UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONAGEM DO GENE DE UMA AMILASE TERMOESTÁVEL
EM *E. coli* E *B. subtilis*.
ESTUDO DE SUA EXPRESSÃO EM *E. coli*.

ENNY FERNANDES SILVA
Dissertação de Mestrado

Orientador:
Prof. Dr. MANUEL TROYANO PUEYO

SÃO PAULO
1989

Ao meu pai LEVINO e minha mãe MARIA LUIZA pela compreensão, apoio,
incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Manuel Troyano Pueyo, orientador desta tese, pela dedicação e amizade, fatores que muito contribuíram à realização deste trabalho tanto na parte experimental como na elaboração da parte escrita.

Ao Dr. David Dubnau, pelo incentivo, discussão de resultados, e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no "The Public Research Institute Of The City Of New York, Inc", com sua equipe, aprendendo várias técnicas e realizando alguns experimentos.

Ao Dr. Issar Smith, da mesma instituição em New York, pela amizade, e por ter cedido algumas cêpas de B. subtilis.

Ao Dr. Claudio Denoya, por sempre me incentivar a estagiar em New York, discussão de experimentos, e apoio em todos os momentos que dele necessitei.

Ao Dr. Francisco J.S. Lara que gentilmente cedeu a cêpa de B. stearothermophilus, e por ter me iniciado em pesquisa científica.

Ao Dr. Roberto V. Santelli, pela convivência, sugestões e por algumas discussões.

Ao Roberto Viana Nonato pela ajuda experimental, cedendo-me os anticorpos anti-amilase de E. coli USP 191, 205, 205/3; o plasmídeo p USP ami 2, além de ser um grande companheiro de laboratório e amigo.

Aos colegas de laboratório Siulin Huang, Helena Yoshida, Olivia Uehara, Silvana Marinaro, Lillian Januário e Renato Tomiyassu Obata pela ajuda em alguns experimentos e aos outros colegas pelo contínuo estímulo durante este trabalho: Luci Deise Navarro Cattapan, Flávia Pernasetti, Horácio Frydmann, Gidel Soares, Sérgio Luiz Galdino, além de Felipe Garcia Vallejo, com quem primeiro estagiei neste laboratório.

A Marcia Vianna dos Reis, Marina Baptista Alves e Humberto Figueiredo dos Santos pelo carinho e manutenção do laboratório.

Aos professores do Departamento de Química que comigo discutiram resultados, ou pela convivência durante este período, a todos meus colegas de pós-graduação de vários laboratórios pela companhia amiga e aos funcionários deste Instituto.

A Profa. Elizabeth Garcia do Depto de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas sugestões na síntese do substrato indicador a atividade amilásica usado nesta tese, e a Ciba-Geigy do Brasil por ter gentilmente cedido o Cibachron Brillant Blue Fr (CBB) com o qual esse substrato foi produzido.

Ao Henrique Otero e equipe da Pharmacia pela amizade.

A todos amigos da F.A.A.P. pelo grande valor que sempre me depositaram.

A Cibele R. Carlos (Cibalena) pela datilografia e principalmente pela paciência durante a elaboração do manuscrito.

Ao Teodoro Spitzer pelo amor, pela "força" que sempre me deu, e por todos os seus conselhos.

Ao C.N.P.q. pela concessão de um período de minha bolsa de estudo.

A C.A.P.E.S. pelo auxílio financeiro de grande parte da bolsa de estudo, dos desenhos desta tese e da bolsa de estudo para estagiar no "The Public Research Institute Of The City Of New York, Inc", enfim, permitindo a realização desta tese.

ABREVIATURAS

Amy ⁺	fenótipo que indica atividade de amilase
Amy ⁻	fenotipo que indica ausência de atividade amilásica
Amp ^r	resistência plasmidiana à ampicilina
Amp ^s	sensibilidade à ampicilina
d ATP	desoxiadenosina trifosfato
³² p d ATP	desoxiadenosina trifosfato marcado com isótopo ³² p na posição alfa
BSA	soro albumina bovina
Cm ^r	resistência plasmidiana à cloranfenicol
Cm ^s	sensibilidade à cloranfenicol
cpm	contagens por minuto, como medida de radioatividade
uCi	micro Curie (1 Curie = 37 GBq)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAse	desoxirribonuclease pancreática
DTT	ditiotreitol
EtBr	Brometo de Etideo
EDTA	ácido etilenodiamino tetraacético
EGTA	ácido etilenoglicol tetraacético
Km ^r	resistência plasmidiana à canamicina
Km ^s	sensibilidade a canamicina
Krpm	rotações por minuto x 1000
Kb	kilobase
Mdal	megadalton
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
nm	nanômetro
OD	densidade óptica
pb	pares de bases
P.M.	peso molecular
POPOP	1,4-bis(2-(5-fenil-oxazolil))benzeno
PPO	2,5 - difeniloxazol
RNAse	ribonuclease
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SSC	solução padrão (1X) de NaCl 0.15 M e citrato de sódio 0.015 pH = 7.0
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tetr ^r	resistencia plamidiana à tetraciclina
Tet ^s	sensibilidade à tetraciclina
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
T4 ligase	DNA ligase de fago T4
UV	luz ultra violeta
x g	aceleração da gravidade no sistema MKS (9.81 m/s ²)

INDICE

Pág.

Agradecimentos

Abreviaturas

1. Introdução	1
A. Amido: Características e Estrutura	1
B. α -Amilase: Definição e Características	2
1. α -amilases termostáveis	3
C. Genes relacionados com a expressão de alfa-amilase em bactérias do genero <u>Bacillus</u>	5
D. Proteínas exportadas por células de <u>E. coli</u>	6
E. <u>Bacillus subtilis</u> como sistema de clonagem	7
2. Materiais e Métodos	9
1. Reagentes	9
1.1. Enzimas de restrição	9
1.2. Precursor marcado com ^{32}P	9
1.3. Meios de cultura	9
1.4. Outros reagentes	9
1.5. Material de autoradiografia e fotografia	9
2. Condições de Cultura	9
2.1. Para <u>E. coli</u>	10
2.2. Para <u>B. stearothermophilus</u>	10
2.3. Para <u>B. subtilis</u>	11
2.4. Meio mínimo para crescimento de <u>E. coli</u> (M9)	11
2.5. Meio DM3 para regeneração da parede de protoplastos de <u>B. subtilis</u>	12
3. Cêpas bacterianas empregadas	13
4. Vetores de clonagem	13
4.1. Vetores para clonagem em <u>E. coli</u>	13
4.2. Vetores para clonagem em <u>B. subtilis</u>	13

5. Eletroforese em gel de agarose	13
6. Eletroforese de proteínas em géis de poliacri - lamida	15
a. Preparação dos géis de separação e empilha - mento	15
b. Tratamento das amostras e eletroforese	16
c. Tratamento dos géis	16
7. Transferência de DNA separado em géis de agaro - se para filtros de nitrocelulose	17
8. Fixação de DNA denaturado em filtros de nitroce - lulose	17
9. Radiomarcagem do DNA com ^{32}p	18
10. Determinação da atividade específica de DNA mar - cado por "nick translation"	18
11. Cromatografia em coluna de Sephadex G-50	19
12. Hibridização de DNA previamente imobilizado em filtros de nitrocelulose	19
13. Extração de DNA	20
13.1. Preparação do DNA de plasmídeos de <u>B.</u> <u>stearothermophilus</u>	21
13.2. Preparação de DNA de plasmídeos de célu - las de <u>E. coli</u>	21
13.2.1. Lise alcalina	21
13.2.2. Lise por Ebulição	22
13.3. Extração de DNA cromossomal de <u>B. subtilis</u>	23
13.4. Obtenção de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão	25
14. Clivagem do DNA de plasmídeo com múltiplas enzimas de restrição	25
15. Tratamento do DNA com fosfatase alcalina de in - testino de bezerro	26
16. Condições de ligação de DNA	27
17. Preparação de protoplastos de <u>B. subtilis</u>	28
17.1. Transformação de protoplastos	28
18. Preparação de células competentes de <u>B. subtilis</u>	29
18.1. Transformação de células competentes de <u>B.</u>	

<u>subtilis</u>	30
19. Transformação de <u>E. coli</u>	30
20. Curvas de crescimento de <u>E. coli</u> USP 205, <u>E. coli</u> USP 191 e <u>E. coli</u> USP 33.2	31
21. Determinação da atividade amilolítica	31
21.1. Deteminação da atividade amilolítica em sobrenadantes de culturas	31
21.2. Método de detecção de colônias amilolíticas em placas	33
21.3. Determinação da atividade amilolítica em géis de poliacrilamida	33
21.4. Determinação da atividade amilolítica em géis de poliacrilamida pelo método do agar-corante	34
22. Cromatografia em papel de produtos de hidrólise de amido	34
23. Fracionamento de alfa-amilase por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35
24. Medidas de atividades de alfa-amilase em diversos compartimentos das células de <u>E. coli</u> USP 191 e <u>E. coli</u> USP 205	35
25. Dosagem de proteínas com Comassie-Blue G-250	36
26. Métodos imunoquímico: Imunodifusão dupla	37
27. Isoeletrofocalização de alfa-amilase	37
28. Análise de restrição e homologias em genes de alfa-amilase	38
29. Apendice de soluções	38
 3. Resultados	 46
1. Clonagem de fragmentos Hind III de plasmídeos de <u>B. stearothermophilus</u> em pBR 322	46
2. Detecção da capacidade amilolítica de células de <u>E. coli</u> HB 101 transformadas por plasmídeos recombinantes em placas de agar-amido	52
3. Mapa de restrição do fragmento de 5.4 Kb	54
4. Mapa de restrição do fragmento ami 2	54

5. Subclonagem do fragmento Hind III de 5.4 Kb	58
6. Atividade amilolítica em sobrenadantes de cultura de <u>E. coli</u> USP 191, 205 e 205/3	61
7. Determinação da temperatura ótima e da atividade da enzima clonada em <u>E. coli</u> USP 191 e <u>E. coli</u> 205	63
8. Natureza da atividade amilolítica detectada em sobrenadante de cultura aquecidas à 60°C	68
a. centrifugação dos sobrenadantes de culturas aquecidas a 60°C por 100 000 xg durante 90 minutos	68
b. eletroforese em géis de poliacrilamida	69
c. cromatografia dos produtos de hidrólise de amido por sobrenadantes de cultura aquecida à 60°C	69
d. reação de imunodifusão com antisoro contra a proteína de <u>B. stearotherophilus</u> clonada em <u>E. coli</u>	76
9. Clonagem do fragmento de 3.2 kb que contém o gene de alfa-amilase no plasmídeo "shuttle" pHV 33	76
10. Atividade amilolítica das cepas de <u>E. coli</u> 191, 205 e 33.2 durante o crescimento	79
11. Estudo de localização celular da amilase de <u>B. stearotherophilus</u> clonada em <u>E. coli</u> USP 191 e 205	85
12. Isoeletrofocalização das enzimas de <u>E. coli</u> USP 191 e 205	85
13. Transformação de células de <u>B. subtilis</u> com o plasmídeo pUSP 33.2 e determinação da atividade amilolítica dos transformantes	89
14. Estudo do carácter amilolítico de <u>B. subtilis</u> IA 289 ami 70	94
15. Construção dos vetores pBU 271 e pBU 271 ami 2	97
4. Discussão	101
I. Clonagem dos fragmentos Hind III de plasmídeos de <u>B. stearotherophilus</u> em pBR 322	101
II. Detecção da enzima alfa-amilase em placas	104

III. Natureza da atividade amilolítica liberada pelas células de <u>E. coli</u> transformadas com plasmídeos que contém o gene de alfa-amilase	106
IV. Análise de restrição do fragmento ami 2	109
V. Clonagem do gene de alfa-amilase de <u>B. stearothermophilus</u> em <u>B. subtilis</u>	113
5. Resumo	116
Summary	118
6. Referências Bibliográficas	119

INTRODUÇÃO

A- Amido: Características e Estrutura.

Amido é um carboidrato presente na maioria das plantas verdes e em praticamente todos os seus tecidos: folhas, frutos, grãos de pólen, raízes e tubérculos, onde funciona como importante produto final da fixação de carbono durante a fotossíntese. (Banks, Muir & Greenwood, 1973).

Quando o amido é aquecido em presença de água, os grânulos perdem sua birrefringência e conforme a temperatura é aumentada, estes grânulos incham várias vezes o seu tamanho, a viscosidade começa crescer, e sua aparência passa de suspensão opaca para a de pasta translúcida. Estas mudanças que ocorrem com a variação de temperatura são características do tipo de amido e da extensão das suas modificações. (Radly, 1976).

O amido é constituído de 2 polissacarídeos distintos: amilose e amilopectina.

A amilose é um polímero não ramificado de unidades α -1-4-D glicopirranose, instável em solução aquosa, com tendência à retrogradação (importante propriedade física que consiste na volta do amido de um estado solvatado, disperso e amorfo para um estado insolúvel, agregado ou cristalino, sendo favorecida pelo abaixamento da temperatura). Seu padrão de difração de raios-X indica que possui estrutura cristalina e forma rapidamente complexos com substâncias polares. (Banks e Muir, 1980).

Já a amilopectina é um polímero ramificado, composto de cadeias de amilose (de 18-25 unidades de glicose) unidas por ligação α -1-6 nos pontos de ramificação e apresenta um padrão de difração de raios-X que indica estrutura amorfa. A complexidade observada na estrutura da amilopectina é provavelmente limitante na formação de complexos com iodo. (Banks & Muir, 1980).

Os componentes do amido têm comportamentos diferentes quando em presença de iodeto: a amilose é responsável por uma coloração azul característica e a amilopectina por cor vermelho-purpura. Medidas potenciométricas mostram que a amilose

adsorve rapidamente até 20% do iodo livre; na amilopectina, entretanto, essa adsorção é muito mais lenta e não atinge valores limites. (Aspinall, 1970).

Embora não esteja completamente elucidado, sabe-se que o mecanismo de reação amido-iodeto envolve a inclusão de um arranjo linear de poliiôdo-iodeto dentro da hélice de amilose (French, 1975). Este arranjo depende em parte do comprimento da cadeia de amilose e a interação pode ser medida pela intensidade de cor à 620 nm. Em geral, a cor dos complexos com amilose constituída por mais de 40 subunidades de glicose é azul, mas esta se transforma sucessivamente em verde, marrom, amarela e finalmente incolor à medida que se reduz o tamanho do polímero. (Bailey & Whelan, 1961; French, 1975).

B- α -Amilase: Definição e Características.

As α -amilases (α -1-4 glucan 4 glucanohydrolase, E. C. 3.2.1.1.) constituem um grupo de enzimas bem caracterizadas que existem em praticamente todos os organismos vivos. Normalmente possuem peso molecular em torno de 50 kdaltons, são solúveis em água, usam cálcio como cofator e possuem pH ótimo que pode variar de 5.5 a 8.0 (para mais dados gerais sobre amilases ver a revisão de Fischer e Stein, 1960).

Sua ação consiste em um endoataque aleatório à ligação glicosídica α -1-4, o que gera grupos redutores em configuração α . Experimentos de hidrólise com água marcada com ^{14}O mostram que após o ataque se obtêm resíduos marcados no Oxigênio ligado ao Carbono anomérico (Kosland, 1954; Manyer e Larker, 1958; Halpern e Leibowitz, 1959). Os produtos da ação da α -amilase são oligossacarídeos lineares ou ramificados quando o substrato é respectivamente amilose ou amilopectina.

Um método de mapeamento de oligossacarídeos (Parzur e Okada, 1966) foi desenvolvido para comparar o modo de ação das várias amilases. Este método envolve cromatografia dos maltooligossacarídeos com ^{14}C no extremo redutor da glicose, incubação dos oligossacarídeos no papel com amilase (para que ocorra hidrólise), separação dos produtos em cromatografia de papel numa 2ª direção e, localização dos produtos radioativos. Por

este método foram descobertos 2 tipos de α -amilases: a sacarificante, que hidrolisa os maltooligossacarídeos a partir do extremo não redutor até a unidade maltotriosil, e a liqueficante, que hidrolisa os maltooligossacarídeos também a partir do extremo não redutor até unidades maltohexaosil e maltopentaosil.

Entre as α -amilases sacarificantes, as de maior importância são as de Bacillus natto, Bacillus subtilis, VAR. sacchariticus, , além das produzidas pelos fungos A.niger e A.orizae; dentre as liqueficientes: Bacillus subtilis, VAR. amyloliquefaciens , B. amyloliquefaciens e B. stearothermophilus.

As α -amilases liqueficientes são usadas principalmente na produção de bebidas, pão, e na indústria de papel, e as sacarificantes na indústria têxtil.

1- α -Amilases Termoestáveis.

A produção e uso de enzimas termoestáveis (α -amilase, β -amilase, celulase, catalase, glicoamilase, glicose-isomerase, invertase, lipase, etc...) na indústria é alvo de grande atenção tanto em laboratórios de pesquisa, com nas próprias indústrias (Wasserman, 1984).

A termoestabilidade (retenção da atividade enzimática à temperatura alta por tempos prolongados) é uma característica importante devido aos seguintes fatores:

a- para cada 10°C aumentados na temperatura da reação química, a velocidade praticamente é dobrada ;

b- temperaturas de 60°C ou acima são inibitórias para o crescimento microbiano.

Alguns mecanismos foram propostos por Oshima (1986) para explicar a termoestabilidade, tais como:

1- mecanismos intrínsecos: mudanças na estrutura interna se refletem em mudanças nas interações intramoleculares. Muitas enzimas e proteínas de organismos termofílicos são estabilizadas pelo aumento das interações intramoleculares causadas pela troca de certos aminoácidos. Dados que ilustram claramente o efeito de certos resíduos na termoestabilidade de uma proteína foram publicados por Liao et al (1986). Estes autores introduziram por métodos adequados o gene mutado da kanamicina-nucleotidiltransferase (enzima que confere resistência a Kanamicina) de um organismo mesofílico em B. stearothermophilus e selecionaram colônias resistentes ao antibiótico à temperatura de 60 à 70°C. O sequenciamento das enzimas produzidas por estas colônias mostrou num caso a troca de Asp por Tyr na posição 80 e no outro numa variação adicional, isto é, Thr por Lys na posição 130.

2- mecanismos protetores: tais como complexos macromoleculares com uma estabilidade térmica inerente (Singleton e Amehunen, 1973) onde o biopolímero ou componente celular é estabilizado por ligação com um cofator. A amilase de microorganismos termofílicos é estável em altas temperaturas na presença de Ca^{++} ou Na^{+} (Hasegawa, 1976). Um fato semelhante se observa com uma protease termoestável, a termolisina (Weaver et al., 1976)

3- modificações bioquímicas: observou-se que o tRNA de Thermus thermophilus é em parte estabilizado pela tiolação de um resíduo de ribotimidina (Watanabe et. al. 1976). A partir deste dado pode-se especular sobre possíveis modificações postraducionais em aminoácidos determinados e que seriam responsáveis pela estabilização térmica da proteína. Este mecanismo, entretanto, não foi observado até o momento.

Segundo Farrel e Campbell (1969), as enzimas de organismos termofílicos podem ser divididas em três categorias:

a- Enzimas que são estáveis à temperatura de sua síntese (55-66°C) mas são inativadas a temperaturas mais elevadas como é o caso da malato-desidrogenase de B. stearothermophilus (Murphy et al, 1967)

b- Enzimas que são inativadas a temperatura de sua síntese a menos que estejam protegidas pelo seu substrato, como ocorre com as asparaginases de Bacillus coagulans e de Bacillus stearothermophilus (Maning & Campbell, 1957)

c- Enzimas que são normalmente resistentes a temperaturas superiores aquela de sua síntese. É isto o que se verifica com a alfa-amilase de B. stearothermophilus (Maning & Campbell, 1961). Estes autores estudaram a enzima desse microorganismo e observaram que ela retinha grande parte da atividade mesmo após ser submetida à temperatura de 65-70°C durante 24 horas. A análise de aminoácidos dessa proteína revelou que aproximadamente 23% dos resíduos correspondem a ácidos aspártico e glutâmico, e que existem duas pontes dissulfeto na molécula e, com um conteúdo de prolina perfazendo 15% dos resíduos, o que sugere a inexistência de estrutura de alfa-hélice (Singleton & Amehunen, 1973).

C- Genes relacionados com a expressão de alfa amilase em bactérias do genero Bacillus.

A alfa-amilase extracelular de B. subtilis é codificada por um gene que está normalmente inativo durante a fase vegetativa, que é o gene amy E. Este pode ser ativo quando as células são submetidas a condições limitantes da fonte de carbono (Priest, 1977), e não é induzido como ocorre por exemplo com o gene da beta-galactosidase de E. coli. A glicose entretanto, é capaz de inibir a síntese de alfa amilase quando adicionada ao meio de cultura (Sekiguchi & Okada, 1972).

Ao lado do gene amy E existe uma região cis-regulatória denominada gene amy R (Dubnau, 1967; Yamaguchi, 1974; Henner & Hock, 1982) que pode existir em pelo menos tres formas alélicas: amy R1 (B. subtilis 168), amy R2 (B. subtilis subesp. natto) e amy R3 (B. subtilis subesp. amylosacchariticus). Os "loci" R2 e R3 podem ser introduzidos em cepas derivadas de B. subtilis 168 para conferir a característica de hiperprodução de alfa-amilase (Yamaguchi et al, 1974; Yoneda et al, 1974). As sequências correspondentes aos genes amy R1 e amy R2 já foram determinadas

(Nicholson e Chambliss, 1986) tendo-se observado que não são totalmente homólogas.

As características amilolíticas das células de B. subtilis podem ser afetadas pela introdução de mutações em genes diferentes dos já mencionados. A mutação Tmr foi introduzida no gene TmrA, responsável pela resistência ao antibiótico tunicamicina e torna as células que a possuem sete vezes mais amilolíticas que as selvagens (Hitotsuyanagui et al. 1979). Possivelmente isto se deve ao fato de que a mutação torna as células mais sensíveis ao antibiótico, o qual por sua vez inibe a síntese tanto de ácido teicóico como de peptídeoglicanos da parede celular. Isto aumentaria a permeabilidade da membrana celular à alfa amilase produzida internamente. Por outro lado, a mutação papM, introduzida no gene pap, (Yoneda & Mauro, 1975) possui efeitos pleiotrópicos, ou seja, além de estimular a produção de alfa amilase e proteases extracelulares, provoca a perda simultânea do flagelo e da competência.

Em B. stearothermophilus, o controle de produção de alfa amilase não está tão bem estudado. Menciona-se que uma das dificuldades encontradas é a própria localização do gene de alfa amilase, que em algumas cepas é extracromossomal (Mielenz; 1983, este trabalho) e cromossômico em outras (Tsukagoshi, 1984; Nakagima, 1985; Gray, 1986).

D- Proteínas exportadas por células de E. coli.

Aceita-se convencionalmente que proteínas exportadas por células de E. coli são todas aquelas que se acumulam de forma solúvel no espaço periplásmico, isto é, a região compreendida entre as membranas celulares externa e interna. Segundo esta mesma convenção, são consideradas proteínas secretadas aquelas que atravessam o espaço periplásmico e passam ao meio de cultura. A única proteína secretada por E. coli segundo este critério é a hemolisina (revisão de Holland et al, 1986). O sistema de exportação de proteínas em E. coli, envolve formas precursoras. Estas sofrem um processo de maturação baseado na remoção proteolítica da extensão amino-terminal, cujo tamanho varia de 15 a 30 aminoácidos. Esta sequência é normalmente

composta em sua grande maioria por aminoácidos hidrofóbicos e é chamada de sequência líder ou sinal (Randall & Hardy, 1984).

