

Obtenção de uma xilanase recombinante do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote de formigas cortadeiras

Mariana F. Fracola^{1*}, Ariele C. Moreira², Dulce H. F. de Souza³.

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar; *marianafracola@gmail.com

2. Estudante de PG da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

3. Pesquisador do Depto.de Química, UFSCar, São Carlos/SP

Palavras Chave: Xilanase, Clonagem, Fungo

Introdução

Xilanases são enzimas que, randomicamente, clivam a cadeia principal de xilana, polissacarídeo não celulósico mais abundante da parede celular de plantas. Estas enzimas são produzidas por diferentes organismos e apresentam diversas aplicações biotecnológicas^{1,2}.

Partindo de RNA extraído de cultura do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote da formiga saúva *Atta sexdens* e de oligonucleotídeos desenhados baseados em sequência depositada em banco de dados, recentemente nós obtivemos um clone (chamado pPICZ α -A-*xyI*) que foi transformado em linhagem KM71H de *Pichia pastoris*³. A enzima, LgXyn2, foi expressa em baixa concentração dificultando sua identificação e purificação. O objetivo deste projeto é subclonar a ORF da xilanase no vetor pPICZ α -A de forma que a enzima seja expressa em fusão com seis resíduos de histidinas para auxiliar na posterior etapa de purificação. Será feito um estudo de seleção da melhor linhagem de *P. pastoris* para expressão da enzima, que será purificada e caracterizada bioquímica e enzimaticamente.

Resultados e Discussão

O DNA que codifica para a síntese da LgXyn2 foi obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase, PCR, utilizando como molécula molde o plasmídeo pPICZ α -A-*xyI* e os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* com a inclusão de sítios de clivagem para as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para a subclonagem unidirecional no vetor pPICZ α -A (figura 1). Sítio para reconhecimento da trombina foi adicionado no oligo *reverse* (em vermelho na figura 1). O DNA amplificado foi clonado no vetor pPICZ α -A e o clone (pPICZ α -A-LgXyn2) foi transformado em linhagem DH5 α de *E. coli*. A seleção das colônias transformantes foi realizada com a utilização do antibiótico zeocina. O DNA plasmidial das colônias transformantes foi extraído e a clonagem foi confirmada por PCR e digestão enzimática. A figura 1 mostra o resultado do sequenciamento de um dos clones obtidos.

O clone pPICZ α -A-LgXyn2 (15 μ g) foi linearizado com a enzima *SacI* e utilizado para transformar células eletrocompetentes da linhagem X-33 de *P. pastoris*. As células foram plaqueadas em meio de cultura YPDS contendo 100 μ g.ml⁻¹ do antibiótico zeocina durante três dias à 30°C. Após o crescimento, as colônias foram repicadas na presença de alta concentração de antibiótico (1000 μ g.ml⁻¹). O DNA genômico de cinco colônias crescidas na presença de alta concentração de zeocina foi extraído e utilizado como molécula molde em

PCR para confirmação dos clones. Os oligonucleotídeos usados foram os indicados para amplificação de AOX1.

Cinco colônias transformantes foram utilizadas em experimentos de expressão da enzima em pequena escala (5mL), que foi induzida com adição de 1% de metanol a cada 24 h, durante 144 h. A cada 24 h 1 mL do meio de cultura foi retirado e avaliado quanto à expressão da xilanase através de ensaio de atividade enzimática⁴, eletroforese em condições denaturantes (SSD-PAGE) e imonodetecção (utilizando o anticorpo anti-His). Todas as cinco colônias expressaram a xilanase e a colônia que apresentou maior expressão da enzima, conforme análise pelos métodos descritos anteriormente, foi escolhida para procedimento de expressão em maior volume de meio de cultura (500 mL).

```
GAATTCATGAACACCACCGAACCCAGAGGACTTCAGCATTCTTCCCGCTCTGGAACACCAAGTTCTACTGGGTA
CTAACGGATACTACTACTCTTGGTGGACGGACGGTCCCGCTCAGGCCACCTACGCCAACGGTGGAGGTGGTCA
ATAGCCTCAACTGGTCAAGTAACAACGGTAACCTCCTCGGTGGGAAGGATGGGACCCGGGCTTATAGTGCAGAG
TGATCCAGTACAGCGGTACTTACCAGCCTAACGGGAACAGTTACCTTTCTGTCTATGGCTGGACACTGAACCCCT
CATCGAGTACTATATCGTCCGAGTCTACGGTCTCTACAATCCCTCCTCCGCCACCGCGCTACAACGAACCATCTA
TTAATGGCACGCAGACTTTCCAAAGTTCTGGTCTGTCCGCAACCCCAAAAAAGAACCCGGGAGGATCCATCAGTGG
CAGTGTAGTACCGGATGCCACTTTACTGCCCTGGGGAAATTCGGTCCCGGTGGATCCCGGCGCC
```

Figura 1. Sequenciamento de um clone pPICZ α -A-LgXyn2. Sublinhados estão os oligonucleotídeos, em negrito o sítio de restrição enzimático e em vermelho a sítio para reconhecimento da enzima trombina.

Conclusões

Em trabalho anterior a xilanase LgXyn2 foi expressa porém, devido a baixa concentração e a ausência de marcador na molécula, não foi possível prosseguir com o estudo de identificação e purificação da enzima. Neste trabalho o DNA que codifica a síntese da xilanase foi subclonado no vetor pPICZ α -A com modificação nos sítios de restrição enzimática resultando na inclusão de peptídeo de histidinas na molécula expressa. A clonagem foi confirmada por sequenciamento de DNA e análise por PCR. A expressão da enzima em fusão com peptídeo de histidinas foi avaliada através de Imunodetecção e de eletroforese. Ensaio de expressão em maior volume já foram iniciados e de acordo com os resultados obtidos aqui, espera-se que o processo de purificação também seja facilitado pela afinidade da fusão pela resina de níquel.

Agradecimentos

À FAPESP (processo 2011/21955-3).

1. Puls, J. (1997) Macromol. Symp. 120,183–196.
2. Bissoon, S., Christov, L., Singh, S. (2002). Process Biochemistry 37,567 – 572.
3. Moreira, A.C. (2013) Dissertação de mestrado, DQ, UFSCar.
4. Sumner, J.B. (1924) J Biol Chem 62, 287-290.