nanodrop 2000c. A Tab. 1 mostra os valores de absorbância das amostras de RNA total resultante dos seis procedimentos utilizados a partir de duas amostras biológicas iniciais cada, sendo possível verificar que o procedimento 6 foi o que resultou em amostras de maior qualidade (considerando as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}).

De acordo com análises por eletroforese em gel de agarose desnaturante (Fig. 2), apenas o procedimento padronizado mesclando parte do método modificado do reagente Trizol (com o reagente a quente) com o método do *kit RNeasy Mini* (método 6) foi satisfatório para a obtenção de amostras de RNA de qualidade. A presença de bandas bem definidas e a maior intensidade da banda do rRNA subunidade 23S em relação à do 16S sugerem que as amostras do procedimento estabelecido contêm RNA intacto e livre da atividade de RNases potencialmente contaminantes.

Detalhamento do procedimento estabelecido

O manual do método do Trizol sugere a lise das células através de pipetagem repetitiva com o reagente à temperatura ambiente. Como demonstrado na Fig. 2 (método 2), este procedimento não foi satisfatório para a obtenção de amostras de RNA com a qualidade mínima requerida. Em nosso procedimento adaptado, utilizando o mesmo princípio da técnica do fenol a quente para a extração de RNA (SCHERRER e DARNELL, 1962), o reagente foi pré-aquecido a 65°C e 2 mL do mesmo foi utilizado para lisar o sedimento celular proveniente de 15 mL de suspensão, através de pipetagem repetitiva em banho-maria nessa

Tabela 1. Parâmetros espectrofotométricos das amostras de RNA total de *A. amazonense* estirpe CBamc, resultante dos seis procedimentos testados.

Procedimento	Amostra	[1][RNA] (μg/μL)	[2]A_{260}/A_{280}	[3]A_{260}/A_{230}
1	Pré-adição de glutamato	2,3	1,84	1,08
	Pós-adição de glutamato	2,9	1,95	1,24
2	Pré-adição de glutamato	2,9	1,95	0,91
	Pós-adição de glutamato	2,8	1,97	0,91
3	Pré-adição de glutamato	3,6	1,94	1,47
	Pós-adição de glutamato	2,9	2,09	1,54
4	Pré-adição de glutamato	3,7	2,08	2,08
	Pós-adição de glutamato	3,6	2,09	1,78
5	Pré-adição de glutamato	6,0	2,09	2,08
	Pós-adição de glutamato	2,7	2,11	1,70
6	Pré-adição de glutamato	1,3	2,13	2,34
	Pós-adição de glutamato	1,3	2,12	2,30

[1] Concentração de RNA estimada através da absorbância da amostra a 260 nm (A260), determinada no espectrofotômetro Nanodrop 2000c.
[2] De acordo com SAMBROOK et al. (1989), esta razão é utilizada para avaliar a pureza relativa de ácidos nucleicos (DNA e RNA) em relação a proteínas.
[3] De acordo com LUEBBEHUSEN (2004), esta razão é utilizada para avaliar a pureza relativa de ácidos nucleicos (DNA e RNA) em relação a compostos aromáticos como fenol ou Trizol.

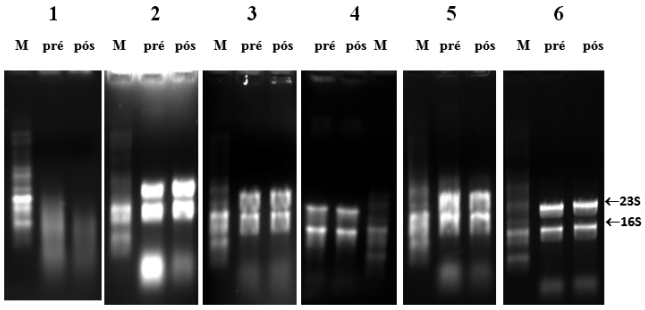

Fig. 2. Eficiência relativa dos métodos de extração de RNA total de *A. amazonense* estirpe CBamc fixando N_2, para a obtenção de amostras de qualidade. Os números indicam o método utilizado, conforme descrito no texto. As amostras resultantes foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (SAMBROOK et al., 1989). M = marcador de tamanho molecular *0.5-10 kb RNA ladder* (Invitrogen, nº catálogo 15623-200); pré = amostra pré-adição de glutamato (ver explicação no texto); pós = amostra pós-adição de glutamato.

temperatura. O restante do procedimento seguiu essencialmente como descrito no manual do reagente até a etapa de adição de isopropanol para precipitação do RNA. Nesta etapa, após uma breve homogeneização por pipetagem repetitiva na presença do isopropanol, 70μL da amostra foram prontamente transferidos para uma coluna do *kit RNeasy Mini* acoplada a um tubo de coleta de 2 ml

fornecido pelo *kit*. O sistema foi centrifugado por 15 s a $\geq$ 8.000 x g. O eluato foi descartado e o restante da amostra foi aplicado na coluna, repetindo-se o procedimento de centrifugação. A partir de então, seguiu-se o protocolo do manual do *kit*, com a adição do tampão RPE, etc. Ao fim do procedimento de isolamento de RNA, a amostra foi eluída em 40 µL de H_2O tratada para RNases.