Ihara et al (1985) purificaram, sequenciaram e compararam as alfa-amilases de B. stearothermophilus, B. amyloliquefaciens, B. liqueniformis. Todas as 3 continham uma sequência sinal longa, fato semelhante ao que ocorre com as proteínas secretadas por bactérias gram +. (Neugebauer et al. 1981). São característicos das sequências sinal dessas três amilases o alto conteúdo de resíduos de arginina e grande número de aminoácidos carregados positivamente no segmento hidrofílico estudado. As evidências experimentais indicam que o processamento da sequência sinal das alfa-amilases de B. amyloliquefaciens e de B. stearothermophilus ocorre exatamente no mesmo sítio em que ocorre o processamento das proteínas de B. subtilis e de E. coli respectivamente (Ihara et al, 1985).

E- Bacillus subtilis como sistema de clonagem.

O uso deste microorganismo gram + como sistema de clonagem se justifica porque ele apresenta uma série de vantagens. Dentre estas podem ser citadas as seguintes: possui um mapa cromossômico definido e bem caracterizado (ver revisão de Henner & Hock, 1982), não é patogênico, e capaz de produzir antibióticos, principalmente do grupo dos oligopeptídeos (Sadoff, 1972); além disto, a composição de sua parede celular é relativamente simples, já que ela é formada por peptidoglicano e ácido teicóico e não está envolvida na contaminação das proteínas secretadas com endotoxinas do envelope celular (ver revisão de Griczan, 1982).

É justamente a habilidade de secretar proteínas para o meio externo que tornam os microorganismos do gênero Bacillus potencialmente muito úteis para a introdução de genes exógenos capazes de expressar proteínas de interesse industrial (ver revisão de Debatov, 1982).

A introdução destes genes usando vetores apropriados é outro dos objetivos da investigação corrente em Bacillus.

Embora varias cepas deste gênero possuam DNA extracromossomal sob a forma de plasmídeos (Lovett & Branucci, 1975 e 1976; Le Hegarat & Agnostopoulos, 1977; Griczan, 1982) estes não são úteis na construção de vetores de clonagem porque não expressam marcas genéticas como resistência a antibióticos. Por essa razão são chamados plasmídeos "crípticos".

Na realidade, a maior parte dos vetores empregados para clonagem molecular em Bacillus são derivados de plasmídeos naturais de Staphylococcus aureus, que além de expressarem resistência a vários antibióticos, possuem origem de replicação que é reconhecida por Bacillus (Ehrlich, 1977; Griczan & Dubnau, 1978; Griczan et al., 1980). O conhecimento detalhado da estrutura e da biologia de vetores compatíveis com E. coli e B. subtilis, levou naturalmente a construção de derivados híbridos, isto é, plasmídeos "ponte" ou "shuttle" que podem ser empregados para clonagem nos dois tipos de bactérias. Estas novas construções além de facilitarem o próprio processo de clonagem em Bacillus permitiram que se estudasse a expressão de proteínas idênticas, em meios celulares, de microorganismos tão afastados filogeneticamente como o são E. coli e B. subtilis.

Os primeiros vetores "shuttle" foram obtidos por Ehrlich (1978) que recombinau "in vitro" fragmentos de pBR322 e pBR313 (Rodriguez et al, 1976, Bolivar et al, 1977) com o plasmídeo pC194 (Ehrlich, 1977), este último originário de Staphylococcus aureus. Destas manipulações, surgiu o vetor "shuttle" pHV33 (Rapoport et al, 1979), que é um revertente resistente a tetraciclina de peso molecular igual a 4.5Mdal (6.75kb). Os vetores ponte constituem normalmente uma ferramenta poderosa para a clonagem de genes em microorganismos diferentes de E. coli.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes.

1.1. Enzimas de Restrição.

Foram utilizadas enzimas procedentes de várias fontes: Bethesda Research Laboratories (USA); Boehringer Mannheim (W. Germany), Pharmacia: Molecular Biology Division (USA), Sigma Chemical Company (USA), New England Biolab (USA).

1.2. Percursor marcado com ^{32}P .

O (α ^{32}P) dATP utilizado foi obtido do laboratório do Prof. Dr. J.C.C. Maia do Instituto de Química da USP.

1.3. Meios de Cultura.

O agar bacteriológico bem como os nutrientes e outros componentes dos meios de cultura foram obtidos da Difco, da Cialgas, e em alguns casos, da Biobrás.

1.4. Outros reagentes.

Pronase e proteinase K (Boehringer Mannheim, W. Germany) DNase pancreática (Sigma ou Worthington), lisozima (Sigma), agarose (Seakem ou Sigma), RNase (Sigma), PEG (Sigma), e Sephadex (Pharmacia: Molecular Biology Division, USA).

Os demais sais, corantes e reagentes eram MERCK, J.T.Baker, QEEL, sempre em grau P.A.

1.5. Material de autorradiografia e fotografia.

Para a detecção de α ^{32}P incorporado em DNA empregaram-se filmes Sakura tipo QHS ou Kodak X-K1.

A documentação fotográfica foi executada empregando-se filmes Copex PaN A.H.U. tri 13 (35 mm x 30.5m) de 13-20 ASA e papel Kodak Kodabromide F.A. Os produtos químicos para revelação e fixação deste material foram obtidos da Kodak ou então da subsidiária brasileira da Agfa.

2. Condições de Cultura.

2.1. Para E. coli.

5g NaCl. 10g triptona e 5g de extrato de levedura em 1 litro de H_2O (Caldo LB). Quando o meio é sólido prepara-se a solução anterior contendo 1% de agar que, ainda quente após autoclavagem, é distribuído em placas de petri plásticas. A seleção de células resistentes a antibióticos é feita suplementando o meio líquido ou meio para placas na seguintes concentrações: 70 $\mu\text{g/ml}$ para ampicilina, 15 $\mu\text{g/ml}$ para tetraciclina, 10 $\mu\text{g/ml}$ para cloranfenicol e 50 $\mu\text{g/ml}$ para canamicina.

As células são normalmente crescidas em meio líquido até a fase estacionária à 37°C sob agitação constante.

2.2. Para B. stearothermophilus:

O meio que adaptamos no laboratório é composto de 10g Bacto triptona, 3g de extrato de carne, 0,25g de extrato de levedura, além dos seguintes componentes: 0,6g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4g de H_2PO_4 , 5,0g NaCl e 2,5g glicose e completa-se para 1 litro com água destilada. Quando o meio é sólido, adiciona-se agar até concentração final 1.5%. As células de B.

stearothermophilus são crescidas em meio líquido à 55°C sob agitação vigorosa e boa aeração até a fase estacionária.

2.3. Para B.subtilis.

Usamos rotineiramente os meios TBAB e PB.

O meio TBAB é composto de 10g de Bactotri-
ptose, 3g de Bacto Beef Extract e 4g de NaCl e H₂O qsp 1 litro.
Placas são preparadas pela adição ao meio líquido de agar até
concentração final de 1.5%.

O meio PB é composto de: 6g de peptona de
gelatina, 3g de extrato de levedura, 1.5g de extrato de carne e
H₂O qsp 1 litro. O meio sólido também é feito adicionando-se agar
para 1.5% de concentração final.

2.4. Meio mínimo para crescimento de E. coli (M9)

Este meio, descrito por Rodrigues e Tait
(1983) é composto de 100ml de uma mistura de sais 10x concentrada
(70gm de Na₂HPO₄, 30gm de KH₂PO₄, 5g NaCl, 10gm NH₄Cl e H₂O qsp
100ml), 20ml de glicose 20%, 10ml de CaCl₂, 01M, 10ml de MgSO₄
0.1M, e 860ml de H₂O. O meio é suplementado com aminoácidos
segundo a tabela abaixo:

Tabela para Suplementação com Aminoácidos

Amino-Ácido	Concentração Final ($\mu\text{g/ml}$)	Solução Estoque	Quantidade por Litro
L-alanina	75	1%	7.5 ml
L-arginina	145	2%	7.25 ml
L-asparagina	75	1%	7.5 ml
L-ácido aspártico	75	1%	7.5 ml
L-cisteína	50	2%	2.5 ml
L-histidina	42	2%	2.1 ml
L-ácido glutâmico	75	1%	7.5 ml
L-glutamina	75	1%	7.5 ml
glicina	110	2%	5.5 ml
L-isoleucina	42	1%	4.2 ml
L-leucina	41	1%	4.1 ml
L-lisina	75	1%	7.5 ml
L-methionina	25	2%	1.25 ml
L-fenilalanina	75	1%	7.5 ml
L-prolina	164	4%	4.1 ml
L-serina	42	2%	2.1 ml
DL-threonina	82	2%	4.1 ml
L-triptofano	18	0,25%	7.1 ml
L-tirosina	75	1%	7.5 ml
L-valina	42	1%	4.2 ml
Vitamina B1, (tiamina HCl)	166	0,1%	0,166ml

2.5. Meio DM3 para regeneração da parede de protoplastos de B. subtilis (Chang & Cohen, 1979).

200ml de agar 1%, 500ml de succinato de sódio 1M 100ml de casoaminoácidos 5%, 50ml de extrato de levedura 10%, 100ml de K_2HPO_4 3.5%; 25ml de glicose 20%, 20ml de NaCl_2 1M e 5ml de soroalbumina bovina 2%.

3. Cêpas bacterianas empregadas.

Neste trabalho empregaram diferentes cêpas d'os microorganismos estudados: E. coli DH1 (Hanahan, 1983) e Hb 101 (Bayer e Boulland-Dussoix, 1969), B. subtilis IA 289, BD 170, IA 293, IA 412, IA 501, (BG5C, cedidas por Dr. Claudio Denoya, Pfizer, Connecticut) BD 224 e BD 241 cedidas pelo Dr. Issar Smith (The Public Research Institute Of The City Of New York, Inc) e B. stearothermophilus NCBI 8924 Bst 1507 cedidas pelo Dr. Cornelis Hollemberg do Depto de Microbiologia da Universidade de Dusseldorf e ATCC 31195 (Mielenz, 1983).

4. Vetores de clonagem.

4.1. Vetores para clonagem em E. coli.

Os plasmídeos usados foram pBR322 (Bolivar et al 1977), pBR 327 (Soberon et al, 1980) e pBR 325 (Keggins et al. 1978).

4.2. Vetores para clonagem em B. subtilis

Os plasmídeos usados foram pUB 110 (Jalanko et al 1981), pC 194 (Ehrlich, 1977; Horinouchi e Weisblum, 1982) e pHV 33 (Ehrlich, 1978), pBU271 (este trabalho).

5. Eletroforese em gel de agarose.

Pesa-se agarose de baixa endosmose, suficiente para preparar um gel de 0.8 a 1%. Juntamente com a agarose é adicionada quantidade suficiente de tampão 10x concentrado tris acetato-EDTA (TAE) para que no gel fique 1x concentrado.

A suspensão é liquefeita em forno de micro-ondas e após um certo período de esfriamento, adiciona-se brometo de etídeo 10mg/ml até a concentração final de 0,5µg/ml.

Ao mesmo tempo prepara-se um molde sobre o qual será formado o gel. Isto é feito tomando-se uma placa de vidro comum cujas dimensões podem ser ajustadas por corte, conforme as necessidades da experiência. Circunda-se com fita crepe todo o perímetro da placa de vidro de forma que a fita fique acima e abaixo da superfície da placa. A porção que sobressai por baixo é firmemente colada à superfície inferior da placa ao longo de todo o perímetro. A porção da fita que sobressai na superfície superior formará o molde para dar forma ao gel. Antes de despejar a agarose, coloca-se um pouco acima da superfície do vidro, um pente de acrílico que formará as fendas nas quais se colocará a solução contendo o DNA a ser analisado. Uma vez ajustada a posição do pente, adiciona-se vagarosamente a agarose fundida até que ela atinja suficiente altura no molde. Deixa-se solidificar e remove-se então a fita crepe que envolve a placa de vidro. O conjunto gel/placa é mergulhado num tanque de eletroforese que possui uma plataforma para sustentar a placa. Cobre-se o gel com uma solução tampão TAE 1x até que a altura do líquido sobre a placa seja 1-2mm.

As soluções originais de DNA são misturadas na proporção 1:6 com um tampão para eletroforese em gel de agarose (vide apêndice). Aplica-se então em cada uma das fendas as amostras de DNA que devem ser analisadas. Aplica-se às extremidades do gel voltagem que produza intensidade de corrente de 100-150 mA até que o corante tenha percorrido 4/5 do comprimento do gel. Feito isto, o DNA separado é visualizado e fotografado sobre um transiluminador com filtro de quartzo e fonte de UV curto (250-260 nm).*

Em experimentos que requeriam purificação de fragmentos de DNA, empregou-se agarose de baixo ponto de fusão para confeccionar géis de 1 à 1.2%. As condições de preparo e de eletroforese destes géis são iguais as acima descritas, mantendo-se o gel em repouso durante 2-3h antes do uso.

6. Eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida.

A técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida consiste essencialmente em fazer passar uma amostra proteica pré-tratada para assegurar a análise de unidade monoméricas, por um sistema descontínuo com relação ao tamanho do poro e ao pH. As condições são tais que a separação ocorre unicamente em função do peso molecular das proteínas estudadas.

O sistema consiste em 2 géis, um de empilhamento com poro grande (baixa concentração de acrilamida) e outro de separação com poro menor (alta concentração de acrilamida). O procedimento empregado aqui é essencialmente o descrito em detalhes por Laemli (1970).

a- Preparação dos géis de separação e empilhamento.

Normalmente os géis de separação contêm acrilamida para uma concentração final de 10% e são preparados como se descreve a seguir:

A solução de gel de acrilamida (vide apêndice) é cuidadosamente despejada num molde constituído por placas de vidro de dimensões apropriadas (10X15cm) separadas por placas espaçadoras de material acrílico com 1mm de espessura. O molde foi previamente selado com agar para impedir o extravazamento da solução. Esta é despejada até que atinja a altura de aproximadamente 10cm a partir da base. Em seguida, deposita-se cuidadosamente com a ajuda de uma bomba peristáltica, uma camada de 1-2cm de solução SDS 1% sobre a solução a ser polimerizada. Isto assegura que a superfície do gel após a polimerização seja perfeitamente plana e horizontal. A temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) o endurecimento do gel de poliacrilamida 10% ocorre em aproximadamente 1h.

Uma vez preparado o gel de separação, a camada de água com detergente é retirada e a superfície lavada com 0.2ml da solução do gel de empilhamento (vide apêndice) sem TEMED. Insere-se, então, no topo do molde um pente de acrílico que determinará o número de fendas e de amostras que serão analisadas.

Com cuidado despeja-se no molde e em torno do pente a solução do gel de empilhamento.

Após a polimerização o pente e os espaçadores são removidos com todo cuidado e as placas contendo o gel são sustentadas por uma parede de acrílico ligada pela parte superior e inferior aos reservatórios de tampão de corrida (vide apêndice).

b- Tratamento das amostras e eletrofore.

Antes de serem colocadas no gel, as amostras proteicas são dissolvidas durante 1h à 50°C ou por 5 minutos à 96°C num tampão de amostras para gel de poliacrilamida (vide apêndice), na proporção de 1mg de proteína para 1ml de solução.

O material assim tratado é depositado em fendas individuais no gel de empilhamento já mergulhado no tampão. Conectam-se os eletrodos da cuba à fonte e ajusta-se a corrente para 30mA até que o corante ultrapasse o gel de empilhamento, quando ela é aumentada até 50mA e mantida assim até o final. Interrompe-se a eletroforese quando o corante tiver chegado ao fim do gel de separação.

As proteínas juntamente com o corante, correm em direção ao pólo positivo.

c- Tratamento dos géis.

Após a corrida, as proteínas separadas durante a eletroforese devem ser fixadas para evitar difusão e em seguida coradas para revelar a posição dos diversos componentes. Para tanto o gel é removido do molde e mergulhado em 100ml de TCA 10% durante 1 hora a 4°C. Em seguida o gel é lavado 3x com a água destilada e corado durante a noite à temperatura ambiente com a solução de coloração previamente filtrada.(vide apêndice).

Finalmente o gel é descorado durante o tempo conveniente com uma solução de descoloração. (vide apêndice).

7. Transferência de DNA separado em géis de agarose para filtros de nitrocelulose (Southern, 1975).

Primeiramente o gel de agarose é tratado com uma solução de HCl 0.25N por 15 minutos. Este tempo é suficiente para que ocorra depurinização do DNA.

Em seguida, o gel é transferido para outro recipiente contendo NaOH 0.5M/NaCl 1.5M durante 30 minutos para a denaturar o DNA.

O gel é então neutralizado mergulhando-o durante 1 hora numa solução de acetato de amônio 1M/NaOH 0.02M. Em seguida transfere-se o DNA da agarose para a nitrocelulose. Para isto, coloca-se sobre o gel em sequencia e previamente embebidos numa solução de SSC 2x, um fragmento de nitrocelulose (Schleicher & Schüll BA 85 Ø=0.45m) e dois fragmentos de papel Whatman 3MM que têm as mesmas dimensões do gel. A cada lado deste coloca-se uma tira de idêntica altura, feita em plástico ou vidro. Para manter o fluxo de líquido através do gel da nitrocelulose, coloca-se sobre o conjunto descrito uma pilha de papel toalha de 10-15cm de altura compactada com um peso de aproximadamente 250g. O processo de transferência dura de 12-16h à temperatura ambiente. Após este tempo o filtro de nitrocelulose é cuidadosamente retirado e seco a 80°C durante 3 horas.

8- Fixação de DNA denaturado em filtro de nitrocelulose.

A técnica empregada aqui é essencialmente a descrita por Kafatos et al (1979).

Aliquotas de 25µl de solução aquosa de DNA (80 µg/ml) são aquecidas à 96°C durante 10 minutos e imediatamente resfriados no gelo. Adiciona-se então acetato de amônio 2M até concentração final 1M. A solução de DNA denaturado é aspirado com o auxílio de uma bomba peristáltica Gilson em fluxo lento (aproximadamente posição 10 no controle de fluxo) ligada a uma micropipeta capilar marca Brand de 50 µl e ponta de diâmetro igual a aproximadamente 2mm. A solução é dispensada num filtro de nitrocelulose previamente embebido em acetato de amônio 1M e

colocado sobre 3 ou mais camadas de papel Whatman 3MM cuja função é manter, por capilaridade, o fluxo da solução através da nitrocelulose. A operação de dispensa com a bomba peristáltica deve durar de 1.5 a 2 minutos para assegurar a adsorção do DNA denaturado.

9. Radiomarcagem do DNA com ^{32}P .

Os DNAs de plasmídeos foram marcados pelo método de "nick-translation" (Rigby et al 1977).

A reação é feita em 20 μl finais e a solução é composta por: 4 μl de uma mistura de desoxiribonucleotídeos com exceção do precursor marcado cada um na concentração de 66.6 μM , 2 μl de NTB10x (ver apêndice), 1 μl de dATP 50 μM , DNA (0.5 μg a 1 μg), 1 μl de DNase 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 μl de ($\alpha^{32}\text{P}$) dATP com 20 à 50 μCi , 1 μl de DNA polimerase 2.5 $\text{u}/\mu\text{l}$ e H_2O qsp 20 μl .

A mistura é mantida 14-15°C durante 90 minutos.

Após este tempo, determina-se a radioatividade específica do DNA marcado e elimina-se o precursor marcado que não reagiu, por filtração em coluna de Sephadex G-50.

10. Determinação da atividade específica de DNA marcado por "nick translation". (Maniatis et al, 1982)

Uma aliquota de 1 μl de mistura de "nick translation" é misturada com 89 μl de H_2O e 10 μl de DNA de esperma de salmão 5 mg/ml .

Destes, 10 μl são colocados diretamente sobre o papel de filtro comum, o restante é precipitado com 100 μl de TCA 10%. A solução é deixada em gelo 10 minutos e filtrada a vácuo num disco de fibra de vidro Whatman GFA 2.4cm de diâmetro. O disco é lavado 1 vez com pirofosfato de sódio 10% ou TCA 10% e 1 vez com etanol 90%.

Tanto o filtro de fibra de vidro como o de papel de filtro são secos durante 15 minutos à 80°C - 90°C,

resfriados e colocados em 5ml de uma solução de cintilação composta de 5g de PPO, 0.5g de POPOP e tolueno qsp 1 litro. A radioatividade é determinada num espectrometro de cintilação líquida Beckman LS 7.000, empregando-se um programa para detecção de ^{32}P .

11. Cromatografia em coluna de Sephadex G-50.

A mistura de "nick translation" são adicionados 8 μl de DNA de esperma de salmão 10mg/ml e 8 μl de detergente Sarkosil NL-97 10% (Ciba-Geigy).

A nova solução é colocada no topo de uma coluna de Sephadex G-50 (8 cm x 0,5cm) preparado em 0.1 x de SSC, coletando-se fração de 0.5ml diluído com 0,1 x de SSC, ao mesmo tempo em que se coloca 0.5ml de 0.1 x SSC no topo da coluna.

A radioatividade das frações é determinada diretamente (radiação de Cerenkov) o DNA marcado é excluído como um pico discreto nas 4 primeiras frações.

12. Hibridização de DNA previamente imobilizado em filtros de nitrocelulose.

Este procedimento se baseia no protocolo descrito por Maniatis et al (1982).

Ele consiste em pré-hibridização do filtro de nitro celulose com DNA denaturado num fluido composto de solução Denhardt 5 x, 5 x SSC, 0.1% SDS e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmão 10mg/ml previamente fragmentado por sonicação e denaturado por calor (ver apêndice).

O conjunto é colocado dentro de um envelope de polietileno transparente, do qual se retira todo o ar por leve compressão. O envelope é então selado por calor e deixado em banho de água a 68°C durante 4h. Após este tempo, retira-se o envelope do banho, remove-se a solução de pré-hibridização, que é então substituída pela de hibridização. Esta é composta de solução Denhardt 5x, SSC 6x, SDS 5%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de DNA de esperma de

salmão 10µg/ml sonificado e denaturado, além da sonda de DNA marcada com ^{32}P , (aproximadamente 10^6 cpm) denaturada por calor (5' em água fervente, a 96°C).

A quantidade de solução de hibridização deve ser suficiente para manter o filtro coberto por uma fina película líquida (aproximadamente 70µl/cm² de filtro). Sela-se novamente o envelope plástico tendo o cuidado de remover todo o ar por compressão, mergulhando-o então em banho de água à 68°C, ou em estufa durante 16 h.

Terminada a hibridização o filtro é removido do envelope e lavado com solução 2xSSC/SDS 0.5% à temperatura ambiente durante 10' e em seguida durante 1 hora com 2xSSC/SDS 0,1%, à mesma temperatura. Esta solução é então substituída por outra contendo 0,2xSSC/SDS 0.5% e o filtro lavado primeiro por 2 horas à 65°C, continuando por outros 30' na mesma temperatura, após renovar solução.

Os filtros são secos à temperatura ambiente e cobertos com um filme sensível a Raios X.

O conjunto filtro/filme é colocado entre 2 telas intensificadoras e exposto à -85°C pelo tempo apropriado para gerar uma imagem autorradiográfica.

13. Extração de DNA.

13.1. Preparação do DNA de plasmídeos de B. stearothermophilus

O procedimento que deu melhores resultados é derivado daquele descrito por Mielenz, (1983) e que é descrito à seguir. Terminado o crescimento as células de B. sterothermophilus são centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e ressuspensas em um tampão contendo sacarose 12.5%, Tris HCl 25mM pH 8.0 ao qual se adiciona lisozina até concentração de 2mg/ml. A suspensão é mantida durante 1 hora no gelo. Após este tempo a suspensão é colocada à temperatura ambiente e se adiciona EDTA até 150mM, 0.5 V de BRIJ 35 5% e desoxicolato de sódio até 1.2% além de 0.25 V de tampão T.E. (vide apêndice).

Após lise completa das células, o plasmídeo é purificado em gradientes de CsCl como se descreve a seguir:

Centrifugação em gradiente de CsCl.

12.5g de CsCl são dissolvidos em 12.5ml de suspensão de DNA. Tomam-se 11.5ml desta solução e adicionam-se 0.92ml de Brometo de Etídio (EtBr) 10mg/ml homogeneizando-se bem. A centrifugação é feita em rotor Beckmann SW 41 a 20°C 35 Krpm durante 36 horas. A banda de plasmídeo é visualizada usando-se uma lâmpada de UV longo e é recuperada por punção do tubo. Em seguida o plasmídeo é repurificado por uma nova centrifugação em CsCl nas condições descritas.

Após a segunda recuperação de DNA de plasmídeos remove-se o EtBr através de várias extrações com 1 volume de álcool isoamílico. A solução é então dializada 3 vezes contra 2 litros de tampão T.E. (vide apêndice) que são renovados a cada 2 h.

O DNA é precipitado pela adição de 2.5 volumes de Etanol PA absoluto e NaCl 5M até a concentração final 0.15M. A suspensão é mantida a -20° C durante 24 horas.

13.2. Preparação de DNA de plasmídeos de células de E.coli.

O DNA de plasmídeo foi preparado empregando 2 procedimentos que diferem essencialmente pela maneira de lisar as células. No primeiro deles a lise é completada por tratamento com NaOH e no segundo por fervura em presença de detergente.

13.2.1. Lise alcalina (Birboim e Doly, 1979).

Este método pode ser adaptado tanto por pequenos (2-5ml) como para volumes relativamente grandes (200-500ml) de cultura de células, bastando para isso corrigir o volume de soluções de trabalho.

Para uma preparação típica em menor escala crescem-se células em 2ml em meio suplementado pelo antibiótico requerido até a fase estacionária a 37°C com agitação constante.

As células são coletadas por centrifugação em um tubo eppendorf, durante 5 minutos em minicentrífuga e o precipitado ressuspendido em 100µl de tampão recém-preparado de glicose 50mM; EDTA 10mM; Tris HCL 25mM pH 8.0 contendo lisozima 2mg/ml. As células são mantidas nesta solução durante 5 minutos à temperatura ambiente, após o que, se adicionam 200µl de NaOH 0.2N contendo SDS 1%. Homogeniza-se por inversão repetida do tubo, o qual é mantido por outros 5 minutos no gelo.

Em seguida adicionam-se 150µl de um tampão acetato de potássio 3M pH 5.0, e novamente mantém-se a suspensão em gelo durante 10 minutos. O precipitado que contém DNA cromossomal de alto peso molecular e proteínas é removido por centrifugação durante 10 minutos em microcentrífuga e o sobrenadante transferido para outro tubo de eppendorf onde se efetua, uma extração com 1 volume de fenol saturado com tampão Tris HCL 10mM pH 7.5, outra com 1 volume de fenol clorofórmio 1:1 e finalmente outra com 1 volume de clorofórmio.

A fase aquosa resultante se adiciona NaCl 5M até concentração final de 0.1M e 2 volumes de etanol absoluto. Deixa-se precipitando o DNA à -85°C durante 15 minutos ou -20°C por uma hora. Centrifuga-se em minicentrífuga (10.000 rpm) durante 20 minutos à 4°C e ressuspende-se o precipitado em tampão TE (vide apêndice).

13.2.2. Lise por ebulição.

Centrifuga-se como já foi descrito antes, as células de 3ml de cultura crescida até a fase estacionária. O precipitado é ressuspendido em 400µl de tampão de fervura (sacarose 8%; triton X-100 0.5M; EDTA, 50mM, Tris HCL 10mM pH 8.0). Adiciona-se, em seguida 50 µl do mesmo tampão contendo lisozima 10mg/ml. Mistura-se por inversão repetida do tubo o qual é mantido durante 10 minutos à temperatura ambiente. Adiciona-se em seguida 200µl do mesmo tampão, transferindo-se o tubo para um becker contendo água fervente onde é deixado por 1 minuto.

O precipitado que se forma depois deste tratamento é facilmente removido com um palito de dentes após centrifugação em minicentrífuga. Adiciona-se finalmente acetato de

sódio 3M pH 5.0 até concentração final de 0.3M, e 1 volume de isopropanol. Mistura-se por inversão repetida e precipita-se à -85°C durante 20 minutos. Recupera-se o precipitado por centrifugação em minicentrífuga à 4°C durante 15-20 minutos. Seca-se o tubo e ressuspende-se o precipitado em 50 µl de tampão TE (vide apêndice).

13.3. Extração de DNA cromossomal de Bacillus subtilis (Gryczan e Dubnau, 1978).

Crescem-se 200ml de cultura até a fase estacionária e lava-se as células com 100ml de tampão contendo NaCl 0.1M; EDTA 0.001 M, tris HCl 0.005 pH 7.4. Ressuspende-se em 10ml da mesma solução e adiciona-se lisozima até 1mg/ml. Deixa-se a 37°C por 30 minutos. Após este período adiciona-se nesta ordem: 2.4ml NaCl 5M, 0.6ml EDTA 0.5 pH 8.0, 12.5ml de SDS 2% em NaCl 0.7M. Homogeniza-se, e acrescenta-se proteinase K até concentração final 0.1mg/ml e mantém-se à 37°C durante a noite.

Após este tratamento, precipita-se com etanol absoluto (2.5 volumes) e NaCl até concentração final 0.1M e mantém-se a suspensão à -20°C durante a noite. O DNA precipitado é enrolado em bastão e lavado uma vez com Etanol 70%.

Após sua secagem, o DNA é dissolvido (ressuspender) em tampão T.E. (ver apêndice), tratado com RNase na concentração final de 50µg/ml durante 1 hora à 37°C.

A solução de DNA é desproteinizada por tratamento com igual volume de fenol saturado com uma solução de tris HCl 0.1M pH 9.0 contendo EDTA 0.005M, Sarkosil 1% e SDS 1%.

O DNA é reprecipitado como já se descreveu e recuperado por centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos à 4°C. Finalmente ressuspensão no menor volume de tampão T.E (vide apêndice).

13. 4. Obtenção de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão.

Terminada a eletroforese a banda cujo o DNA deve ser isolado é removida do gel com auxílio de uma pequena espátula e da iluminação com lâmpada de UV longo (320 nm). O fragmento de agarose é colocado num tubo eppendorff (1.5 ml) onde é fundido a 56°C. Adiciona-se então, dois volumes de tampão EDTA 0.5M; tris-HCl 0.05M pH 8.0. A agarose é removida pelo tratamento com um volume de fenol saturado com tris-HCl pH 7.5, um volume de fenol-clorofórmio (1:1) e um volume de clorofórmio.

Adiciona-se acetato de sódio 3M pH 7.0 até concentração 0.3M ou NaCl 5M até concentração 0.5M e precipita-se com 3 volumes de etanol absoluto à -20°C durante 12 horas.

O precipitado é recuperado por centrifugação em minicentrífuga e ressuspenso no menor volume tampão T.E. (vide apêndice)

14. Clivagem do DNA de plasmídeo com múltiplas enzimas de restrição.

Cada enzima possui um conjunto de condições para ótimo de reação. As variáveis principais são a temperatura de incubação e a composição do tampão. O requerimento de temperatura é normalmente estrito mas as diferenças entre os tampões podem ser razoáveis. Este último fato facilita o trabalho com enzimas de restrição pois não é necessário usar um tampão para cada uma delas. Na realidade os tampões são preparados observando-se que as enzimas de restrição podem ser classificadas em 3 grupos com relação à força iônica do meio em que atuam: as que trabalham melhor em alta força iônica, em média força iônica e em baixa força iônica. Seguindo este esquema é necessário preparar somente 3 tampões. Normalmente estes são preparados como soluções estoques dez vezes concentradas que podem ser guardadas a -20°C por aproximadamente 6 meses. A tabela abaixo resume o que foi dito.

Tampões para digestão com enzimas de restrição.

Força iônica	NaCl	tris-HCl (pH,7.5)	MgCl ₂	Ditiotreitol (DTT)
Baixa	0	10 mM	10 mM	1 mM
Média	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Alta	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Tipicamente as reações são feitas em volumes de 20 µl contendo 1 a 5 µg de DNA a ser restringido.

Primeiramente se dissolve o DNA em 18µl de H₂O ou T.E. em um tubo de eppendorf e em seguida se adicionam 2µl do tampão apropriado 10x concentrado, uma unidade de enzima de restrição (a quantidade de enzima necessária para digerir totalmente 1µg de DNA em 1 hora no tampão e temperatura recomendada).

Para finalizar a reação adiciona-se EDTA 0.5M pH 7.5 até concentração 10mM ou aquece-se a mistura de reação à 68°C durante 10 minutos.

Para analisar o DNA imediatamente após a digestão adiciona-se 6µl de um tampão de eletroforese de agarose (ver apêndice), agita-se brevemente e colocar-se a mistura na fenda escolhida do gel de agarose. Entretanto em alguns experimentos é necessário realizar em sequência digestão com mais de uma enzima. Isto é feito iniciando o procedimento com a enzima que trabalha em menor força iônica e terminando a reação por aquecimento. Em seguida, adiciona a quantidade de sal apropriada e depois a segunda enzima, continuando-se a incubação.

15. Tratamento do DNA com fosfatase alcalina de intestino de bezerro.

O tratamento feito é igual ao descrito por Maniattis et al (1982).

Após a digestão do DNA com a enzima de restrição desejada, extrai-se uma vez com fenol-clorofórmio e precipita-se com 2 volumes de etanol absoluto e NaCl para concentração final 0.1M.

Dissolve-se o DNA no mínimo volume de tris HCl 10mM pH 8.0 e adiciona-se 5µl de tampão CIP 10 x concentrado (ver apêndice).

Adiciona-se fosfatase nas condições necessárias para que haja a defosforilação do extremo 5' do DNA (0.01 unidades da enzima são necessárias para remover os fosfatos terminais de 1 pmol de terminais 5' de DNA).

Se a enzima de restrição usada anteriormente produziu terminais 5' recessos ou "extremidades cegas" incuba-se durante 15 minutos à 37°C e 15 à 56°C. Em seguida adiciona-se uma segunda aliquota de fosfatase e repetem-se as incubações nas 2 temperatura citadas.

Se o extremo deixado pela enzima for protuberante, incuba-se à 37°C por 30 minutos, adiciona-se uma segunda aliquota de fosfatase e continua-se a incubação por outros 30 minutos. A reação é terminada pela adição de 40µl de H₂O, 10µl de tampão 10x STE (ver apêndice) e 5µl de SDS 10%, colocando o conjunto por 15' a 68°C.

Após este processo são feitas 2 extrações com 1 volume de mistura fenol-clorofórmio 1:1 e 2 extrações com clorofórmio.

O DNA é precipitado adicionando-se NaCl para concentração final 0.1M e 2 volumes de etanol absoluto à temperatura de -20°C por 12 horas ou -85°C por 15 minutos.

Após este período o DNA é centrifugado em minicentrífuga à 4°C por 10' e ressuspenso em tampão T.E. (vide apêndice).

16. Condições de ligação de DNA (Dugaiczky et al, 1975).

Os DNAs a ser ligados são desproteinizados por 2 tratamentos com 1 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e com 1 volume de clorofórmio.

O DNA é precipitado pela adição de NaCl até concentração final de 0.1M e de 2 volumes etanol absoluto a -85°C durante 15 minutos.

Centrifuga-se em minicentrífuga à 4°C por aproximadamente 10 minutos e ressuspende-se em tampão T.E. (vide apêndice).

Os DNA lineares na proporção desejada, são adicionados a um tampão tris HCl 66mM pH 7,6 MgCl₂ 6.6mM; DTT 10mM, ATP 0.5mM e 1 a 5 unidades de T₄ DNA ligase.

A reação de ligação desenvolve à 14°C por aproximadamente 12 horas.

17. Preparação de protoplastos de B. subtilis.

O procedimento descrito a seguir é o empregado por Chang e Cohen 1979. Em nosso caso empregamos a cepa de B. subtilis IA289 que possui uma deleção no gene Amy E e portanto não é amilolítica. As células de cultura na metade da fase logarítmica (1.2×10^8 unidades formadoras de colônias) crescidas à 37°C em caldo PB 4X concentrado foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 1/10 do volume inicial em solução SMMP (vide apêndice). Adiciona-se lisozima até concentração final 2mg/ml e incuba-se a suspensão a 37°C durante duas horas com agitação suave. Os protoplastos são centrifugados em rotor Sorvall, HB-4 durante 15 minutos a 2000 rpm e lavados uma vez por ressuspensão em SMMP, novamente centrifugados e finalmente resuspensos em 1/15 do volume inicial da cultura pela adição de SMMP. Esta preparação é estável à temperatura ambiente durante uma 5 horas.

17. 1. Transformação de protoplastos.

De 1pg a 5 µg de DNA de plasmídeos em até 50 µl de tampão T.E. são misturados com igual volume de solução SMM 2X (vide apêndice) em um tubo de cultura estéril. Adiciona-se então 0.5ml suspensão de protoplastos e em seguida, 1,5ml de polietileno glicol (PEG) 40% v/v (solução PEG 40% contém 40g de

PEG de peso molecular 6000 e 50ml de tampão SMM 2X em volume final de 100ml) misturando-se suavemente o conteúdo do tubo. Após 2 minutos de exposição ao PEG, adiciona-se 5ml de meio SMMP e recuperam-se os protoplastos por centrifugação durante 10 minutos à 2600Xg. O material é ressuspensão em 1ml de SMMP e incubado à 30°C durante 1:30 horas em banho-maria com agitação lenta, para permitir a expressão fenotípica dos determinantes genéticos carregados pelo plasmídeos transformantes. Alternativamente, amostras de diluição apropriada dos protoplastos, preparados como acima, são plaqueados em meio DM3 sem seleção. Após a regeneração da parede, os transformantes são identificados por plaqueamento das células sobre meios seletivos ou plaqueia-se a mistura de transformação diretamente em meio seletivo (DM3 com antibiótico). Em ambos os casos a determinação da frequência de transformantes é feita após a incubação das placas à 37°C durante 2 dias.

18. Preparação das células competentes de B. subtilis. (Método descrito por Dubnau 1973)

Toma-se um alçada de células de B. subtilis, que são dispersas em 30ml de meio SPIZ I (vide apêndice) num erlenmeyer de 125ml. Agita-se aproximadamente 12 horas à 30°C. Após este tempo, adicionam-se 5ml desta cultura a outros 45ml de meio SPIZ I.

Agita-se fortemente à 37°C. Três horas após o início da incubação começa-se a medir a turbidez do meio em 650nm a cada 20 minutos. Quando o crescimento estiver próximo da fase estacionária ($OD_{650} = 0.6$ à 0.7), adiciona-se aos 50ml desta cultura, 450ml de meio SPIZ II em um frasco de 2.000ml. Agita-se então durante 90 minutos à 37°C com velocidade moderada e transfere-se para garrafas de polipropileno de 250 ml, em gelo. As células são centrifugadas à 6.000XG durante 10 minutos à 4°C. Usam-se 45ml do sobrenadante para ressuspender as células e adicionam-se 5 ml de glicerol estéril. Homogeniza-se bem, distribui-se o conteúdo em tubos de eppendorf, que são congelados em banho de etanol- CO_2 sólido e estoca-se à -85°C.

18.1. Transformação de células competentes de B. subtilis.

Para dar início ao processo, as células estocadas à -85°C são descongeladas num banho de gelo, e adiciona-se um volume de SPIZ II- EGTA (vide apêndice). Desta suspensão, retiram-se 0.3ml e acrescenta-se 1 a 5µg de DNA de plasmídeos.

A suspensão é incubada à 37°C por 30 minutos com agitação suave e em tubo que permite boa aeração.

Em placas contendo 10ml de meio TBAB, plaqueia-se um alíquota da transformação resuspendida em 5ml de TBAB em soft agar (0.8% de agar).

As placas são invertidas e incubadas por 20 minutos à 32°C - 34°C.

Após este período acrescentam-se outros 5ml de TBAB-soft agar contendo o antibiótico em concentração 4 vezes maior que a normalmente usada ou alternativamente plaqueia-se diretamente alíquotas em placas com TBAB + antibiótico em igual concentração, com a ajuda de uma alça de vidro. Incuba-se por 12 h a 37°C ou 48h a 32°C.

19. Transformação de E. coli.

Este método se baseia no original descrito por Mandel & Higa (1970), que consiste em permeabilizar a parede bacteriana com íons Ca^{+2} para facilitar a entrada de DNA. Na forma em que ele foi empregado, deve fornecer de 10^5 a 10^7 transformantes por micrograma de DNA intacto de pBR322 quando a cepa transformada é E. coli HB 101.

Em resumo, 100ml de caldo LB contidos em um erlenmeyer de 500ml são inoculados com 1ml de uma pré-cultura fresca de E. coli HB 101 crescida até a fase estacionária. A cultura é crescida sob agitação vigorosa à 37°C até que a DO_{550} seja igual à 0.5 (3-4 horas). A cultura é então resfriada em gelo durante 10 minutos após os quais as células são recuperadas por centrifugação a 4000Xg durante 5 minutos à 4°C.

Após ressuspender as células em metade do volume original em solução estéril e gelada de 50mM $CaCl_2$ /10mM

Tris HCl pH 8.0 deixa-se em gelo por 15 minutos e centrifuga-se à 4000Xg por 5 minutos à 4°C.

Ressuspende-se as células em 1/15 do volume original em solução estéril gelada de 50mM CaCl₂/10mM Tris HCl pH 8.0, alíquota-se em frações de 0.2ml e deixa-se em geladeira (4°C) por no máximo 24 horas.

Toma-se 0.2ml de células permeabilizadas e adiciona-se DNA de 40 à 1.000ng/transformação, dissolvido em tampão T:E: (ver apêndice).

A suspensão é mantida no gelo durante 30 minutos. Transfere-se para um banho-maria à 42°C durante 2 minutos, e adiciona-se 1 ml de meio LB. Permite-se a expressão da resistência ao antibiótico por 1 hora à 37°C se este for ampicilina e 30' à 37°C para tetraciclina. Após este período, plaqueia-se na quantidade desejada.

20. Curvas de crescimento de E. coli USP 205, E. coli USP 13191 E. coli USP 33.2.

Inicialmente, faz-se um pré-inóculo em 5ml de meio LB, contendo ampicilina 70mg/ml, com uma única colônia de E. coli. As células são colocadas para crescer durante uma noite, sob agitação à 37°C. Em seguida, usam-se 2ml desta cultura para inocular 200ml de meio LB, que são agitados a 200 rpm em um frasco erlenmeyer 500 ml à 37°C. A concentração de ampicilina é a mesma do préinóculo. A cada meia hora, toma-se amostras para determinar a densidade óptica à 650nm da cultura e para a determinação de atividade amilolítica.

21. Determinação da atividade amilolítica.

21.1. Determinação da atividade amilolítica em sobrenadantes de culturas.

Terminando o crescimento das culturas de E. coli estas foram aquecidas durante 2 horas à 60°C e em seguida as

células sedimentadas por centrifugação à 4000 x g durante 6 minutos em rotor SS 34 de centrifuga Sorvall RC 2B. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade amilolítica segundo o procedimento de Wilson & Ingledew (1982) que consiste no seguinte: como substrato emprega-se um hidrolizado de amido à 0.2% previamente solubilizado em água quente, em forno de microondas e em seguida resfriado até 45-50°C. O reagente de iodo empregado para detectar ação amilolítica é preparado imediatamente antes de seu uso diluindo 1ml de lugol (vide apêndice) em 500ml de água contendo 5ml de HCl 5N. Para o ensaio, toma-se uma aliquota apropriada do sobrenadante e completa-se com H₂O o volume para 1ml em um tubo de ensaio 16 x 150mm. Adicionam-se então 2ml de solução 0.2% de amido solúvel e incuba-se o tubo à temperatura conveniente durante 10 minutos. Paralelamente é feito um controle que em vez de enzima contém 1ml de água. A reação é terminada tomando 0.2ml de cada tubo e adicionando-se a 5ml do reagente de iodo. Após 10 minutos de desenvolvimento de cor, mede-se a absorbância a 620nm empregando como branco 5ml de reagente de iodo mais 0,2ml de água. A atividade amilolítica em unidade por ml é calculada a partir das absorbâncias empregando a seguinte relação:

$$A = (C - A_m) / CX40 D \quad \text{unidades /ml}^*$$

onde C: absorbância 620nm do tubo controle

A_m: absorbância 620 nm do tubo amostra

D: fator de diluição de enzima

40: produto do tempo de reação (10 min.) pela quantidade de amido em cada tubo (4mg)

* define-se uma unidade de α-Amilase como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 0,1mg de amido em 10 minutos à temperatura ótima da enzima quando em presença de 4mg de amido solúvel. (Wilson & Ingledew, 1982).

21.2. Método de detecção de colônias amilolíticas em placas.

Para o estudo de atividade amilolítica de colônias em placas foi empregada uma substância cromogênica, o Cibachron Brilliant Blue FR (CBB), que é ligado covalentemente ao amido por uma substituição nucleofílica na hidroxila primária do carbono 6 dos resíduos de glicose.

Esta modificação aparentemente não altera a especificidade de enzima amilolítica pela ligação glicosídica 1-0-4 que une as glicoses do amido, embora deve alterar o Km da α -amilase.

As placas são feitas em meio LB com 1.5% de agar e 1% do amido-CBB.

As colônias, são passadas para estas placas com o auxílio de palitos de dente estéreis e as mesmas colocadas em estufa a 37°C por 2 horas (tempo necessário para que as colônias comecem a crescer e a produzir α -amilase).

Após esse tempo a placa é colocada à 60°C aproximadamente 1 hora, quando a enzima parece ser liberada para o exterior e hidroliza a ligação glicosídica do complexo-corante.

Aparentemente os produtos de hidrólise se difundem rapidamente deixando ao redor da colônia num halo incolor limitado por um círculo azul escuro.

O procedimento é em si mais simples e sensível do que os descritos na literatura.

21.3. Determinação da atividade amilolítica em géis de poliacrilamida.

Terminada a separação de proteínas em poliacrilamida da forma já descrita, o gel é imerso durante a noite à temperatura ambiente, numa solução 40mM Tris-HCl pH= 7.0 contendo soro albumina bovina 10 μ g/ml. Transfere-se então o gel para outra solução de amido 0.5% em CaCl_2 1mM na qual é incubado durante 1 hora à 50°C, e em seguida lavado uma vez com H_2O destilada e corado com solução de lugol para revelar a banda de proteína que possui atividade amilolítica.