Considerações finais

O procedimento padronizado tem permitido o preparo de amostras de RNA total da estirpe CBamc de *A. amazonense* com alta qualidade. O valor das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} determinados para a amostra deste estudo (Tab. 1), por exemplo, indica que a mesma contém aproximadamente 100% de ácidos nucleicos em relação a proteínas (SAMBROOK et al., 1989), e baixo conteúdo de compostos aromáticos como fenol ou Trizol (LUEBBEHUSEN, 2004). A qualidade das amostras de RNA preparadas através do procedimento descrito neste documento está de acordo com o que exigem metodologias para estudos de expressão gênica como RT-qPCR, hibridização em microarranjo de DNA, e sequenciamento em larga escala de cDNA (ou "RNA-Seq").

Referências

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; KRIEG, N. R.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A.; DÖBEREINER. Genus II. *Azospirillum*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed..) **Bergey's Manual of systematic bacteriology**: the proteobacteria: the alpha, beta, delta, and epsilonproteobacteria. 2 ed. Dordretch: Springer, 2005. v. 2, part C. p. 22-24.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136. 2010.

GOLDING, I.; PAULSSON, J.; ZAWILSKI, S. M.; COX, E. C. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. **Cell**, v. 123, p. 1025-1036, 2005.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 864-870, 1986.

LUEBBEHUSEN, H. The significance of the 260/230 ratio in determining nucleic acid purity. Disponível em; <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100>. Acesso em 8 set. 2011.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N_2-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v. 242: 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

PASSALACQUA, K. D.; VARADARAJAN, A.; ONDOV, B. D.; OKOU, D. T.; ZWICK, M. E.; BERGMAN, N. H. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3203-3211, 2009.

POTRICH, D. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, I. S. Partial characterization of nif genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34: 1105-1113, 2001.

REIS JR., F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different Brachiaria species. **Symbiosis**, v. 36, p. 41-56, 2004.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N_2 fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANT'ANNA, F. H.; ALMEIDA, L. G. P.; CECAGNO, R.; REOLON, L. A.; SIQUEIRA, F. M.; MACHADO, M. R. S.; VASCONCELOS, A. T. R.; SCHRANK, I. S. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 409-422, 2011.

SCHERRER, K.; DARNELL, J. E. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. **Biochemistry and Biophysichal Research Communication**, v. 7, p. 486-490, 1962.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. -R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, v. 20, p. 1736-1737, 2008.

YAN, Y.; YANG, J.; DOU, Y.; CHEN, M.; PING, S.; PENG, J.; LU, W.; ZHANG, W.; YAO, Z.; LI, H.; LIU, W.; HE, S.; GENG, L.; ZHANG, X.; YANG, F.; YU, H.; ZHAN, Y.; LI, D.; LIN, Z.; WANG, Y.; ELMERICH, C.; LIN, M.; JIN, Q. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 105, p. 7564-7569, 2008.

YAN, Y.; PING, S.; PENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; YANG, J.; DOU, Y.; LI, Y.; FAN, H.; FAN, Y.; LI, D.; ZHAN, Y.; CHEN, M.; LU, W.; ZHANG, W.; CHENG, Q.; JIN, Q.; LIN, M. Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. **BMC Genomics**, 7 jan. 2010. Disponível em: http://genomebiology.com/content/pdf/1471-2164-11-11.pdf. Acesso em: 12 set. 2010.

Comunicado Técnico, 137

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agrobiologia
Endereço: BR465, km7 - Caixa Postal 74505
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2011): 50 exemplares

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

Comitê de Publicações

Presidente: *Norma Gouvêa Rumjanek*
Secretária-Executiva: *Carmelita do Espírito Santo*
Membros: *Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.*

Expediente

Revisão de texto: *Guilherme Montandon Chaer*
Normalização bibliográfica: *Carmelita do Espírito Santo*
Tratamento das ilustrações: *Maria Christine Saraiva Barbosa*
Editoração eletrônica: *Marta Maria Gonçalves Bahia*