21.4. Determinação da atividade amilolítica em géis de poliacrilamida pelo método do agar-corante.

Após a eletroforese das proteínas, o gel de acrilamida é lavado com agitação em solução de Tris-HCl 40mM pH= 7.5, albumina 10µg/ml, CaCl₂ 15mM à temperatura ambiente durante 2 horas, renovando-se sempre a solução.

Ao mesmo tempo, prepara-se num molde apropriado, um gel de agar 3% contendo CBB-amido 1% com dimensões idênticas às do gel de poliacrilamida. Terminada a lavagem deste último, os dois géis são superpostos e envolvidos em papel de "magipack". O conjunto é incubado à 50°C durante 2-3 horas, tempo que se mostrou suficiente para revelar sobre o gel de agar uma banda incolor correspondente à atividade amilolítica separada no gel de poliacrilamida.

22. Cromatografia em papel de produtos de hidrólise de amido.

Amostras de 1.5ml de amido 0.5% em tampão fosfato 50mM pH 6,0, foram hidrolizadas durante 3 horas à temperatura apropriada pela adição de 10µl de soluções 1mg/ml (em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6.0) de α -amilase de B. subtilis e A. oryzae ou pela adição de 10µl dos sobrenadantes de culturas de B. stearothermophilus ou E. coli USP 191 e 205. Após a hidrólise, alíquotas de 10µl foram aplicadas a tiras de papel Whatman 1MM (15 X 58cm) juntamente com padrões de glicose, maltose e isomaltose (1mg/ml em tampão fosfato de sódio 50mM pH= 6.0).

O papel foi então saturado com a fase móvel, composta de butanol, ácido acético glacial: H₂O (12:3:5). A cromatografia ascendente ou descendente foi desenvolvida durante 12 horas à temperatura ambiente. Os terminais redutores produzidos pela ação enzimática foram revelados com ions Ag⁺ segundo o processo descrito por Trevelyan et al (1950). Este consiste em mergulhar o papel bem seco em uma solução de AgNO₃ (0.5ml de solução saturada de AgNO₃ em 100ml de acetona à qual se acrescenta H₂O gota a gota até que se dissolva o precipitado).

O papel é então tratado sucessivamente com soluções de KOH 5N (preparada em Etanol absoluto), NH_4OH 3% e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 3%. Cada tratamento é sempre seguido de lavagem do papel em água corrente. Ao final deste processo, os açúcares redutores aparecem como manchas escuras no papel.

23. Fracionamento de α -amilase, por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A cultura de bactérias contendo o plasmídeo recombinante com o gene de α -amilase é crescida com agitação até a fase estacionária, aquecida em banho-maria 60°C por 2 horas, e centrifugada por 10 minutos à 6.000 Xg. Mede-se o sobrenadante e num becker mantido no gelo adiciona-se $(\text{NH}_4)_2$ segundo uma tabela de fracionamento como a apresentada no apêndice. As várias frações são mantidas no gelo durante 30 minutos para permitir a total precipitação de proteínas.

Após este tempo elas são centrifugadas por 30 minutos a 10.000 xg à 4°C . Os precipitados são dissolvidos no menor volume de água destilada e em seguida se determina atividade amilolítica em cada uma das frações. Normalmente esta é maior nos precipitados obtidos com 50-60% de saturação.

24. Medidas de atividade de α -amilase em diversos compartimentos das células E. coli USP 191 e E. coli USP 205.

Este procedimento foi adaptado de Tsukagoshi et al (1984).

20ml de cultura em fase "early log" ou em fase estacionária são centrifugados à 10.000 xg por 10 minutos. Este é o sobrenadante número 1. As células são lavadas sem ressuspensão com tris HCl 10mM pH 7.5 e então ressuspensas em 4ml de solução sacarose 0.5M, tris HCl 10mM pH 7.5. Adiciona-se lisozima para concentração final de 20 μg /ml. Incuba-se 5 a 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, dilui-se 1:1 com o mesmo tampão e adiciona-se EDTA para concentração final 10^{-3}M . Depois de

20 minutos a formação de esferoblastos é completa. (Birdsell & Cota Rubles, 1967).

Centrifugam-se as células à 15.000 xg por 15 minutos à 4°C ou a 8.000 xg por 25 minutos. Este é o sobrenadante nº 2.

Ressuspende-se o precipitado em 4ml de soluções de sacarose 0.5M, tris HCl 10mM pH 7.5. A suspensão é submetida a um disruptor de células Virsonic por 3 vezes de 1 minuto em gelo, com intensidade 60 no mostrador do aparelho. Centrifuga-se a suspensão obtendo-se assim o sobrenadante nº 3.

Ao mesmo tempo 4ml da cultura inicial de células são tratadas no disruptor ultrasonico como já se descreveu. A suspensão é centrifugada à 15.000 xg durante 15 minutos, obtendo-se assim o sobrenadante nº 4.

Após este tratamento mede-se a α -amilase nos 4 sobrenadantes, os quais devem conter em sequência as α -amilases extracelular, periplasmica, celular e total.

25. Dosagem de proteínas com Comassie - Blue G 250.

Este método foi descrito por Bradford (1976).

Primeiramente é preparada uma solução de 100mg de Comassie G-250 (ou Brilliant blue G) em 50ml de etanol 95%. Após a dissolução, adicionam-se 100ml de H_3PO_4 85% e água qsp 1.000ml e filtra-se em papel de filtro.

Constrói-se uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de soro albumina bovina (BSA) à 1mg/ml. Os pontos desta curva são obtidos colocando-se alíquotas da solução padrão em volume final de 0.1ml aos quais se adicionam 5ml da solução de Comassie descrita acima. Espera-se 5 minutos e lê-se absorbância à 595 nm.

A reação com as amostras é feita da mesma maneira: 0.1ml de amostra em 5ml de solução de Comassie. Espera-se 5 minutos e lê-se absorbância em 595 nm.

A absorbância da amostra é colocada no gráfico: absorbância X concentração, feita com a solução padrão e, desta forma determina-se a concentração da amostra.

26. Método Imunoquímico: Imuno difusão dupla.

A técnica de difusão dupla empregada é a mesma descrita por Duchterlony (1968); os anticorpos usados foram produzidos em coelhos e gentilmente cedidos pelo Sr. R.V. Nonato.

Em uma placa com agar 0.8% em tampão fosfato 20 mM pH 7.5 (vide apêndice) são feitos pequenos poços em torno de um poço central. Para isto, usa-se uma pipeta pasteur conectada a uma bomba de vácuo.

No poço central é colocado o anticorpo e nos radiais os diferentes antígenos.

A placa é deixada de 3 a 4 dias à temperatura ambiente para que ocorra difusão das moléculas de antígeno e anticorpo.

Quando o antígeno encontra seu anticorpo, forma-se uma linha de precipitação que poderá ser visualizada após a lavagem da placa com solução fisiológica (NaCl 0.85% em água) por dois dias.

Para melhorar a resolução pode-se corar a placa pelo método do Comassie-blue da forma anteriormente descrita em coloração de géis de poliacrilamida.

27. Isoeletrofocalização de α -amilase

Este procedimento se baseia nos métodos descritos por O'Farrel (1975) e Garrels (1979). Inicialmente, uma solução 7% de acrilamida (vide apêndice) é colocada num cilindro de 7 por 0.5cm que tem uma de suas extremidades vedada com parafilm.

Uma vez solidificado o gel, coloca-se no seu topo a solução contendo a amostra de proteínas e glicerol 9%. Em seguida, sobre esta, coloca-se cuidadosamente outra chamada "solução de proteção" (vide apêndice). Os dois compartimentos do sistema de eletroforese são então completados com os respectivos tampões, ou seja, o banho ácido no compartimento superior (pólo +) e o banho básico no inferior. As proteínas migrarão do pólo (+) ao

pólo (-), quando se aplicar uma diferença de potencial de 200 volt durante 3 horas.

Normalmente esta eletroforese é feita em duplicata, pois um dos géis é usado como referencia optica após ser corado com Coomassie blue da forma já descrita. O segundo gel por sua vez é fracionado e em cada fração se determina o pH e a atividade de α -amilase.

28. Análise de restrição e homologias em genes de alfa-amilases.

A análise de restrição e de homologias de diversos genes de alfa-amilase publicados na literatura (Drosophila melanogaster, Bover & Hickey, 1986; B. licheniformis, Gray et al. 1986; B. subtilis, Yang et al. 1982; Yamasaki et al. 1982; B. stearothermophilus, Ihara et al. 1985, Nakagima et al. 1985, Gray et al. 1986) foi efetuada com o auxílio de programas desenvolvidos por Pustell & Kafatos (1982) compatíveis com IBM PC/XT (Pustell Sequence Analysis Programs, Versão 4.0).

Apêndice de soluções.

1. Tris acetato/EDTA (TAE):

- 48.4g de tris hidroximetil-amino metano
- 11.42ml de ácido acético
- 20ml de EDTA 0.5M pH 8.0
- H₂O qsp 1 litro

2. Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose:

- 0.25% de azul de bromofenol
- Sacarose 40% em H₂O

3. Tampão Tris - EDTA (T.E.)

- Tris HCL 10mM pH 7.5
- EDTA 1mM pH 7.5

Gel de acrilamida:

1. solução A:

- 30g de acrilamida
- 0.8g de bisacrilamida
- H₂O qsp 100ml

2. solução B:

- 4ml de SDS 10%
- 18.17 de tris hidroximetil-amino metano
- HCL até pH 8.8
- H₂O qsp 100ml

3. solução C:

- 4ml de SDS 10%
- 6.06 g de tris hidroximetil-amino metano
- HCL até pH 6.8
- H₂O qsp 100ml

4. solução para confeccionar um gel de acrilamida 10%:

- 8.6ml de H₂O
- 6.65 ml de solução A
- 5ml de solução B
- 0.3ml de uma solução de persulfato de amonio 2%
- a mistura é deaerada e acrescenta-se 15µl de TEMED

5. solução de empilhamento:

- 3.17ml de H₂O
- 0.5ml de solução A
- 1.25 ml de solução C
- 7.5ml de persulfato de amonio 2%
- a mistura é deaerada e acrescenta-se 10 µl de TEMED

6. solução D:

- 12g de tris hidroximetil-amino metano
- 57.6 g de glicina pH 8.3
- H₂O qsp 1 litro

7. solução E:

- 5ml de SDS 10%
- 2.5ml de solução C
- 2ml de glicerol
- 0.1ml de EDTA 0.1M

8. tampão de corrida de eletroforese de poliacrilamida

- 125ml de solução D
- 5ml de SDS 10%
- H₂O qsp 500ml

9. tampão de amostra para gel de poliacrilamida

- 1.85ml de tampão E
- 50 µl de mercaptoetanol
- 100 µl de azul de bromofenol 0.1%

10. solução de coloração de poliacrilamida

- 45 ml de Comassie blue R 0,2% em H₂O
- 45ml de etanol absoluto
- 100ml de ácido acético glacial

11. solução de descoloração de géis de poliacrilamida

- 250ml de etanol absoluto
- 80ml de ácido acético glacial
- 650ml de H₂O

Reação de Nick - translation

1. tampão NTB (nick-translation buffer 10X)

- 500 µl de tris HCl 1M pH 7.5
- 50 µl de MgCl₂ 1M
- 1 µl de mercaptoetanol 14.2M
- 10 µl de BSA nuclease free 20mg/40 µl
- H₂O qsp 1000 µl

2. Solução de Denhardt 5X

- 0.1% de polivinil pirrolidona
- 0.1% de Ficoll 400
- 0.1% da fração V de soroalbumina bovina

3. SSC 20X:

- NaCl 3M
- Citrato de sódio 0.3M

Reação de Defosforilação com CIP (Calf intestine phosphatase)

- Tampão CIP :
- $MgCl_2$ 10mM
- $ZnCl_2$ 1mM
- Espermidina 10mM
- Tris HCl 0.5M pH 9.0

- Tampão STE:

- NaCl 1M
- EDTA 10mM
- Tris HCl 10mM pH 8.0

- Solução SMMP:

- Caldo PB 4X concentrado
- Solução SMM 2X na proporção 1:1

- Solução SMM 2X:

- 0.5m sacarose
- 0.02M maleato de sódio
- 0.02M $MgCl_2$ pH 6.5 ajustado com NaOH

- 1X SS:
- 6g KH_2PO_4 anh
- 14g K_2HPO_4 anh
- 2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1g Na citrato $\times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.2g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- H_2O qsp 1 litro ajustar pH= 7.0

- SPIZ I:
- A 500ml de 1X SS adicionam-se
- 5ml 50% glicose
- 5ml 2% casoaminoácidos
- 5ml 10% extrato de levedura
- 2.5ml de metabólito requerido (10mg/ml)

- SPIZ II:
- A 500ml SPZ I adicionam-se
- 5ml de 0.05M CaCl_2
- 12.5ml de 0.1M MgCl_2

- SPIZ II- EGTA:
- 100ml de 1X SS
- 2ml de 0.1M EDTA
- 1ml de 50% glicerol
- 1ml de 2% casoaminoácidos
- 1ml de 10% extrato de levedura
- 0.5ml de metabólito requerido (10 mg/ml)
- 1ml de 0.05M CaCl_2

Soluções para isoeletrofocalização em gel de acrilamida.

- Solução C: 28g acrilamida
- Bisacrilamida 0.735g
- H_2O qsp 100ml

Concentração final de acrilamida	5%	7%	10.5%

TEMED 1%	0.13ml	0.13ml	0.13ml
PERSULFATO DE POTASSIO 0.1%	0.33ml	1.33ml	1.33ml
SOLUÇÃO C	0.67ml	1.00ml	1.50ml
ANFOLITO	0.15ml	0.15ml	0.15ml
H ₂ O	1.74ml	1.41ml	0.81ml
TOTAL	4.02ml	4.02ml	4.02ml

Solução de proteção.

- Glicerol 10%
- Anfolito 2%

Banho Básico:

- NaOH 1N = 21ml
- H₂O qsp 300ml

Banho ácido:

- H₃PO₄ = 0.6ml
- H₂O qsp = 300ml

- Solução estoque de lugol
- 0.5% de I₂
- 5% de KI

Tampão fosfato (usado em placas de imunodifusão dupla)

- Solução estoque:
- A: 0.2M fosfato sódio monobásico (27.8g em 1000ml)
- B: 0.2M fosfato de sódio dibásico (53.65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou 71.7g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ em 1000ml)
- X ml de A + y ml de B diluído para um total de 200ml.

x	y	pH	x	y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

(Tabela publicada em "Methods in Enzymology, Vol.I, editado por S.P.Colowick e N.O.Kaplan, Academic Press, Inc. New York, 1955)

Tabela de fracionamento de proteínas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Concentração final de sulfato de amonio - saturação a 0°C

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Sulfato de amonio sólido para ser adicionado a 100 ml de solução																	
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Tabela publicada em "Data for Biochemical Research", 2ª edição, editado por R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot e K.M. Jones. Oxford University Press (1969).

RESULTADOS

1- Clonagem de fragmentos HIND III de plasmídeos de B. stearothermophilus em pBR 322.

Não são todas as cepas de B. stearothermophilus que possuem plasmídeos naturais. Isto foi verificado ao centri-fugar DNA total de varias cepas de nossa coleção em gradientes de CsCl. Somente 2 delas apresentam bandas de densidade compatível com o DNA cromossomal e plasmidial respectivamente. A banda mais densa, ao ser analisada em geis de agarose (Figura 1), mostrou vários componentes que devem corresponder a varios plasmídeos (Mielenz, 1983). Uma das cepas (ATCC 31195) analisadas por este critério e que tem curva de crescimento típico como o da figura 2 foi selecionada para estudo neste trabalho e por comodidade chamada de Bst 4.

Apos sua purificação, o DNA de plasmídeos foi clivado totalmente com Hind III. O resultado deste tratamento esta ilustrado na figura 3, que dá idéia da complexidade desse DNA.

Os fragmentos produzidos por este tratamento foram ligados ao sitio Hind III do vetor pBR 322, que havia sido previamente linearizado com esta enzima, e defosforilado com fosfatase alcalina de intestino de bezerro como se esquematiza na figura 4. Na figura 5, pode-se observar que a maior parte do material da fenda numero 4 é constituído por bandas que migram em regiões de pesos moleculares maiores que o vetor (4.32kb) o que sugere boa eficiência de ligação. Parte da mistura de ligação foi então empregada para transformar células competentes de E. coli Hb101 pelo metodo de Mandel e Higa (1970). Apos a transformação, as células foram plaqueadas separadamente em placas de agar contendo ampicilina e tetraciclina. Isto permitiu conhecer a frequência de inserção do fragmento de B. stearothermophilus no sitio Hind III de pBR322, o qual esta situado na região que confere resistência a tetraciclina. As células que possuem plasmídeos recombinantes devem exibir o fenótipo Amp^r e Tet^r. Obteve-se na melhor das transformações um banco com 5000 colônias das quais 46% possuíam o mencionado fenotipo.

Figura 1:
Eletroforese de plasmídeos de B. stearothermophilus ATCC 31195 (Bst 4).

Plasmídeos naturais de B. stearothermophilus ATCC 31195 separados em gel de agarose 0.8% em tampão T.A. 1x pH 7.5, contendo 0.2-0.5 ug/ml de brometo de etídeo.

Condições de eletroforese: tampão T.A. 1x pH 7.5, 100-150 mA até que o corante azul de bromofenol atinja a extremidade do gel. Temperatura ambiente.

Condições de fotografias: exposição 30 - 90 segundos a luz ultravioleta de 320 nm com filtro laranja e lente de aproximação.

1- fago λ clivado com enzima Hind III (utilizado para marcador de peso molecular).

2- plasmídeos antes da purificação no gradiente de CsCl.

3- plasmídeos após a purificação com CsCl.

Figura 2.
Curva de crescimento da cepa *B. stearothermophilus* ATCC 31195.

O meio de cultura usado está descrito em Materiais e Métodos.
Inóculo de 1:20; temperatura de crescimento 50°C e agitação vigorosa.

Figura 3:
Eletroforese de plasmídeos de B. stearothermophilus ATCC 31195.

As condições de clivagem com enzima de restrição são as descritas em Materiais e Métodos e as condições de eletroforese são as mesmas descritas na figura 1.

1- fago λ clivado com Hind III.

2- plasmídeos de Bst 4 não clivado com enzimas de restrição.

3- plasmídeos de Bst 4 clivado com Hind III.

Figura 4:

Esquema usado para a clonagem dos fragmentos de DNA de plasmídeos naturais de *B. stearothermophilus* no sítio Hind III de pBR322.

Após a linearização do plasmídeo, este foi tratado com fosfatase alcalina de intestino de bezerro para aumentar a eficiência da ligação. O plasmídeo recombinante é Amp^r Tet^S , pois o sítio de Hind III do pBR322 está no promotor da região que codifica para a resistência a tetraciclina.

Figura 5:
Eletroforese para a verificação das condições de ligação de pBR322 com o DNA dos plasmídeos de Bst 4 clivados com Hind III.

As condições de eletroforese são as mesmas descritas na figura 1.

1- fago λ clivado com Hind III.

2- pBR322 clivado com Hind III.

3- pBR322 nativo

4- mistura de ligação.

2- Detecção da capacidade amilolítica de células de E. coli HB 101 transformadas por plasmídeos recombinantes, em placas de agar-amido.

O procedimento empregado normalmente para detectar capacidade amilolítica em microorganismos consiste em espalhar amostras de culturas em placas contendo amido e após um tempo adequado de crescimento expô-las a vapores de I_2 . Este procedimento, contudo, tem a desvantagem de matar as células e de ser pouco sensível. O método de detectar atividade amilolítica em placas descrito neste trabalho foi adaptado de outro método empregado para determinação quantitativa de amilase em solução (Klein et.al., 1969; Rinderknecht et al., 1967). Este método adaptado consiste no emprego de agar misturado com amido ligado covalentemente a uma substância cromogênica (Cibacrom Brilliant Blue FR, Ciba-Geigy) por substituição nucleofílica na hidroxila do carbono 6 dos resíduos de glicose.

As colônias Amp^r e Tet^r obtidas da transformação de E. coli HB 101 foram plaqueadas em agar/amido-corante, incubadas à 37°C por 2 horas e em seguida a 55-60°C por aproximadamente 2 horas. Por este procedimento foram detectadas 22 colônias rodeadas por um halo incolor. Destas, 2 apresentaram halo consideravelmente maior que as restantes, característica observada após repiques sucessivos, o que não se observou com as outras. Estas colônias foram denominadas de E. coli USP 191 e E. coli USP 205 (figura 6).

Vários critérios foram aplicados para confirmar a existência de clones de E. coli HB 101 produtores de amilase:

a- Verificação da existência ou não de contaminantes amilolíticos e constatação de que eram colônias puras: foram preparadas lâminas com coloração de Gram, e a visualização por microscópio mostrou somente uma população de bactérias: pequenos bacilos Gram (-), não havendo, portanto, contaminação com outros microorganismos;

b- Existência de plasmídeos: extraíram-se plasmídeos das colônias E. coli USP 191 e 205 que quando clivados com Hind III produzem dois fragmentos: um com o tamanho do vetor pBR 322 e o outro com

Figura 6:
Atividade amilolítica de colônias E. coli USP 191 e 205.

Colônias de E. coli USP 191 e 205 foram semeadas em placas com meio LB + 1.5% de agar, suplementadas com 70 µg/ml de ampicilina, e 1% de amido - CBB.

Com auxílio de palitos de dentes estéreis, as colônias foram passadas para as placas, e deixada em 37°C por 2 horas. Após este período, as placas foram colocadas em estufa 60°C por aproximadamente 1 hora..

tamanho de aproximadamente 5.4 kb (figura 7). Estes plasmídeos foram denominados de p USP 191 e p USP 205.

c- Transmissão das características amilolíticas pelos plasmídeos: os plasmídeos isolados das colônias E. coli 205 e 191 quando usados para transformar células de E. coli HB 101, produzem colônias Apr Tet^r e que são fortemente amilolíticas.

d- Estabilidade dos plasmídeos: as colônias foram sucessivamente repicadas e continuavam mostrando capacidade amilolítica inalterada.

Em conjunto, estes resultados indicam que o fragmento de 5.4kb clonado possui o gene de amilase.

3- Mapa de restrição do fragmento de 5.4 kb.

A clivagem dos plasmídeos pUSP 191 e 205 inicialmente com uma enzima de restrição e, em seguida com duas, como é mostrado na tabela I, permitiu montar um mapa de restrição (figura 8) para os fragmentos de 5.4 kb dos 2 plasmídeos.

Os resultados indicam que pelo menos ao nível de resolução desta análise os fragmentos inseridos em pUSP 191 e 205 são iguais.

4- Mapa de restrição do fragmento ami 2.

O fragmento ami 2 foi obtido a partir da digestão total do fragmento de 5.4 kb, com a enzima Hinf I, que segundo Ihara et al. (1985) não cliva o gene de alfa amilase de B. stearothermophilus Dr-5.

O produto desta clivagem possui aproximadamente 2kb, foi tratado com DNA polimerase de Klenow e acoplado a um "linker" sintético de Hind III (R.V. Nonato, manuscrito em preparação).

Figura 7:

Eletroforese de plasmídeos pUSP 191 e 205 antes e após a clivagem com a enzima Hind III.

As condições de clivagem com a enzima Hind III estão descritas em Materiais e Métodos e as condições de eletroforese são nas mesmas condições da figura 1.

- 1- fago λ clivado com Hind III
- 2- pBR322 clivado com Hind III
- 3- pUSP 191 nativo
- 4- pUSP 191 nativo
- 5- pUSP 191 clivado com Hind III
- 6- pUSP 205 clivado com Hind III

Enzimas	nº de sítios em pBR 322	nº de sítios em pUSP 191	Tamanho dos fragmentos (kb)
Ava I	1	5	3.4, 2.6, 1.8, 1.3, 0.4
Bam HI	1	3	5.5, 2.5, 1.6
Bgl II	0	0	
Cla I	1	2	5.2, 4.5
E co RI	1	3	7.6, *(1.0)
Hind III	1	2	5.2, 4.4
Pst I	1	2	7.4, 2.2
Sst I	0	0	
Xho I	0	1	9.6
Ava I/ Bam HI	2	8	3.6, 1.5, *(1.0), *(0.8), 0.6, 0.4
Ava I/ Cla I	2	7	2.9, 2.2, 1.8, 1.3, 0.6, *(0.4)
Ava I/ Hind III	2	7	3.0, 1.8, 1.4, 1.3, 1.1, 0.6, 0.4
Ava I/ Pst I	2	7	2.5, 2.2, 1.8, 1.3, 0.8, 0.6, 0.4
Bam HI/ Pst I	2	5	3.2, 2.5, 2.2, 1.6, 0.1
E co RI/ Sal I	2	6	3.6, 2.6, *(1.1), 0.6, 0.5
Sal I/ Ava I	2	8	3.6, 1.7, *(0.9), *(0.7), 0.6, 0.4
Sal I/ Xho I	1	4	4.3, 2.7, 1.6, 0.9
Hind III/ Bam HI	2	5	4.0, 2.2, 1.7, 1.4, 0.4

Tabela I

Restrição do plasmídeo pUSP 191 que contém um fragmento de 5.4 kb originário de B. stearothermophilus ATCC 31195.

As condições de clivagens foram as descritas em Materias e Métodos.

Após a eletroforese dos produtos das clivagens, juntamente com um padrão de peso molecular, foram determinados os números de sítios nos dois plasmídeos com os respectivos tamanhos dos fragmentos.

Quando dois fragmentos apresentavam o mesmo tamanho, este foi colocado entre parênteses.

O sinal (*) significa que existem 2 fragmentos com o mesmo tamanho.

Figura 8:

Mapa de restrição do fragmento de 5.4 kb que contém o gene de alfa amilase de *B. stearothermophilus* ATCC 31195.

O plasmídeo pUSP 191 foi digerido com várias enzimas de restrição, como se descreve na Tabela 1. Os sítios destas enzimas foram situados com os dados desta tabela.

Este fragmento foi clivado com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI, AccI, XmaIII, PstI, SmaI, SalI, BamHI, Aval, BglI, PvuI, BclI, BglII, DraI, SstI, TaqI, XhoI, ClaI, Sau3A, HpaII e XbaI.

Destas, posicionaram-se após as digestões simples e duplas os sítios: EcoRI, AccI, XmaIII, PstI, SmaI, SalI, BamHI, Aval, BglI e PvuI, que constam na figura 9.

Não se detectaram sítios neste fragmento para as enzimas: DraI, BglII, SstI, XhoI, ClaI, XbaI, TaqI e BclI.

A grande quantidade de sítios detectados para as enzimas Sau3A e HpaII torna extramamente difícil determinar sua posição por essa técnica.

5- Subclonagem do fragmento Hind III de 5.4 Kb.

O fragmento Hind III de 5.4 Kb, foi subclonado para determinar a posição aproximada do gene de amilase. Este procedimento envolveu as seguintes etapas de trabalho (figura 10):

a- o plasmideo recombinante pUSP 205 foi clivado parcialmente com BamHI e totalmente com Hind III. Este tratamento fornece 5 fragmentos cujos pesos moleculares são: 1.4Kb, 2.1Kb, 2.6Kb, 3.2Kb, 3.5Kb.

b- isolamento dos fragmentos acima descritos em gel de baixo ponto de fusão.

c- clivagem total do vetor pBR 322 total com Hind III e BamHI e posterior purificação do produto de maior peso molecular em agarose de baixo ponto de fusão.

d- recombinação em presença de T4DNA ligase de cada um dos fragmentos mencionados nos itens b e c, o que fornece 4 recombinantes diferentes. Devido as características destas clivagens os fragmentos entram no vetor de forma dirigida.

e- transformação de E. coli com cada um dos recombinantes o que deve fornecer colonias distintas, cada uma com um fragmento clonado.

Figura 9:
Mapa de restrição do fragmento ami 2.

Este fragmento foi tratado com várias enzimas de restrição e suas posições foram destacadas no fragmento. Quando o posicionamento era duvidoso, eram feitas clivagens duplas ou usava-se o plasmídeo inteiro. As enzimas *DraI*, *BglII*, *SstI*, *XhoI*, *ClaI*, *XbaI*, *TaqI* e *BclI* não clivam fragmento.

Enzimas de restrição que clivam o fragmento:

H= *HindIII*

E= *EcoRI*

Ac= *AccI*

Xm= *XmaI*

P= *PstI*

Sm= *SmaI*

S= *SalI*

A= *AvaI*

B= *BamHI*

Pv= *PvuI*

Bg= *BglI*

Figura 10:
Esquema de clonagem usado na obtenção do plasmídeo pUSP 205/3.

O plasmídeo pUSP 205 foi tratado com as enzimas de restrição Hind III (digestão total) e Bam HI (digestão parcial). Este tratamento produz 4 fragmentos, os quais foram isolados de agarose de baixo ponto de fusão, e ligados ao maior fragmento obtido da digestão total de pBR 322 com Hind III.

A mistura de ligação foi usada para transformar células de *E. coli* HB 101. Seleccionaram-se colónias apresentando o fenotipo Amp^r Tet^s Amy⁺.

f- teste da capacidade amilolítica de cada um dos 4 tipos de colônias obtidos.

Como se pode ver na figura 9, obtêm-se 4 plasmídeos recombinantes nos quais o subfragmento tem sempre seu sítio Hind III situado a 29 bp do início do promotor da região que confere resistência a tetraciclina (sítio EcoRI) do vetor pBR322 (Bolivar et al, 1977). Isto indica que os clones que eventualmente tenham atividade amilolítica, estarão usando o próprio promotor do gene clonado. O resultado destas manipulações mostrou que dos quatro clones isolados, somente aquele que continha o plasmídeo recombinante com o subfragmento número 3, de aproximadamente 3.2 Kb possuía capacidade amilolítica. Passamos a chamar este clone de E. coli USP 205/3 e seu plasmídeo pUSP 205/3. De posse deste dado, infere-se que o gene da enzima amilolítica está situado a esquerda do segundo sítio BamHI e provavelmente contém o primeiro sítio BamHI.

Esta técnica foi também utilizada com as enzimas EcoRI e Hva I para localizar mais precisamente o gene dentro do fragmento. Como não se obtiveram colônias amilolíticas, supõe-se que tais enzimas clivam o gene. A posição tentativa deste está ilustrada na figura 8.

6- Atividade amilolítica em sobrenadantes de culturas de E. coli USP 191, 205 e 205/3.

A observação de que o tamanho do halo incolor, indicador de atividade amilolítica em placas de agar/amido-corante aumentava consideravelmente quando as colônias eram aquecidas a 60°C, sugeriu a execução de experimentos adicionais para esclarecer a origem do fenômeno.

Inicialmente, culturas crescidas em meio LB a 37°C até a fase estacionária foram aquecidas a 60°C em diferentes tempos e retiraram-se amostras, cujos sobrenadantes tiveram sua atividade amilolítica determinada. Os resultados estão expressos na figura 11. Observa-se que a atividade varia da mesma forma nos

Figura 11:

Atividade amilolítica relativa dos sobrenadantes de culturas de *E. coli* USP 205, 191 e 205/3 em função do tempo de incubação a 60°C.

As culturas de *E. coli* USP 205, 191 e 205/3 foram crescidas em meio LB com 70 µg/ml de ampicilina a 37°C até a fase estacionária e em seguida aquecidas a 60°C. Retiraram-se amostras em função do tempo e no sobrenadantes se determinou a atividade de α-amilase.

3 casos. Ela atinge um máximo entre 30-40 minutos após o início do aquecimento para manter-se constante durante pelo menos 2 horas. Neste experimento determinou-se, também, a densidade óptica a 600 nm em cada tempo, e, observou-se que esta se mantinha constante (figura 12) ou seja, o número de partículas difusoras de luz (bactérias) permaneceu o mesmo no curso do tratamento a 60°C. O exame microscópico das amostras revelou alteração morfológica das células, mais não o aspecto típico de lise.

O experimento realizado a seguir teve como objetivo verificar a variação da atividade amilolítica nos sobrenadantes em função da temperatura. Os resultados estão na figura 13. Nela é possível observar a forma sigmoidal da curva, que apresenta um ponto de inflexão em torno de 50°C.

Os resultados das figuras 11, 12 e 13 em conjunto, sugerem que a atividade observada nos sobrenadantes de culturas se deve a saída da enzima da célula para o meio externo, devido ao aumento da temperatura. É provável que neste fenômeno estejam envolvidas alterações nas estruturas que circundam o citoplasma celular, i.e., membrana interna, parede celular e membrana externa.

7- Determinação da temperatura ótima de a atividade da enzima clonada em E. coli USP 191 e E. coli USP 205.

Foram feitas medidas da capacidade amilolítica dos sobrenadantes de culturas de E. coli USP 205 tratadas como se descreveu em Materiais e Métodos (Wilson e Ingledew, 1982). As medidas foram feitas em meio LB (que contém ions Ca^{+2} na concentração aproximada de 5mM) e no mesmo meio com EDTA 5 mM. Verificou-se que este agente quelante leva a uma desestabilização da enzima com a subsequente perda de atividade em altas temperaturas (figura 14 e 15).

A experiência da figura 14 mostra que em presença de cálcio (meio LB) as curvas de ótimo de temperatura para a enzima dos 2 clones são praticamente idênticas, com um máximo compreendido entre 70°C-75°C. Porém quando se remove o ion cálcio do meio com EDTA, observa-se que as 2 curvas apesar de continuarem iguais, tem seu máximo deslocado para 60°C. Estes resultados sugerem que a enzima produzida pelos 2 clones se

Figura 12:
Medidas de absorvância a 600 nm em cultura de *E. coli* USP 191.

A cultura de *E. coli* USP 191 crescida a 37°C até a fase estacionária foi aquecida a 60°C. Nos tempos indicados, retiraram-se amostras que tiveram sua densidade ótica a 600 nm (turbidez) determinada em espectrofotômetro Varian Tectron, cujo detector da radiação emergente não é colinear com o feixe de radiação incidente.

Figura 13:

Atividade amilolítica dos sobrenadantes de culturas de *E. coli* USP 191, 205 e 205/3 em função da temperatura.

As culturas foram crescidas a 37°C em meio LB contendo 20 µg/ml de ampicilina até a fase estacionária. Amostras foram aquecidas a diferentes temperaturas durante 2 horas, e em seguida determinou-se a atividade de α -amilase nos sobrenadantes.

Figura 14:

Atividade amilolítica das culturas de *E. coli* USP 191 e 205 com e sem EDTA 5 mM variando-se a temperatura de incubação.

As culturas foram crescidas até a fase estacionária a 37°C em meio LB com 70 µg/ml de ampicilina, com e sem EDTA 5mM.

As medidas da atividade amilolítica foram feitas conforme já descrito em Materiais e Métodos, variando-se a temperatura de incubação da reação.

ESTABILIDADE TÉRMICA DA AMILASE DE *B. stearothermophilus* CLONADA EM *E. coli*

Figura 15:

Estabilidade térmica da enzima α -amilase de *B. stearothermophilus* clonada em *E. coli*.

Efeito do íon Ca^{++} na estabilidade térmica. As culturas de *E. coli* USP 191 e 205 foram crescidas até a fase estacionária em meio LB com CaCl_2 10 mM e em meio mínimo M9 sem a presença do íon Ca^{++} . As medidas da atividade amilolítica foram feitas após o aquecimento destas culturas em diversas temperaturas por 1 hora.

comportam da mesma maneira com relação a presença ou ausência de Ca^{++} e possuem o mesmo ótimo de temperatura, comportamento compatível com o de α -amilase de B. stearothermophilus (Singueton, 1973).

Para comprovar a estabilidade das 2 enzimas a temperaturas elevadas foi executada a experiência descrita na figura 15. Esta consistiu em medir a 72°C a atividade dos sobrenadantes das 2 cepas amilolíticas de E. coli previamente expostas durante 1 hora a temperaturas entre 65°C à 95°C. Novamente cada ponto representa a porcentagem do máximo de atividade em cada curva e a medida de 3 determinações. As medidas foram feitas em 2 meios de cultura: LB suplementado com CaCl_2 5 mM e o meio mínimo M9, cuja concentração em Ca^{++} é somente 0.1mM. Observa-se que a enzima dos 2 sobrenadantes se comporta aproximadamente da mesma forma, e que o cálcio é muito importante na atividade amilolítica. Nota-se que após o aquecimento do sobrenadante a 85°C por 1 hora em meio rico em cálcio, a atividade é de 90-91% da máxima, comportamento característico da alfa amilase de B. stearothermophilus.

8- Natureza da atividade amilolítica detectada em sobrenadante de culturas aquecidas a 60°C.

Os dados mencionados até aqui, não esclarecem, a origem da atividade amilolítica detectada nos sobrenadantes. É por isto que foram executados os seguintes experimentos:

a- Centrifugação dos sobrenadantes de culturas aquecidas a 60°C por 100 000xg durante 90 minutos.

A aplicação desta técnica não revelou nenhuma variação na atividade amilolítica nos sobrenadantes, o que sugere que a enzima é liberada para o meio sem estar associada a qualquer estrutura capaz de sedimentar nas condições mencionadas.

b- Eletroforese em géis de poliacrilamida.

A precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ das proteínas do sobrenadante de culturas crescidas em meio LB mostrou que a atividade amilolítica é recuperada em 50% de saturação. O material precipitado foi tratado como se descreveu em Materiais e Métodos e analisado em géis de poliacrilamida frente a padrões de peso molecular e de amilase de diferentes origens. O resultado é exibido nas figuras 16 e 17. Em 18 e 19 são apresentados géis tratados de forma a revelar a atividade amilolítica de uma banda definida. Pode observar-se que a região do gel que possui esta atividade, contém uma banda cujo peso molecular estimado é de 60 kdalton, valor muito próximo daquele encontrado na literatura para a alfa amilase de B. stearothermophilus.

c- Cromatografia dos produtos de hidrólise de amido por sobrenadantes de cultura aquecida a 60°C.

Os produtos de digestão do amido pelos sobrenadantes das culturas E. coli USP 191, 205, 205/3 aquecidas a 60°C, foram comparados com aqueles produzidos por alfa amilase cristalina de B. subtilis, de A. orizae e por sobrenadante de culturas de B. stearothermophilus. O resultado está nas figuras 20 e 21 onde se percebe que o padrão de dextrinas reveladas nas carreiras número 4,5,6,7, (produto da reação do amido com alfa amilase de B. stearothermophilus Bst 4, de B. subtilis, de E. coli USP 191 e 205 retirada de meio M9 e de E. coli USP 191 retirada do meio LB, respectivamente) é invariável, mas, diferem daquele produzido por A. orizae (carreira 8 da figura 21), que não apresenta glicose nem dextrinas de alto peso molecular.

Figura 16:

Eletroforese das proteínas de E. coli USP 191 e 205 em gel de poliacrilamida 10%.

As amostras de proteínas obtidas por precipitação com 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são misturadas a um tampão de amostra previamente preparado e colocadas por 5 minutos a 96°C antes de serem aplicadas no gel.

O gel é submetido a uma corrente constante de 30 mA. No momento em que as amostras passam para o gel de separação, muda-se a corrente para 50-70 mA. A corrida é feita em tampão-glicina/SDS pH 8.3 (ver Apêndice), até o corante chegar ao final do gel.

Concluída a separação das proteínas, o gel é tratado com uma solução de TCA 10% por 1 hora, a temperatura ambiente. Após este período, mergulha-se o gel em uma solução de comassie-blue, durante uma noite, e em seguida transfere-se o mesmo para uma solução de descoloração.

1- padrão de peso molecular

2- proteínas de Bst4 precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% após crescimento da cultura a 56°C até a fase estacionária.

3- proteínas de E. coli USP 191 precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% após crescimento da cultura a 37°C até a fase estacionária e aquecida a 60°C por 2 horas.

4- proteínas de E. coli USP 205, em condições idênticas as do item nº3.

Figura 17:

Eletroforese em poliacrilamida das proteínas de diversos clones de *E. coli* USP antes e após o aquecimento da cultura a 60°C por 2 horas.

As culturas de *E. coli* USP 191, 205, 33.2 e 35.2 crescidas a 37°C em meio LB com 70 µg/ml de ampicilina até a fase estacionária foram divididas em duas partes iguais: uma foi aquecida a 60°C por 2 horas e a outra metade permaneceu incubando a 37°C, nas mesmas condições.

Após a centrifugação destas culturas, os seus sobrenadantes foram precipitados com 50% de (NH₄)₂SO₄. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita em condições semelhantes as descritas na figura 16.

1- padrão de peso molecular

2- proteínas de *E. coli* USP 191 precipitadas quando a cultura não era submetida ao aquecimento

3- idem item anterior, com aquecimento 60°C por 2 horas

4- proteínas de *E. coli* USP 205, sem aquecimento

5- proteínas de *E. coli* USP 205, com aquecimento

6- proteínas de *E. coli* USP 33.2, sem aquecimento

7- proteínas de *E. coli* USP 33.2, com aquecimento

8- proteínas de *E. coli* USP 35.2, sem aquecimento

9- proteínas de *E. coli* USP 35.2, com aquecimento

Figura 18:

Gel de atividade amilolítica pelo método que utiliza agar e amido-CBB.

Antes do gel da figura 16 ser fixado com solução TCA 10%, foi lavado por 2 horas com uma solução de Tris HCl 40M pH 7.5, albumina 10 µg/ml CaCl_2 15mM a temperatura ambiente. Finalizado este tratamento, o gel de atividade (gel de agar 3% com amido-CBB 1%) foi colocado sobre o gel de poliacrilamida. O conjunto gel de atividade/gel de poliacrilamida foi acomodado entre 2 placas de vidro e envolvido com folha de PVC (Magipack) para evitar a evaporação.

O conjunto foi colocado em estufa 60°C por 1-2 horas e após esse período o gel de acrilamida foi cuidadosamente retirado para tratamento com TCA 10%, coloração e posterior descoloração da forma descrita na figura 16.

1- corresponde a fenda numero 2 do gel da figura 16.

2- corresponde a fenda numero 3 do gel da figura 16.

3- corresponde a fenda numero 4 do gel da figura 16.

Figura 19:

Gel de atividade amilolítica das culturas de *E. coli* USP 191 e 205.

Este gel de poliacrilamida 10% correu como descrito na Figura 16. As amostras foram colocadas em duplicata e após a corrida, o gel foi dividido sendo que, uma parte do gel foi fixada com TCA 10% e a outra ao tratamento com solução 40 mM tris-HCl pH=7.0, albumina 10 µg/ml por aproximadamente 12 horas e 1 hora em solução de amido 0,5% CaCl_2 1mM.

Finalizado o tratamento, o gel foi colocado em uma solução de lugol diluído.

fendas 1 e 2 - proteínas de *E. coli* USP 191 precipitadas com 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

fendas 3 e 4 - proteínas de *E. coli* USP 205 precipitadas com 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

G M IM B S 191 205 3 191 191
205 3

Figura 20:

Cromatografia descendente em papel dos produtos de digestão de amido.

As culturas de Bst 4, *E. coli* USP 191, 205 e 205/3 foram crescidas em meio M9 a 37°C com 70 µm/ml de ampicilina até a fase estacionária.

Centrifugaram-se as culturas e 10 µl dos sobrenadantes reagiram com 1.5 ml de amido 0.5% em tampão fosfato de sódio 50 mM pH: 6.0. As reações de digestão do amido solúvel se processavam em 1 hora a 37°C para *B. subtilis*, e a 60°C para a reação com Bst4, *E. coli* USP 191, 205 e 205/3. Após este período, 10 µl de cada reação de digestão foi semeada no papel Watman 1mm, com o auxílio de capilar. Foi utilizado como fase móvel butanol: ácido acético glacial: H₂O (12:3:5). O tempo de cromatografia foi de 12 horas e a coloração utilizada é descrita por Trevelyan et al (1950).

- 1- 10 µl de uma solução de glicose (10 mg/ml)
- 2- 10 µl de uma solução de maltose (10 mg/ml)
- 3- 10 µl de uma solução de isomaltose (10 mg/ml)
- 4- 10 µl da reação da α-amilase de Bst 4 sobre o amido.
- 5- 10 µl da reação da α-amilase cristalina de *B. subtilis* sobre o amido
- 6- 10 µl da reação da α-amilase de *E. coli* USP 191 sobre o amido.
- 7- 10 µl da reação da α-amilase de *E. coli* USP 205 sobre o amido.
- 8- 10 µl da reação da α-amilase de *E. coli* USP 205/3 sobre o amido.
- 9- 10 µl da reação da α-amilase de *E. coli* USP 191 e 205 sobre o amido.
- 10- 10 µl da reação da α-amilase de *E. coli* USP 191 e 205/3 sobre o amido.

Figura 21:

Cromatografia ascendente em papel dos produtos de digestão de amido.

As condições das reações são as mesmas descritas na figura 20. As reações com α -amilase de A. orizae e de B. subtilis se processaram a 37°C, e com Bst 4, E. coli 191 e 205 a 60°C.

- 1- 10 μ l de uma solução de glicose 10 mg/ml
- 2- 10 μ l de uma solução de maltose 10 mg/ml
- 3- 10 μ l de uma solução de amido 10 mg/ml
- 4- 10 μ l da reação de digestão da α -amilase de Bst 4 sobre o amido
- 5- 10 μ l da reação de digestão da α -amilase cristalina de B. subtilis sobre o amido.
- 6- 10 μ l da reação de digestão da α -amilase de E. coli USP 191 sobre o amido.
- 7- 10 μ l da reação de digestão da α -amilase de E. coli USP 205 sobre o amido.
- 8- 10 μ l da reação de digestão da α -amilase cristalina de Aspergillus orizae sobre o amido.

d- Reação de imunodifusão com antisoro contra a proteína de B. stearothermophilus clonada em E. coli.

Os anticorpos usados neste experimento foram obtidos imunizando coelhos com proteínas provenientes de sobrenadantes de culturas de E. coli USP 191, 205, 205/3. Observa-se que o antisoro produz uma banda de imunoprecipitação com material preparado de sobrenadante de cultura de B. stearothermophilus Bst 4, precipitado com 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (Figura 22).

O conjunto destes resultados indica que a proteína clonada é expressa em células de E. coli e a alfa-amilase de B. stearothermophilus.

9. Clonagem do fragmento de 3.2 kb que contém o gene de alfa-amilase no plasmídeo "shuttle" pHV 33.

A introdução do gene de alfa-amilase de B. stearothermophilus em células de Bacillus subtilis somente pode ser efetuada com a ajuda de vetores que possuam origem de replicação compatível com esta última espécie. Como pBR 322, o vetor que contém o gene, não atende a este requisito, optou-se por transferi-lo para um plasmídeo do tipo "shuttle" ou ponte, que possui 2 origens de replicação. Usou-se para isto o vetor pHV 33, cujo tamanho é de 7.5 kb e é revertante do plasmídeo híbrido pHV 14 (Ehrlich, 1978; Rapaport et al., 1979). Este foi construído ligando-se pC 194 (Ehrlich, 1978), originário de S. aureus, e com origem de replicação reconhecida por B. subtilis, a pBR 322 (Bolivar et al., 1977), pelos seus sítios Hind III.

Portanto, o plasmídeo pHV 33 pode ser replicado por células de Bacillus e de E. coli que adquirem o fenótipo $\text{Cmr}^r / \text{Amp}^r$ e $\text{Tcr}^r / \text{Cmr}^r$, respectivamente. O gene de alfa-amilase foi introduzido neste vetor como mostra o esquema da figura 23. Inicialmente pHV 33 foi clivado totalmente com a enzima Bam HI e parcialmente com Hind III. Este tratamento remove um fragmento de 0.4 kb, que aparentemente não está relacionado com nenhuma função importante do vetor. O fragmento de 6.6 kb resultante foi isolado

Figura 22:
Reação de Imunoprecipitação (Ouchterlony, 1968).

Os anticorpos usados foram produzidos em coelhos e gentilmente cedidos pelo Sr. R.V. Nonato. As placas foram feitas com agar 0.8% em tampão fosfato 20 mM pH 7.5. Os poços foram feitos com auxílio de uma pipeta pasteur conectada a uma bomba de vácuo. A reação tem a duração de 3-4 dias a temperatura ambiente. Para melhor visualização das linhas de precipitação, a placa é primeiramente lavada com solução fisiológica e depois corada com solução corante para geis de acrilamida (descrita em Materiais e Métodos). As linhas de precipitação entre os poços aparecem em branco, pois este é o filme positivo da foto.

- 1- soro de coelho imunizado com α -amilase de *E. coli* USP 191
- 2- α -amilase de Bst 4
- 3- α -amilase de *E. coli* USP 191

- A- soro de coelho imunizado com α -amilase de *E. coli* USP 205
- B- α -amilase de Bst 4
- C- α -amilase de *E. coli* USP 205

- I- soro de coelho imunizado com α -amilase de *E. coli* USP 205-3
- II- α -amilase de *E. coli* USP 205-3

Figura 23:
Introdução do gene de α -amilase de *B. stearothermophilus* no plasmídeo pHV 33.

O inserto de 3.2 kb que contém o gene de α -amilase de Bst 4, presente no plasmídeo pUSP 205-3 foi ligado ao plasmídeo pHV 33 pelos sítios Hind III e Bam HI. As colônias que possuem o plasmídeo recombinante foram identificadas pelo fenotipo Amp^R Cm^R Tet^S Amy⁺.

de agarose de baixo ponto de fusão e ligado ao fragmento de 3.2 Kb de B. steroothermophilus. A mistura de ligação foi usada para transformar células de E. coli HB 101. Isolaram-se varias colônias que apresentavam o fenotipo $\text{Amp}^r \text{Tc}^s \text{Amy}^+$. Estas foram chamadas de E. coli USP 33.2 e o plasmídeo isolado delas de pUSP 33.2.

Este possui peso molecular equivalente a 9.85 Kb e quando clivado com Bam HI e Hind III produz dois conjuntos de fragmentos com tamanhos de 2.2, 7.7 e 2.7, 7.2 respectivamente. Isto está mostrado na figura 24. O plasmídeo extraído de E. coli USP 33.2 transforma células de E. coli HB101 para o fenótipo $\text{Amp}^r \text{Tc}^s \text{Amy}^+$.

A atividade amilolítica de colônias E. coli USP 33.2, é mostrada na figura 25. Em gel de poliacrilamida, o peso molecular é o mesmo da enzima produzida por E. coli USP 191 e 205.

10. Atividade amilolítica das cepas E. coli USP 191, 205 e 33.2 durante o crescimento.

As figuras 26,27 e 28 mostram as curvas de crescimento das 3 cepas de E. coli junto com a correspondentes curvas de atividade amilolítica. A atividade sem aquecimento se refere à enzima existente no sobrenadante das culturas, e a outra curva foi feita após o seu aquecimento durante 2 horas a 60°C. Os resultados destas experiências indicam que a alfa amilase produzidas pelas 3 cepas acompanha a curva de crescimento.

Outra observação feita a partir destes resultados é que a atividade amilolítica pode ser detectada também no sobrenadante das culturas, sem necessidade de aquecimento. A explicação mais provável para esta observação é que essa atividade se deva a lise parcial das células durante a fase de crescimento.

Figura 24:

A- Eletroforese do plasmídeo pHV 33.

O plasmídeo pHV 33 foi previamente purificado em gradiente de CsCl, e clivado separadamente com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III.

- 1- fago λ clivado com Hind III
- 2- pHV 33 antes de ser clivado
- 3- pHV 33 clivado com Hind III
- 4- pHV 33 clivado com Bam HI

B- Eletroforese do plasmídeo pUSP 33.2.

O plasmídeo pUSP 33.2 foi previamente purificado por centrifugação em gradiente de CsCl e clivado separadamente com Bam HI e Hind III.

- 1- fago λ clivado com Hind III
- 2- pUSP 33.2 nativo
- 3- pUSP 33.2 clivado com Hind III
- 4- pUSP 33.2 clivado com Bam HI

As condições de eletroforese em A e B são iguais as descritas na figura 1.

Figura 25:

Placas de atividade amilolítica de colônias de E. coli USP 33.2.

As condições de plaqueamento foram as mesmas descritas na figura 6.

Figura 27:
Curva de atividade amilolítica em função do crescimento celular da
cêpa *E. coli* USP 191.

Como na figura 25.

Figura 26:

Curva de atividade amilolítica em função do crescimento celular da cepa *E. coli* USP 205.

Cultura da cepa *E. coli* USP 205 crescida a 37°C em meio LB contendo ampicilina 70 µg/ml. Em cada ponto mediu-se a $DD_{450\text{ nm}}$, a atividade amilolítica do sobrenadante da cultura além da atividade do sobrenadante após o aquecimento da cultura a 60°C durante 2 horas.

Figura 28:
Curva de atividade amilolitica em função do crescimento celular da
cêpa E. coli USP 33.2.

Como na figura 25.

11. Estudo da localização celular da amilase de B. stearothermophilus clonada em E. coli USP 191 e 205.

Para este estudo empregou-se um protocolo descrito por Tsukagoshi et. al. (1984) que foi aplicado a culturas tanto na fase estacionária como na logarítmica. Os resultados de uma experiência típica estão apresentados na tabela II. Nela se pode observar que a enzima clonada em E. coli é principalmente periplasmica (80%), nas 2 células estudadas (tabela IIA). Além disso, são também apresentados nesta tabela resultados de medidas feitas em células após seu aquecimento durante 2 horas a 60°C o que indica que esse processo libera aproximadamente 80% da enzima celular para o meio externo (tabela IIB).

12. Isoeletrofocalização das enzimas de E. coli USP 191 e 205.

A homogeneidade das preparações de alfa-amilase de B. stearothermophilus clonada em E. coli foi inspecionada por isoeletrofocalização empregando-se para isso a técnica de O'Farrel (1975) e Garrel's (1979).

Os resultados destes experimentos estão apresentados nas figuras 29 e 30, da qual, podem ser sumarizadas as seguintes conclusões:

- a- os valores da atividade amilásica detectados ao longo dos geis são baixos;
- b- existem bandas múltiplas de atividades nos geis controle e experimental;
- c- a posição das bandas de atividade nesses 2 tipos de gel não é reprodutível;
- d- a posição das bandas de atividade não coincide necessariamente com a posição das bandas coradas por Comassie-blue ;

(A) FASE ESTACIONARIA

		U/ml	%
<u>E. coli</u> USP 191			
Amilase	Periplasmica	93090	84
	Celular	17684	16
	Extracelular		..
<u>E. coli</u> USP 205			
Amilase	Periplasmica	97777	85
	Celular	16000	15
	Extracelular		..

(B) CULTURA AQUECIDA - FASE ESTACIONARIA

		U/ml	%
<u>E. coli</u> USP 191			
Amilase	Extracelular	92631	80
	Celular	22737	20
<u>E. coli</u> USP 205			
Amilase	Extracelular	96842	80
	Celular	23157	20

Tabela II:

Localização celular da α -amilase clonada em células de E. coli antes e após o aquecimento a 60°C durante 2 horas.

Para determinação de atividade amilásica nos compartimentos celulares (A) usou-se um protocolo descrito por Tsukagoshi et al., (1984).

Em (B) mostram-se resultados obtidos após aquecimento da cultura a 60°C durante 2 horas (amilase extracelular) e sonicação da célula remanecente (amilase celular).

Figura 29:
Isoeletrofocalização de α -amilase de *E. coli* USP 191, e 205, e da mistura destas 2 enzimas.

As culturas de *E. coli* USP 191 e 205 crescidas a 37°C em meio LB com 70 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina até a fase estacionária foram aquecidas a 60°C por 2 horas, centrifugadas e os sobrenadantes homogeneizados com 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido.

As proteínas precipitadas por este método são resuspensores em água bidestilada. Uma alíquota é misturada a glicerol 9% e colocada no topo do gel e logo acima desta, uma solução de glicerol 10% e anfólio 2% (solução de proteção). O anfólio usado fornece soluções cujo pH varia de 5-8.

Nesta foto o topo dos gels corresponde ao polo positivo. As isoeletrofocalizações foram realizadas em gels de acrilamida 7%. Após a corrida o gel foi tratado com TCA 10% por 1 hora, corado com solução de Comassie - Blue durante a noite e descorado com solução descorante de gels de acrilamida.

A flecha indica uma banda mais corada que corresponde a uma maior atividade amilolítica.

Figura 30:

Esquema de isoeletrofocalização de proteínas de *E. coli* USP 191 e *E. coli* (pBR 322) em gel de poliacrilamida.

As culturas de *E. coli* USP 191 e *E. coli* (pBR 322) foram submetidas ao mesmo tratamento descrito na figura 29.

A atividade amilolítica está expressa em U/ml (ordenada esquerda dos gráficos),

O pH está representado na ordenada direita dos gráficos.

e- a execução das eletroforeses invertendo a direção do gradiente de pH não alterou estas observações.

As implicações destes dados, bem como a validade desta técnica na análise da homogeneidade das preparações purificadas de alta-amilase serão discutidas a diante.

13. Transformação de células de B. subtilis com o plasmídeo pUSP 33.2 e determinação da atividade amilolítica dos transformantes.

Em todas as experiências de transformação de B. subtilis, foram empregadas cepas que apresentam uma deleção do gene Amy E, e que portanto, não possuem atividade amilolítica. As células usadas neste trabalho foram IA 289 (Aro I 906, met BS, Sac A 321, Amy E) e BD170 (trpC2, Thr-5) do Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) cedidas por Dr. Claudio Benoya (Pfizer, Connecticut), BD224 (Rec E) e BD241 (Rec E, Amy E) cedidas pelo Dr. Issar Smith (The Public Research Institute Of The City Of New York, Inc). A tabela III sumariza alguns dos experimentos executados. Foram usadas as 2 técnicas desenvolvidas para transformar Bacillus subtilis, ou seja, a que emprega concatêmeros para transformar células competentes (Dubnau et al. 1973; Mottes et al 1979) e a que usa monômeros para transformar protoplastos (Chang & Cohen, 1979).

Em 2 experimentos de transformação de células competentes obteve-se um total de 5 colônias que apresentavam o fenótipo Cmr e Amy+. Elas foram denominadas de B. subtilis IA 289 ami 3,5,30,70, e 85. As 3 últimas colônias eram as mais amilolíticas das cepas estudadas neste trabalho, mas somente a cepa B. subtilis IA 289 ami 70 manteve constante esta característica após 50-60 gerações (Figuras 31,32). A inspeção eletroforética do DNA obtido dessas células segundo o método de preparação de plasmídeos de Birboim & Doly (1979), evidenciou uma banda que comigra, nos géis de agarose, com a de 23 kb do fago clivado com Hind III (figura 33). Este DNA quando clivado com Hind III mostra um padrão de bandas semelhantes ao produzido pela ação da mesma enzima sobre DNA cromossomal (Figura 33). O comportamento deste material em gradiente de CsCl é mais próximo de DNA

Tabela III. Transformação de várias cepas de B. subtilis por diferentes plasmídeos.

Exp. nº	Veículo	Célula hospedeira	Tipo de Transformação	Recuperação de plasmídeo original	Presença de DNA que migra na Região de 23 Kb	Nº de colônias resistentes a antibiótico	Nº de colônias com fenotipo Amy +	Observações
0	pUB110	IA 289	P	-	-	7.6x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	O plasmídeo foi purificado em gradiente de CsCl, forma predominante: super helicoidal.
1	pUSP33.2	IA 289	P	-	+	1x 10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	O plasmídeo foi purificado em gradiente de CsCl, forma predominante: super helicoidal.
2	pUSP33.2	IA 289	P	-	+	50x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	O plasmídeo foi purificado em gradiente de CsCl, forma predominante: super helicoidal.
3	pUSP33.2	IA 289	C.C.	-	+	7x 10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	1	Quando colocada em LB CM liofília, não cresce.
4	pUSP33.2	IA 289	C.C.	-	+	20x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	5	Colônias morreram quase 3 dias para crescer em 10 µg/ml.
5	pUSP33.2	IA 289	C.C.	-	+	22x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	2(Bsu 3 e 5)	Colônias de <u>B. subtilis</u> IA 289 ami 3 e 5 permanecem amilolíticas após aproximadamente 10 repiques em 10 µg/ml CM
6	pBsu3	IA 289	C.C.	-	+	50x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	23	Em ambos os casos, a clivagem com Hind III e Bam HI, fornece um padrão complexo de bandas que migram a partir da banda de 23 kb de fago
7	pBsu5	IA 289	C.C.	-	+	44x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA		
8	pUSP33.2	IA 289	C.C.	-	+	1.5x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	24	
9	pUSP33.2	IA 289/BD170	C.C.	-	+	1.3x10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	3(Bsu30,70,85)	Colônias de <u>B. subtilis</u> IA 289 ami 30,70,85 permaneceram amilolíticas e somente Bsu 70 conservou esta característica.
10	pH33	IA 289/BD170	C.C.	-	+	100 colônias Cm ^r /µg DNA		
11	pBsu55	Hb 101	C.C.	-	+	2 x 10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	
12	pUSP33.2	IA 289	C.C.	-	+	3 x 10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	Colônias saem fortemente na placa
13	pC194 + fragmento de 2kb de pUSP ami 2	IA 289/BD170	C.C.	-	+	6 x 10 ⁴ colônias Cm ^r /µg DNA	0	Colônias não são resistentes a Ampicilina. Plasmídeo retirado de agrose de baixo ponto de fusão a 37°C apresenta pequenos nódos, a 55°C o nódulo aumenta. Após o 1º repique perderam a capacidade amilolítica.
14	pC194 + fragmento de 2kb de pUSP ami 2	IA 289/BD170	C.C.	-	+	30 colônias Cm ^r /µg DNA	0	
15	pC194 + fragmento de 2kb de pUSP17.76	IA 289/BD170	C.C.	-	+	100 colônias Cm ^r /µg DNA	0	
16	pBU271	BD 224	C.C.	+	-	13 colônias Km ^r /µg DNA	0	
	pBU271					50 colônias Km ^r /µg DNA	0	
17	ami 2	BD 224		+	-		0	Célula hospedeira apresenta fenotipo Amy +, portanto, não é um bom controle.
	pBU271	BD 241	C.C.	+	-	2.5x10 ⁴ colônias Km ^r /µgDNA	40	
	ami 2	BD 241		+	-	2.8x10 ⁴ colônias Km ^r /µgDNA	0	
							270	

P: Protoplasto

C.C.: Célula competente

IA 289: (Aro 960, met 85, sac A 321, Amy E)

BD 170: (Trp Ca₂, thr5, Amy E)

pUSP 17.76 : plasmídeo purificado de clone Amy - obtido na transformação de Hb 101 pela mistura de ligação pBR 322 +

plasmídeo de Bst 4, ambos clivados com Hind III

BD 224:(rec E)

BD 241: (rec E, Amy E)

Hb 101: Hsd S, leu, pro, lac, gal, stA, thi, rec A

pBsu 3: plasmídeo purificado de B. subtilis IA 289 ami 3

pBsu 5: plasmídeo purificado de B. subtilis IA 289 ami 5

pBsu 85: plasmídeo purificado de B. subtilis IA 289 ami 85

Figura 31:
Colônias de *B. subtilis* IA 289 transformadas com o plasmídeo pUSP 33.2.

Este plasmídeo foi linearizado e ligado com a enzima T4 DNA ligase, com a finalidade de gerar multímeros, para transformar células competentes. Destas somente *B. subtilis* IA 289 ami 3 e 5 apresentaram características amilolíticas. As colônias de *B. subtilis* IA 289 ami 3 e 5 foram plaqueadas em placas LB + 1.5% de agar, suplementado com 10 µg/ml de cloranfenicol e 1% de amido-CBB, e incubadas a 37°C.

Figura 32:

Colônias de *B. subtilis* IA 289 a 30, 70 e 85 semeadas em placa identificadora de atividade amilolítica.

As condições de plaqueamento e incubação são as mesmas que as descritas na figura 31.

Figura 33:

Eletroforese dos plasmídeos das cepas *B. subtilis* IA 289 am1 3 e 5.

As condições usadas são as mesmas descritas na figura 1.

As condições de clivagem estão descritas em Materiais e Métodos.

1- fago λ clivado com Hind III

2- plasmídeo retirado da cepa *B. subtilis* IA 289 am1 3

3- plasmídeo retirado da cepa *B. subtilis* IA 289 am1 3 clivado com Hind III

4- plasmídeo retirado da cepa *B. subtilis* IA 289 am1 5

5- plasmídeo retirado da cepa *B. subtilis* IA 289 am1 5 clivado com Hind III.

cromossomal do que plasmidial, e quando purificado é capaz de transformar células de E. coli HB 101 para o fenotipo $\text{Cmr}^r \text{Amp}^r \text{Amy}^-$ (experimento II da tabela III).

Experiências de hibridização deste DNA e de DNA cromossomal retidos em filtros de nitrocelulose (Southern, 1975), com sondas marcadas com P^{32} pela técnica de "nick-translation" (Maniatis et al., 1982) não foi capaz de evidenciar neles, a existência de sequências de pC 194, nem do fragmento de 3.2 Kb; somente foram detectadas sequências de pBR 322 no DNA cromossomal (não mostrado).

14. Estudo do caráter amilolítico de B. subtilis IA 289 ami 70.

As características amilolíticas da cepa de B. subtilis IA 289 ami 70 foram estudadas de forma analoga as cepas de E. coli USP 191 e 205. Estes experimentos mostram que:

a- a região que apresenta atividade amilolítica em geis de poliacrilamida corresponde a um peso molecular aproximadamente de 60 Kdalton, onde se observa normalmente nenhuma banda corada com Comassie-blue,

b- a reação de extratos desta cepa com antisoro anti-amilase de B. stearothermophilus usando a técnica de Duchterlony (1968), não mostra linhas de precipitação,

c- a cromatografia em papel dos produtos de hidrólise de amido por extratos de B. subtilis IA 289 ami 70 não mostram um padrão semelhante aos padrões do extrato de alfa-amilase de E. coli USP 191 e 205, (Figura 34)

d- o ótimo de temperatura determinado para a atividade amilolítica desta cepa é de 60°C , ou seja, doze graus abaixo daquela observando para a enzima de B. stearothermophilus clonada em E. coli. (Figura 35)

Observou-se também, que, o halo de atividade amilolítica desta cepa aparece nas placas de agar/amido-corante IS

Figura 34:

Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise de amido.

As condições foram as mesmas usadas na figura 20.

As reações com α -amilase de B. subtilis e A. orizae se processaram a 37°C, e com Bst4, E. coli USP 191, 205, B. subtilis IA 289 ami 70 e 5 a 60°C.

- 1- 10 μ l de uma solução de glicose 10 mg/ml
- 2- 10 μ l de uma solução de isomaltose 10 mg/ml
- 3- 10 μ l da reação da α -amilase cristalina de B. subtilis com amido
- 4- 10 μ l da reação da α -amilase cristalina de A. orizae com amido
- 5- 10 μ l da reação da α -amilase cristalina de Bst 4 com amido
- 6- 10 μ l da reação da α -amilase de E. coli USP 191 com amido
- 7- 10 μ l da reação da α -amilase de E. coli USP 205 com amido
- 8- 10 μ l da reação da α -amilase de B. subtilis 70 com amido
- 9- 10 μ l da reação da α -amilase de B. subtilis 5 com amido.

Figura 35:
Atividade amilolítica de B. subtilis 1A 289 ami 70 em função da temperatura.

A cepa de B. subtilis 1A 289 ami 70 foi crescida em meio 1B4B com cloranfenicol 10 µg/ml até a fase estacionária. Aliquotas dos sobrenadantes foram incubadas durante 10 minutos a diferentes temperaturas, determinando-se em seguida atividade amilolítica em cada uma delas.

minutos após e adquire notáveis dimensões após 2 horas de incubação (figuras 32).

15. Construção dos vetores pBU 271 e pBU 271 ami2

Os vetores pBU 271 e pBU 271 ami 2 foram construídos com a finalidade de apresentar uma alternativa na transformação de células de B. subtilis IA 289 (Aro 960, met B5, sac A 321, Amy E) obtida a partir do BGSC (Bacillus Genetic Stock Center) para o caráter amilolítico.

Os componentes utilizados são: 1) o plasmídeo pUB 110 (Ehrlich, 1977; Dubnau et al., 1978), que se originou de S. aureus, tem origem de replicação compatível com B. subtilis, e lhe confere o fenótipo km^r, 2) o plasmídeo pBR 327 (Soberon, 1980), cuja origem de replicação é compatível com as células de E. coli, as quais confere o fenótipo Amp^r; 3) o fragmento de 2 Kb(ami 2), que contém o gene de alfa-amilase de B. stearothermophilus.

Inicialmente, foi produzido o vetor pBU 271, que é híbrido de pUB 110 e pBR 327, unidos pelos seus sítios Bam HI. O vetor resultante tem 7.8 Kb, e, portanto, apresenta características de vetor "shuttle". Ele confere resistência a ampicilina e kanamicina às células de E. coli HB 101, e à kanamicina às células de B. subtilis IA 289 e BD 241.

O vetor pBU 271 foi então, linearizado com Hind III, e recombinado com o fragmento de ami 2. Disto resultou o vetor pBU 271 ami 2. Os detalhes e confirmação destas construções estão apresentados nas figuras 36, 37 e 38. Este novo plasmídeo é capaz de conferir às células de E. coli HB 101 o fenótipo Amp^r km^r Amy⁺, e às células de B. subtilis IA 289, transformadas tanto pela técnica de protoplastos, como pela técnica de células competentes, o fenótipo km^r Amy⁺.

Figura 36:
Construção do vetor pBU 271 ami 2.

A) Inicialmente construiu-se o vetor pBU 271, por ligação com DNA ligase dos plasmídeos pUB 110 e pBR 327 linearizados com Bam HI. A mistura de ligação foi usada para transformar células de *E. coli* HB 101. Selecionaram-se colônias com fenótipos Kmr Amp^r Tet^s . A orientação de ligação indicada na figura foi determinada pela análise dos fragmentos produzidos pela digestão com Eco RI, Bam HI e Aval I do plasmídeo isolado destas colônias. Este novo vetor foi então linearizado com Hind III e ligado ao fragmento ami 2. A mistura de ligação foi usada para transformar células de *E. coli* HB 101. Selecionaram-se colônias com fenótipos Kmr Amp^r Amy^+ .

B) Plasmídeos construídos esquematizados linearmente em escala.

Figura 37:

Padrão de restrição do plasmídeo pBU 271 clivado com Eco RI, Bam HI e Hind III.

As condições de clivagem foram as descritas em Materiais e Métodos.

As condições de eletroforese são as mesmas da figura 1.

- 1- λ clivado com Hind III
- 2- pUB 110 nativo
- 3- pBR 327 nativo
- 4- pBU 271 nativo
- 5- pBU 271 clivado com Eco RI
- 6- pBU 271 clivado com Bam HI
- 7- pUB 271 clivado com Ava I

Figura 38:

Padrão de restrição do plasmídeo pBU 271 am1 2 clivado com Bam HI e Hind III.

As condições de clivagem foram descritas e Materiais e Metodos. As condições de eletroforese foram iguais as da figura 1.

- 1- fago λ clivado com Hind III
- 2- pBU 271 am1 2 nativo
- 3- pBU 271 am1 2 clivado com Bam HI
- 4- pBU 271 am1 2 clivado com Hind III

DISCUSSÃO

I. CLONAGEM DE FRAGMENTOS HIND III DE PLASMÍDEOS DE B. stearothermophilus EM pBR 322.

A cepa de B. stearothermophilus ATCC 31195 utilizada durante este trabalho, foi estudada anteriormente por Mielenz (1983), quem forneceu indicações convincentes de que o gene que codifica para a enzima alfa-amilase não é cromossomal, mas está localizado nas 8 cópias de um plasmídeo natural de 26 kb, que este microorganismo possui.

Devido a esta interessante característica, tal bactéria é a indicada para isolar e clonar o mencionado gene, já que é muito mais fácil encontrá-lo nos 260 Mdalton que compõe o DNA plasmidial, do que no cromossomo bacteriano (o cromossomo de B. subtilis, por exemplo, tem um peso molecular de aproximadamente 3×10^3 Mdalton, segundo dados de Bak et al., 1970; Kavenoff, 1972; Klotz & Zimm, 1972).

O emprego do sistema pBR 322 (Bolivar et al., 1977)/E. coli HB 101 para o isolamento do gene de alfa-amilase é justificado pelas facilidades de manipulação, bem como pelo fato de que a origem de replicação deste plasmídeo é derivada de Col E1 (Gelfand et al., 1978; e revisão de Williamson, 1982), ou seja, é do tipo "relaxada", o que permite que cada célula hospedeira produza de 1000 - 3000 cópias do mesmo (Clewell et al., 1972; Hershfield et al., 1974). Esta é uma das principais razões pelas quais este sistema é indicado para a clonagem molecular de fragmentos específicos de DNA.

Os nossos resultados indicam que o gene de alfa-amilase foi clonado na frequência de aproximadamente 1/2500 que é da mesma ordem daquela calculada segundo Clarke & Carbon (1979), quando se considera um genoma com as dimensões do B. subtilis. Isto indicaria que, ao contrário do proposto por Mielenz (1983), na cepa de B. stearothermophilus ATCC 31195, esse gene se localizaria no cromossomo. Essa conclusão, contudo, não é definitiva, já que em nossos experimentos isolamos de início 22 colônias que apresentam halo indicador de atividade amilolítica (frequência de aproximadamente 1/120), que foram perdendo como o

tempo essa propriedade ate que somente duas delas, aqui estudadas, a mantiveram.

A construção esquematizada na figura 4, mostra a inserção de um fragmento de 5.4 kb, no sítio Hind III de pBR 322; nesta situação, a região responsável pela expressão da resistência à tetraciclina é interrompida (Bolivar et.al., 1977) e as células que possuem estes plasmídeos são sensíveis ao antibiótico. As colônias portadoras do gene de alfa-amilase foram detectadas pela expressão do fenótipo Amy+, o que indica que a região do gene que contem a sequência promotora, bem como o codon de terminação devem ter sido reconhecidos pelas células hospedeiras. Estas conclusões são fortalecidas por dados preliminares (R.V. Nonato, comunicação pessoal) que mostram, no início do gene clonado, uma sequência igual àquela identificada como sendo promotora do gene cromossomal de alfa-amilase de B. stearothermophilus DY-5 (Ihara et al., 1985). Em nosso caso deve ocorrer algo analogo ao que acontece com sequências promotoras de B. subtilis, que são eficientemente reconhecidas pela RNA polimerase de E. coli (Moran et al., 1982). Além disso o peso molecular do peptídeo clonado é da ordem de 60-61 Kdalton, compatível com o descrito para a alfa-amilase madura de B. stearothermophilus (ver revisão de Fisher & Stein, 1961).

A região codificadora para esta proteína deve se estender por aproximadamente 1.6-2.0 Kb no fragmento de 5.4 Kb, e sua posição foi tentativamente determinada após os seguintes experimentos:

- a- mapeamento de restrição do fragmento de 5.4 Kb (tabela I)
- b- subclonagem de fragmentos Hind III/Bam HI (figura 10) em pBR 322 e subsequente expressão em E. coli,
- c- subclonagem de fragmentos Eco RI e subsequente expressão em E. coli,
- d- subclonagem de fragmentos Ava I e subsequente expressão em E. coli.

O unico fragmento expresso em E. coli e o de número 3 da figura 10. Este fato sugere fortemente que o gene de

alfa-amilase deve estar situado entre os sítios de Eco RI(1.1kb), possivelmente ultrapassando-os, tal como se ilustra na figura 8.

A situação do gene aqui proposta se baseia também nos dados de Ihara et al., 1985; Nakajima et al., 1985; Satoh et al., 1988, que estudaram o gene de alfa-amilase cromossomal de células de B. stearothermophilus.

O conjunto destes dados bem como informações adicionais de literatura sobre a posição de dois sítios Hinf I, um a 200 bp do codon de iniciação GTG e o outro a 150 bp do codon de terminação TGA (Ihara et al., 1985) no gene de alfa-amilase de outra célula de B. stearothermophilus, permitiram subclonar um fragmento de Hinf I de aproximadamente 2 Kb. Este foi tratado com DNA polimerase de "Klenow", em seguida acoplado a "linker" sintético de Hind III e finalmente ligado aos sítios correspondentes de pBR 322 (R.Nonato et al. manuscrito em preparação) e pBU 271 (este trabalho). Ambos os recombinantes expressam satisfatoriamente a enzima em E. coli e o segundo, como se verá, o faz também em B. subtilis. Este é o menor fragmento clonado capaz de permitir a expressão de alfa-amilase de B. stearothermophilus.

O mapeamento de restrição do mencionado fragmento apresentado na figura 9, juntamente com os dados preliminares de sequenciamento (R. Nonato em comunicação pessoal), sugere que o gene de alfa-amilase aqui estudado é semelhante àqueles estudados em células onde sua localização é cromossômica (Ihara et al., 1985; Nakajima et al., 1985).

A localização extracromossômica do gene de alfa-amilase em B. stearothermophilus ATCC 31195 (Mielenz, 1983) poderia ser explicada por 2 processos:

- a- o gene, inicialmente cromossomal, foi segregado para um plasmídeo
- b- o gene foi doado por outra espécie bacteriana, como parece ocorrer em certas células de B. stearothermophilus que o receberam de B. licheniformis (Satoh et al., 1988).

A determinação de homologias nas regiões que flanqueiam o gene de alfa amilase no cromossomo da célula que possui o plasmídeo, ou nos cromossomos de outras células de

Bacillus, poderia indicar qual dos processos mencionados é o mais provável. Em ambas as situações, contudo, parece pouco plausível que a expressão de alfa amilase em B. stearothermophilus seja afetada pelos produtos de outros genes, como ocorre em B. subtilis (Yamagushi et. al., 1974; Yoneda et al., 1974; Yoneda & Mauro, 1975).

II- DETECÇÃO DA ENZIMA ALFA-AMILASE EM PLACAS

Os protocolos disponíveis na literatura para detecção de atividade amilolítica em colônias se baseiam na reação de formação do complexo amido/I₂, cuja intensidade da cor azul é proporcional ao tamanho das moléculas de amido que interagem com I₂ (esta reação, os complexos formados, bem como as cores que os mesmos produzem estão estudados nas revisões de Aspinal (1970) e French (1975)).

Num procedimento bacteriológico, a reação ocorre em placas de agar previamente preparadas com amido 1.0% e expostas a vapores de I₂ sublimado. As colônias que produzem e secretam alfa-amilase devem, após este processo, aparecer rodeadas por um halo incolor num fundo azul escuro. Este método é eficiente desde que a enzima seja exportada pelas células, como no caso das bactérias do genero Bacillus.

A detecção de alfa-amilase clonada em E. coli, foi dificultada pela incapacidade dessas células em secretar proteínas (ver Revisão Randall e Hardy, 1984). A única proteína que elas exportam é a hemolisina (Holland et al., 1986).

Desta forma, foi necessário delinear procedimentos que permitissem ultrapassar este obstáculo. A técnica de tratamento de colônias passadas para papel de filtro com lisozima (Tsukagoshi et al., 1984) ou a inibição da síntese de parede bacteriana com cicloserina (Curtis et al., 1965; Chakrabarty, 1978) são exemplos de métodos de detecção de alfa-amilase clonada em E. coli com I₂. Contudo, esses processos não se mostraram satisfatórios no decorrer de nossos experimentos, já que o halo em volta de colônias amilolíticas era, muitas vezes, indistinguível daquele observado ao redor de colônias não produtoras de amilase.

Rinderknecht et al. (1967) e Klein et al. (1969) descreveram o uso de soluções com substrato cromogênico, em um processo simples e rápido, para a determinação quantitativa de alfa-amilase de diversas origens biológicas. Neste trabalho, foi adaptado o uso do substrato cromogênico amido-CBB (ver Materiais e Métodos), para placas juntamente com o meio de cultura.

Inicialmente as placas indicadoras foram testadas com as células de E. coli Tet 104 e Tet 21, produtos da transformação com os plasmídeos pMSa 104 e pMPa 21, respectivamente (Schibler et al., 1980). Estes foram contruídos inserindo-se o cDNA correspondente a mRNAs de alfa-amilase de glândula salivar (pMSa 104) e de pancreas (pMPa 21) de rato, no sítio PstI de pBR 322. Os recombinantes possuem portanto, o gene de beta-lactamase interrompido por essa inserção, e os transcritos, em ambos os casos, devem ser mensageiros híbridos. As proteínas traduzidas, certamente não possuem atividade de beta-lactamase, e a possível atividade amilolítica foi testada com o procedimento que desenvolvemos.

Consistentemente, observou-se sempre um pequeno halo ao redor das colônias de E. coli Tet 104. As colônias de E. coli Tet 21 não apresentavam halo, o que provavelmente se deve à construção do plasmídeo pMPa 21, no qual o cDNA foi inserido em direção oposta à da transcrição do gene de beta-lactamase. Esta distinção de comportamento não pode ser observada com os procedimentos que utilizam I₂ sublimado, e comprova a eficiência e a sensibilidade deste novo método para detectar alfa-amilase em placas.

O mesmo processo foi aplicado a células amilolíticas de B. subtilis (figura 31 e 32) com excelentes resultados. Para aumentar a sensibilidade na detecção da possível atividade amilolítica de colônias de E. coli HB 101 transformadas com o gene de alfa-amilase de B. stearothermophilus, empregou-se a seguinte estratégia: após considerar que esta proteína é termoestável, cresceram-se as colônias durante 2-3 horas à 37°C em placas indicadoras transferindo-as, em seguida, para a temperatura de 60°C (figura 6 e 25). Isto além de permitir o aumento do número de células na colônia, ativa consideravelmente a enzima. Foi justamente este procedimento que permitiu isolar todas as células amilolíticas de E. coli descritas neste trabalho. Outra vantagem desta técnica consiste em que as colônias plaqueadas

neste meio indicador não morrem como ocorre com os métodos que empregam iodo sublimado. Aparentemente a especificidade da alfa-amilase pelas ligações α -1-0-4 não é alterada pela ligação do corante ao amido e o halo incolor que rodeia as colônias amilolíticas provavelmente se deve à difusão muito mais rápida dos produtos de hidrólise na placa.

III. Natureza da Atividade Amilolítica Liberada pelas Células de E. coli Transformadas com Plasmídeos que Contêm o Gene de Alfa-Amilase

O sistema de transporte de E. coli transloca através da membrana interna, proteínas que possuam ligado ao amino grupo terminal um peptídeo composto de 15-20 resíduos, dos quais os 4 ou 5 primeiros são básicos, e os seguintes hidrofóbicos, distribuídos ao redor de uma prolina ou glicina (Randall & Hardy, 1984; Holland et al., 1986). A presença do peptídeo sinal é necessária para dirigir a proteína ao interior da membrana interna e para translocar seu terminal $-NH_2$ para o interior dessa membrana. A localização final dessa proteína dentro de uma ou outra membrana, ou no periplasma, depende de informação contida em sua estrutura primária. Por exemplo, a beta-galactosidase citoplasmática não pode ser convertida em proteína de membrana externa pela simples fusão com o peptídeo sinal de Lam B (proteína de membrana externa). Analogamente, o peptídeo sinal de uma proteína periplásmica não pode por si só, fazer com que uma proteína hidrofóbica de membrana externa se torne periplásmica. É possível que o direcionamento de uma proteína para um determinado compartimento requeira sua fusão com porções críticas de uma proteína representativa desse compartimento (Lunn et al., 1986). Em bactérias do gênero Bacillus, os peptídeos sinais são um pouco maiores, aproximadamente 31-44 aminoácidos (Watson, 1984) mas, os outros requerimentos para a translocação são semelhantes aos descritos para E. coli. A regra conhecida mostra que os peptídeos de Bacillus são aceitos por E. coli mas que, por uma questão de tamanho, a recíproca pode não ser verdadeira (Moran et al., 1982).

Os resultados apresentados na tabela II A mostram que a maior parte da atividade amilolítica expressa por E.

coli USP 191 se encontra no espaço periplásmico, resultado similar ao encontrado por outros autores ao clonar a mesma enzima (Tsukagoshi et al., 1984; Cornelis et al., 1982) nesse organismo. Isto significa que o peptídeo sinal de Bacillus é reconhecido pelo sistema de transporte de E. coli. Como as bactérias Gram +, de onde se origina a enzima clonada, não possuem membrana interna ou espaço periplásmico, cabe indagar porque seu peptídeo sinal, que na célula de origem permite a passagem através de uma barreira hidrofóbica, é reconhecido em E. coli, onde esta passagem é feita através de uma membrana interna que é hidrofílica. É provável que os peptídeos sinal tenham evoluído a partir de bactérias com organização semelhante à das Gram - e retiveram a característica estrutural que permite o comportamento aqui observado.

A figura 11 e a tabela II B mostram que após 1 hora de incubação das células que contém o plasmídeo pUSP 191 e 205 à 60°, 80% da atividade amilásica é recuperada no sobrenadante e 20% dela são retidas na célula por motivos que não foram estudados. Como 80% da atividade celular dessa enzima se situam no espaço periplásmico (ver tabela II A), isto é, entre a membrana interna e externa, supõe-se que a enzima colocada no meio por efeito da temperatura é justamente aquela situada no periplasma. Para obter informações adicionais sobre a expulsão da amilase, realizou-se o experimento mostrado na figura 13. Ele sugere algumas características importantes desse processo. A forma sigmoidal da curva que ilustra a variação da atividade enzimática detectada no exterior celular em função da temperatura é análoga às obtidas no estudo da transição de fase gel para cristal líquido, por efeito da temperatura em membranas modelo (Eibl & Trauble, 1972). A temperatura correspondente ao ponto de inflexão da figura 13 é da mesma ordem da determinada para a transição (T_c ou T_m) de membranas construídas com lipídeos de cadeias alifáticas saturadas. Curvas similares são também obtidas em multicamadas lipídicas quando se estuda essa transição por alterações de espectro Ramam que indicam mudanças de conformação de grupos CH_2 de cadeias alifáticas (Lippert & Peticolas, 1971) em função da temperatura. A idéia que estes dados e os da literatura sugerem, é que a atividade detectada no sobrenadante é função da fluidez da membrana externa e não de lise celular (ver também figura 11). Este processo, como indica a forma da curva, deve ser cooperativo. Lipídeos e proteínas podem formar sistemas cooperativos nos quais

a variação estrutural de um dos componentes pode induzir a variação conformacional simultânea do outro (Eibl & Trauble, 1972).

É possível, já que composição da membrana celular é complexa, que nessa temperatura de transição ocorram também tensões tangenciais ao plano da membrana que resultem em descontinuidade da bicamada. Isto colocaria a enzima periplásmica em contato com o solvente polar, removendo-a para o exterior.

Esta hipótese é a que mais facilmente explicaria os resultados obtidos e, poderia ser testada clonando outra enzima termoestável de B. stearothermophilus neste sistema. Se a temperatura de transição se mantivesse, isto indicaria que o fenômeno depende somente da natureza da membrana. Contudo, se o referido parâmetro se alterasse, possivelmente o processo seria também função da composição do peptídeo em estudo, o que o tornaria intrinsecamente mais complexo. De qualquer forma, os experimentos considerados, podem servir como o embrião de uma técnica de estudo da composição e do comportamento de membranas celulares.

A análise cromatográfica dos produtos de digestão de amido solúvel com extratos de E. coli USP 191, 205, 205/3 (figura 20 e 21), indica que a enzima clonada neste trabalho tem comportamento similar ao de enzimas liqueficientes tais como a de B. subtilis e de B. stearothermophilus (de onde ela é originária).

Outros testes foram efetuados para confirmar a natureza da enzima clonada em E. coli. Estes são: reação de imunodifusão (figura 21) e eletroforese em géis de poliacrilamida corados para a detecção de bandas proteicas ou de atividade (figuras 16, 17, 18 e 19). Nesse último observou-se sempre uma banda predominante de aproximadamente 60 Kdalton, com atividade amilolítica, e que reage com anticorpos anti-alfa-amilase de B. stearothermophilus. Quando se utiliza aquecimento para retirar a enzima do interior da célula, esta banda de 60 Kdalton apresenta grau de contaminação menor do que o observado quando se lisa a membrana com lisozima (não mostrado). Isto permite sua purificação a partir da banda do gel de acrilamida e uso posterior para imunizar coelhos (Roberto Nonato, comunicação pessoal).

Este conjunto de resultados sugere que as enzimas termostáveis clonadas em E. coli e armazenadas no espaço

periplasmico podem ser vantajosamente recuperadas com procedimentos analogos aos discutidos antes.

A detecção de atividade enzimática residual em sobrenadantes de culturas das cepas E. coli USP 191, 205, em fase de crescimento (figuras 26, 27, 28) é possivelmente devida à lise parcial das células durante o crescimento.

Os resultados obtidos (figura 29 e 30) mostram várias bandas com fraca atividade amilolítica que normalmente não coincidem com as reveladas pelo corante. Como o padrão de bandas não é reprodutível, é possível pensar em artefatos. A favor desta idéia estão os dados de Cox et al. (1981), que pela mesma técnica foram capazes de detectar em extratos de B. stearothermophilus nada menos que 18 bandas, o que certamente não correspondem à realidade. Estes autores sugerem que a inibição da atividade enzimática pelo anfolito, alterações durante o processo de extração que levam a proteólise limitada ou mesmo alterações de carga inespecíficas da proteína sejam responsáveis pela complexidade dos padrões obtidos.

IV. Análise de Restrição do Fragmento ami 2.

A figura 9 mostra o mapa de restrição do fragmento ami 2 que contém o gene de alfa amilase de B. stearothermophilus. Nele foram colocados os sítios de restrição das enzimas Ava I, Bam HI, Eco RI, Pst I, Pvu II, Sal I, Sma I, Xma III e um dos sítios Acc I.

Para comparar o gene estudado neste trabalho com outros cujas sequências já foram publicadas, construiu-se a figura 39. Nela constam os locais de clivagem das enzimas mencionadas em sete genes diferentes de alfa amilase. Eles estão representados da esquerda a direita a partir do primeiro nucleotídeo do codon de iniciação, execução feita ao fragmento ami 2, do qual se omitiram 100 bp que devem corresponder ao peptídeo sinal. A inspeção desta figura 39 revela os seguintes pontos importantes:

1. Os mapas de B. stearothermophilus, como se esperava, são muito semelhantes. Pequenas diferenças contudo, podem ser observadas em alguns sítios que desaparecem ou mudaram de posição dependendo da cepa da qual se originou o gene. Este comportamento se observa

BG = Bgl I, B = Bam HI, Av = AVAI, Pv = PVU II, P = Pst I, S = SKL I, Ac = ACCI, Xm = XMAI, D = DRA I, C = CLA I, Sm = SMAI, E = ECORI, BI = Bgl II

Figura 39:

Mapas de restrição de genes que codificam para alfa-amilase obtidos a partir de sequencias publicadas.

Para obter estes mapas, as sequências de nucleotídeos publicadas na literatura foram analisadas por um programa de computador que procura a sequência e o sítio de clivagem de várias enzimas de restrição.

Sequências usadas: *Drosophila melanogaster* (Bauer & Hickey, 1986), *B. licheniformis* (Gray et al., 1986), *B. subtilis*-1 (Yang et al., 1982), *B. subtilis*-2 (Yamazaki et al., 1982), *B. stearothermophilus*-3 (Iihara et al., 1985), *B. stearothermophilus*-4 (Nakajima et al., 1985), *B. stearothermophilus*-5 (Gray et al., 1986) e *B. stearothermophilus*-6 (este trabalho)

tambem em B. subtilis e provavelmente pode ser generalizado para genes dentro de uma mesma especie. O ultimo mapa deste esquema, (B. stearothermophilus-B) resultado deste trabalho, segue em linhas gerais o que foi dito, mas apresenta características proprias. Por exemplo, ele e o unico que possui o conjunto de sitios Pvu II, Xma III e Sma I e não tem sitio Cla I, ao contrario do que ocorre com todos os outros genes estudados, com exceção do de Drosophila. Outro detalhe deste mapa, ou seja, a existência de somente dois sitios Eco RI pode ser questionado, já que se houvesse um terceiro na posição observada nas outras cêpas de B. stearothermophilus, possivelmente ele não seria detectado devido a que um dos fragmentos gerados teria tamanho próximo do limite de resolução de técnica de análise empregada. Apesar disto, estes resultados mostram que o fragmento ami 2 contém um gene de alfa amilase não descrito na literatura.

2. A comparação dos mapas de restrição entre as especies estudadas, revela diferenças sensiveis, embora alguns sitios sejam notavelmente conservados em todas elas. Este e o caso dos das enzimas Acc I e Sal I, que se situam ao redor de 1kb do inicio de todos os genes. Isto sugere que a região circundante deve ser altamente conservada. Para comprovar esta ideia efetuou-se uma análise de homologia num segmento de 100 bp centrado no sitio Acc I de quatro genes de sequências publicadas que foram comparados como se mostra na figura 40. Pode-se notar que a homologia desta região entre cêpas de B. stearothermophilus e de 100% e que entre esta especie e Drosophila é surpreendentemente alta, da ordem de 80%. Esta propriedade indica que a região ao redor dos sitios Acc I/Sal I deve ser muito importante para o correto funcionamento da proteina e por isso teve ser mantida através da evolução. Outro corolario importante dessa observação e que essa sequência extremamente conservada pode servir de partida na construção de uma sonda "universal" para o isolamento de genes de alfa amilase.

Figura 40:

Análise de homologia de um segmento de DNA de 100 bp contendo o sítio *Acc I* no centro.

As regiões de homologia entre dois genes estão aqui representadas em formas de "blocos de homologia", onde se compara a sequência de *B. stearothermophilus*-1 (Nakajima et al., 1985) com as de *B. stearothermophilus*-2 (Ihara et al., 1985), *D. melanogaster*-3 (Boyer & Hickey, 1986) e *B. subtilis*-4 (Yang et al., 1982).

Os números acima e abaixo dos blocos se referem ao número de ordem do nucleotídeo na sequência publicada, a partir da primeira base do codon de iniciação. As regiões achurçadas corespondem a homologia de 100% entre a sequência superior e a inferior.

V . CLONAGEM DO GENE DE ALFA-AMILASE DE B. STEAROTHERMOPHILUS EM B. SUBTILIS.

O genero Bacillus e conhecido como produtor de grandes quantidades de proteínas que são liberadas para o meio e alem disso, por não ser patogênico. São estas as bases do interesse na investigação biotecnológica deste microorganismo. Outras vantagens na produção extracelular, ao invés de intracelular, de proteínas heterologas, incluem a ausência de metionina amino terminal e a facilidade com que as proteínas secretadas formam pontes dissulfeto (Pollit & Zalkin, 1983).

Em muitos casos as mencionadas vantagens se traduzem em beneficios econômicos que apontam esse microorganismo com o adequado nos processos de produção industrial de proteínas de diversas origens.

Um dos objetivos deste trabalho e justamente o de obter cêpas de B. subtilis com alto potencial de produção da enzima alfa-amilase originária de outro microorganismos do gênero Bacillus. A tabela III é um sumário dos experimentos executados com a mencionada finalidade. Sua inspecção mostra uma considerável dispersão nos resultados e, em poucos casos se obtiveram colônias produtoras de alfa amilase. Estas, inclusive, perderam essa característica após algumas gerações. As únicas exceções a esse comportamento são as representadas pelas cêpas B. subtilis IA289 ami 70 e B. subtilis BD241 ami 2, obtidas nos experimentos 7 e 17 respectivamente. Outra observação importante e que na maior parte dessas experiências, foi impossivel recuperar o vetor transformante na sua forma inicial (exp 1 a 15). Em vez dele, se detecta nos géis de agarose uma banda complexa que migra na região de 23 Kb (figura 33) e que em CsCl tem um comportamento intermediário entre o de DNA cromossomal e plasmidial. Esse DNA quando usado para transformar células de E. coli ou de B. subtilis e incapaz de conferir-lhes capacidade amilolitica embora torne essas células resistente a cloranfenicol. Isto sugere que o vetor tenha sido modificado após a transformação de B. subtilis.

O aparecimento em alguns experimentos de cêpas com o fenotipo Amy⁺ pode, portanto, ser interpretado com devido a integração do gene dessa enzima no cromossomo bacteriano por recombinação. Estas observações, contudo, não estão de acordo com

resultados anteriores obtidos com o uso de vetores e hospedeiros idênticos aos usados em nossos experimentos (Tsukagoshi, N; comunicação pessoal). A suposta integração de fragmentos do vetor transformante aparentemente não se deve as sequências que codificam para o gene de alfa amilase ou mesmo as que flaqueiam esse gene. Os dados dos experimentos 13, 14, 15 sugerem que o vetor pC194 (usado para construir pHV 33 e pUSP 33.2) deve estar implicado no processo. Além disto, algumas das cêpas hospedeiras (IA289 e BD170) que foram aqui utilizadas, devem possuir um sistema de recombinação funcional.

Dados de outros autores parecem esclarecer o que ocorreu nestes experimentos. O plasmideo pC194 gera grandes quantidades de DNA de fita simples durante sua replicação em B. subtilis (Ehrlich et al., 1986), e esta estrutura aumenta o número de eventos de recombinação nessas células (Hotchkiss, 1974; Meselson & Radding, 1975). Além disto, as sequências repetidas que existem em pC194 (Hardy, 1985) podem estar diretamente relacionadas com altas frequências de recombinação (Niaudet et al., 1984; Erlich et al., 1986).

Se estes dados tiveram relação com os resultados dos experimentos 1 a 15 da tabela III, espera-se que ao empregar células hospedeiras que não possuam sistema ativo de recombinação e vetores sem sequências de pC 194, se obtenham transformantes amilolíticos e deles se recupere o vetor na forma original. Como esses plasmideos existem em Bacillus num razoável número de cópias (aproximadamente 50 por célula, segundo Gryczan et al., 1978), pode-se supor que suas células expressem alfa-amilase ativamente. Usaram-se as cêpas BD 224 (rec E) e BD 241 (rec E, Amy E) que não possuem sistema ativo de recombinação (Dubnau, D.; comunicação pessoal).

Ao mesmo tempo, construiu-se um novo plasmideo (figura 37), que ao invés das sequências de pC 194, possui as de pUB 110. Estas geram pequenas quantidades de fita simples durante a replicação em B. subtilis (Ehrlich et al., 1986) e não possuem repetições (Sueoka et al., 1986). Para que este vetor possa replicar em E. coli, ele foi ligado como se mostra na figura 36 a pBR 327. O plasmideo resultante, pBU 271, foi usado pra introduzir o fragmento ami 2 que contém o gene de alfa-amilase, em B. subtilis. As cêpas resultantes além de fortemente amilolíticas, possuem um vetor que, quando clivado com várias enzimas de

restrição em nada difere do usado para transformar as células de B. subtilis.

Estes fatos sugerem que a cepa B. subtilis IA289 ami70, considerada um importante produto deste trabalho devido a sua grande atividade amilolítica, possui o gene de alfa amilase de B. stearothermophilus integrado de forma estável no cromossomo. Para confirmar esta ideia foram feitas hibridizações. Surpreendente, no DNA cromossomal dessa cepa foram detectadas sequências homólogas a pBR322, mas ^{um} a pC194 ou ao gene de alfa amilase. Este resultado aliado a que nela não conseguimos detectar a enzima heteróloga usando o antisoro correspondente, que esta não possui o ótimo de temperatura esperado (72°C; ver fig. 35) e que seu padrão de dextrinas ao digerir amido difere do de alfa amilase de B. subtilis ou de B. stearothermophilus (figura 34) tornam complicada a análise do que ocorreu durante a produção da cepa B. subtilis IA289 ami70.

Alternativamente, estes resultados poderiam ser explicados pela recombinação entre regiões homólogas do gene original e do introduzido, o que teria gerado uma proteína híbrida extremamente ativa. Experimentos adicionais para esclarecer o que ocorreu estão em andamento.

RESUMO

O DNA de plasmídeos naturais de uma célula de B. stearothermophilus foi clivado com a enzima de restrição Hind III e os fragmentos resultantes foram ligados com T4 DNA ligase ao vetor pBR 322 (Bolivar et. al., 1977), que já havia sido previamente tratado com Hind III e fosfatase alcalina.

A terça parte desta mistura de ligação foi usada para transformar células de E. coli HB 101. Foram obtidos cerca de 3.500 transformantes, dos quais 46% eram recombinantes. Duas células que mostraram carácter amilolítico consideravelmente maior que a doadora do gene continham o plasmídeo pBR 322 com uma inserção de 5.4 Kb. O mapa de restrição, tratamento com a enzima BAL 31 e sucessivas subclonagens (Silva, E.F. et.al., 1986) mostraram que o gene que codifica e expressa a enzima amilolítica está contido em um fragmento de 2 Kb.

A enzima produzida pelas células transformadas tem peso molecular de 60.000, é estabilizada por Ca^{+2} , tem um ótimo de temperatura de 72°C e retém 90% da atividade original após aquecimento à 85°C por 1 hora. Estes resultados, em conjunto com a análise dos produtos de hidrólise desta enzima em cromatografia de papel, sugerem que foi clonada a alfa-amilase de B. stearothermophilus em células de E. coli.

Células de duas células de B. subtilis, IA 289 e BD 241 foram transformadas respectivamente com os plasmídeos p USP 33.2 (Silva, E.F. et al., 1986;1987) e p BU 217 ami 2 (Silva, E.F.

& Pueyo, M.T., 1988) para produzir em ambos os casos colônias fortemente amilolíticas. Os mecanismos pelos quais as 2 cêpas passaram a apresentar o fenótipo AMY +, são provavelmente diferentes.

SUMMARY

The DNA of natural plasmids from a B. stearothermophilus strain was cut with Hind III endonuclease and the resulting fragments were joined with T4 DNA ligase to the vector pBR 322 (Bolivar et al., 1977), which had previously been treated with Hind III and alkaline phosphatase.

One-third of the ligation mixture was used to transform E. coli HB 101 cells. It was obtained about 3.500 transformants, which included 46% recombinants. Two strains displaying amylolytic activity remarkably higher than the donor gene strain, harbored the plasmid pBR 322 with an insertion of 5.4 Kb. The restriction map, Bal 31 treatment and successive sub-cloning (Silva, E.F et al., 1986) showed that the entire gene which codifies and allows the expression of the amylolytic enzyme is contained in a 2 Kb fragment.

The enzyme has a molecular weight of 60.000, is stabilized by Ca^{+2} , has a temperature optimum at 72°C and retains 90% of the original activity after heating for 1 h at 85°C. These features, together with the analysis of hydrolysis products carried on paper chromatography, suggests that we succeeded in cloning the amylase from B. stearothermophilus in E. coli cells.

Cells from two B. subtilis strains, IA 289 and BD 241 were transformed with the plasmids p USP 33.2 (Silva, E.F. et al., 1986 1987) and pBU 271 ami 2 (Silva, E.F. & Pueyo, M.T., 1988), and produce in both strains, amylolytic colonies. The methods in which the two strains have got the AMY+ fenotype, may be very different.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aiba, S; Kitai, K; Imanaka, T.: Cloning and Expression of thermostable α -amylase gene from Bacillus stearothermophilus in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis: Applied and Env. Microbiol. nov., 1059-1065 (1983).
2. Alonso, J.C. Trautner, T.A.: A gene controlling segregation of the Bacillus subtilis plasmid pC 194. Mol. Gen. Genet. 198: 427-431 (1985).
3. Aspinall, G.O.: in Polysaccharides. Pergamon press. 1970.
4. Aubert, E; Klier, A; Rapoport, G.: Cloning and expression in Escherichia coli of the regulatory sac U gene from Bacillus subtilis. J. of Bacteriol. 161(3): 1182-1187(1985).
5. Bailey, J.M and Whelan, W.J.: Physical Properties of Starch. I) Relationship between iodine stain and chain Length. J.Biol. Chem. 236,969 (1961).
6. Bak , A.L.; Christiansen, C; and Stedenrup, A: Bacterial genome sizes determined by DNA renaturation studies. J. Gen. Microbiol. 64:377 (1970).
7. Banks, W; Greenwood, C.T.; Muir, D.D.: in Molecular Structure and function of food Carbohydrate: Chapter II. Edited by GG Birch e LF Green. Applied Science publishers LTD London, 1973.
8. Banks, W; Muir. D.D; Structure and Chemistry of the Starch Granul. In the Biochemistry of Plants. Stumpf & Cohn Academic Press, Inc. (1980).
9. Birboin, A.C; Doly, J: A rapid alkaline extration procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 7, 1513 (1979).
10. Birdsell, D.C and Cota-Ribles E.H. Production and ultrastuture of lysozyme and Ethylenediaminetetracetate-lysozyme

Spheroplasts of Escherichia coli. J. of Bacteriol. 93(1) 427-237 (1967).

11. Bolivar F., Rodriguez, R.L., Greene P.J., Betlach, M.C; Heyneker, H.L; Boyer, H.W.: Construction and characterization of new cloning Vehicles: II: A multipurpose cloning system. Gene 2:95-113 (1977).
12. Boyer, H.A; Shepard, H.M: Strategies for optimizing foreign gene expression in Escherichia coli in Gene: Structure and expression: 205-248, Edited by A.M. Kroon, (1983).
13. Boyer, H.W and Roulland-Dussoix D : A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41: 459 (1969).
14. Boyer, H.P.& Hickey, A.D: The alpha-amylase gene in Drosophila melanogaster: nucleotide sequence, gene struture and expression motifs. Nucleic Acids Research 14: 8399 (1986)
15. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochem 72: 248-254 (1976).
16. Chang, S.; Cohen, S.N.: High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplast by plasmid DNA. Mol. Gen. Genet. 168, 111-115 (1979).
17. Charkrabarty, A.M.: In Genetic Engineering. CRC press. (1978).
18. Clewell, D.B. and Helinski, D.R.: The effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of suocer coiled Col E 1 DNA and protein in E. coli . J. Bacteriol. 110, 1135 (1972).
19. Clewell, D.B.; Yagi Y; Bauer, B.: Plasmid-determined tetracycline resistance in Streptococcus faecalis: evidence for gene amplification during growth in presence of tetracycline. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1720-1721 (1975).

20. Cornelis, P; Digneffe, C, Willermot K: Cloning and Expression of Bacillus coagulans amylase gene in Escherichia coli. Mol. Gen. Genetic. 186: 507-511 (1982).
21. Cox, L.J.; Cohen, D; Whitaker, A: A comparison of two methods for the demonstration of multiple forms of alpha-amylase from Bacillus stearothermophilus. Science tools 28: 10(1981)
22. Curtiss, R.; Charamella, L.J.; Berg, C.M. and Harris, P.E.: Kinetic and genetic analysis of D-cicloserina inhibition and resistance in Escherichia coli. J. Bacteriol. 90: 1238 (1965).
23. Debabov, V.G.: The industrial use of Bacilli. In The Molecular Biology of the Bacilli. Edited by D. Dubnau Academic Press, Inc. (1982).
24. de Vos, W.M; Venema G; Canosi, V; Trautner, T.A: Plasmid transformation in Bacillus subtilis. Fate of Plasmid DNA. Mol. Gen. Genet. 181: 424-433 (1981).
25. de Vos; W.N., Venema, G: Fate of Plasmid DNA in competent cells and protoplast of Bacillus subtilis. In Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli. 211-225. Academic Press (1982).
26. Dubnau, D. Goldthwaite, G; Smith I e Marmur, J. Genetic Mapping in Bacillus subtilis. J.Mol. Biol. 27, 163-185 (1967).
27. Dubnau, D; Davidoff-Abelson R, Scher, B; Cirigliano, C: Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent Bacillus subtilis: Phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants. 114: 273(1973).
28. Dugaiczky, A; Borger H.W.; Goodman H.M: Ligation of Eco RI Endonuclease-generated DN A Fragments into linear and circular strutures. J.Mol. Biol. 96: 171-184 (1975).
29. Ehrlich, S.D: DNA cloning in Bacillus subtilis Proc. Natl. Sci. USA 75(3) 1433-1436 (1978).

30. Ehrlich, S.D.: Replication and expression of plasmid from Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation into Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 14, 1680-1682 (1977).
31. Eibl, H & Trauble, H: Eletrostatic effects on lipid phase transition: Membrane struture and ionic enviroment. Proc. Nat. Acad Sci USA 71: 214 (1972)
32. Farrel, J; Campbell, L.L: In Thermophilic Bacteria and Bacteriophages. Adv. Microbiol. Physiology. Edited by A.H. Rose e J.F. Wilkinson. Vol. 3. 83-106. Academic Press - London - N.Y. (1969).
33. Ferrari F.A; Nguyen, A; Lang, D; Hoch, J.A.: Construction and Properties of an integrable plasmid for Bacillus subtilis. J.of Bacteriol. 154(3) 1513-1515 (1983).
34. Fisher, E.H, Stein, E.A.: " α -amylase". in Enzymes: 4, 313-343 (1960).
35. French, D: Chemistry and Biochemistry of Starch. in Biochemistry of Carbohydrates - Vol. 5, 267-355. London (1975).
36. Garrels, J.I.: Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins sintetized by clonal cell lines: J.Biol. Chem. 254: 7961-7977 (1979).
37. Gelfand, D,H; Shepard, H.M; O'Farrel,D.H; Polisky,B: Isolation and characterization of a Col E₁-derived plasmid copy-number mutant. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 75: 5869 (1978).
38. Gray, G.L; Mainzer, S.E; Rey, M. W; Lamsa, M.H; Vindle, K.L; Carmona,C; Requadt, C. Estrutural genes encondig the thermophilic α -amylases of Bacillus stearothermophilus and Bacillus licheniformis. J. of Bacteriol, 166(2) 635-643 (1986).
39. Greenwood, C.T., Milne, E.A.: Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. Advan. Carbohydrate Chem. 23,281-366 (1968).
40. Gryczan, T. Contente, S; Dubnau, D: Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a

plasmid vector and a homologous resident plasmid in Bacillus subtilis. Molec. Gen. Genet. (177): 459-467 (1980).

41. Gryczan, T.J, Contente, S., Dubnau D: Characterization of Staphylococcus aureus plasmids introduced by transformation in Bacillus subtilis. J. of Bacteriol 134, 318-329 (1978).
42. Gryczan, T; Shivakumar, A.G; Dubnau, D. Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in Bacillus subtilis. J. of Bacteriol 141(1): 246-253 (1980).
43. Gryczan T.J, Dubnau D. : Construction and properties of chimeric plasmids in Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1428-1432 (1978).
44. Gryczan, T.J: Molecular Cloning in Bacillus subtilis. in The Molecular Biology of the Bacilli. edited by D. Dubnau. Academic Press, Inc. (1982).
45. Guttererson, N.I. Kosland Jr, D.E: Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered "in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4894-4898 (1983).
46. Halpern, M. Leibowitz, J: On The mechanism of the glucosidic bond cleavage in the enzymatic hidrolisis of starch. Biochim. Biophys. Acta, 36, 29 (1959).
47. Hanahan, D: Studies an transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol Biol 166, 557-580 (1983).
48. Hardy, K.G: Bacillus Cloning Methods. in DNA cloning Vol. I: a practical approach. Edited by D.M. Glover. IRL Press (1985).
49. Hasegawa, A; Miwa, M; Oshima T. and Imahori, K. Studies on an α -amylase from a thermophilic bacterium. I. Purification and characterization. J. Biochem (Tokyo) 79, (1) 35-42 (1976).
50. Henner, D.J; Hock, J.A: The genetic map of Bacillus subtilis in The Molecular Biology of the Bacilli. Vol. I Edited by David Dubnau. Academic Press, Inc. (1982).

51. Hershifield, V; Boyer, H.W.; Yanofsky, C.; Lovett, M.A. and Helinsky, D.R.: Plasmid Col E1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3455, (1974).
52. Hitotsuyanagi, K, Yamane K, Maruo, B: Stepwise Introduction of regulatory genes stimulating production of α -amylase into Bacillus subtilis : Construction of and α -amylase extrahyper producing strain. Agric. Biol. Chem 43(11) 2313-2349 (1979).
53. Holland, I.S; Mackman, N, Nicaud J.M: Secretion of Proteins from Bacteria. Biotechnology 4: 427-431 (1986).
54. Horinouchi, S; Weisblum, B.: Nucleotide sequence and functional map of pC 194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. J.of Bacteriol 150, 815-825 (1982).
55. Hitotsuyahagi, K; Yamane, K; Maruo, B.: Stepwise introduction of regulatory genes stimulanting production of α -amylase into Bacillus subtilis. Construction of an α -amylase extrahyperproducing strain. Agric. Biol. Chem. 43: 2343-2349 (1979).
56. Ihara, H; Sasaki, T; Tsuboi, A; Yamagata, H; Tsukagoshi, N; Udaka, S: Homology between procariotic and eukariotic α -amylase. J.Biochem. 98: 95-103 (1985).
57. Imanaka, T. Fujii, M; Aiba, S; Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmid from thermophilic Bacilli and construction of deletion plasmids. J.of Bacteriol. 146(3): 1091-1097 (1981).
58. Imanaka, T; Fujii, M; Aramori, I; Aiba, S: Transformation of Bacillus stearothermophilus with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis. J.of Bacteriol 149(3): 824-830 (1982).
59. Jalanko, A; Palva, I.; Soderlund, H. : Restriction maps of plasmids pUB 110 e pBD9. Gene, 14: 325-328 (1981).

60. Janmière, L; Niaudet, B; Pierre, E.; Ehrlich, SD: Stable gene amplification in the chromosome of Bacillus subtilis. Gene 40: 47-55 (1985).
61. Kafalos C.F; Jones, W.C; Efstratiadis, A: Determination of Nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hydridization procedure. Nucleic Acid Research 7(6) 1541-1552 (1979).
62. Kavenoff, R: Characterization of the Bacillus subtilis W23 genome by sedimentation. J. Mol. Biol. 72: 801 (1972)
63. Keggins, K.M; Lovett, P.S; Duvall, E.J: Molecular cloning of genetically active fragments of Bacillus DNA in Bacillus subtilis and properties of the vector plasmid pUB110. Proc. Natl .Acad. Sci. 75: 1423 (1978).
64. Klein, B; Foreman, J.A; Searcy, R.L.: The synthesis and utilization of Cibachron Blue-Amylose: a new chromogenic substrate for determination of amylase activity. Anal. Bioch. 31: 412-425 (1969).
65. Klotz, L; and Zimm B: Size of DNA determined by viscoelastic meausurements: Results on bacteriophages Bacillus subtilis and Escherichia coli. J. Mol. Biol. 72: 779 (1972).
66. Kosland, D.E: in Mechamism of Enzyme Action. W.D. McElroy and B.Glass, eds, John Hopkins Press, Baltime, (1954).
67. Laemli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 227, 680-685 (1970).
68. Le Hegarat, J.C and Agnostopoulos, C.:Detection and characterization of naturally occuring plasmids in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 157, 167-174 (1977).
69. Liao H; Mackenzie, T; Hageman, R: Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 576-580 (1986).
70. Lippert, J.L. & Peticolas, W.L.: Laser Raman investigation of the effect of cholesterol on conformational changes in

Dipalmitoyl lecithin multilayers. Proc. Natl. Acad. Sci USA 68: 1572 (1971).

71. Loffer, A.: Proteolytic Enzymes. Sources and applications. Food Technology, Jan, 63-70 (1986).
72. Lovett, P.S and Bramucci, M.G. Plasmid deoxyribonucleic acid in Bacillus subtilis and Bacillus pumilus. J. Bacteriol. 124, 484-490 (1975).
73. Lovett, P.S and Bramucci M.G. in "Microbiology, 1976" edited by D. Schlessinger. American Society for Microbiology Washington, D.C. 388-393 (1976).
74. Lunn, C.A.; Takahara, M; Inouye, M: Use of secretion cloning vectors for guiding the localization of proteins in Escherichia coli. Methods in Enzymology 125: 138 (1986).
75. Mandel, M; Higa A - Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159 (1970).
76. Maniattis, T. Fristschi, E.F; Sambrook, J: Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
77. Manning, G.B; Campbell, L.L.: Thermostable α -amylase of Bacillus stearothermophilus I. Crystallization and some general properties. J. Biol. Chem. 236: 2952-2957 (1961).
78. Manning, G.B; Campbell, L.L: Canad. J. Microbiol. 3, 1001 (1957).
79. Mattes, R. Burkardt, H, J; Schmitt, R: Repetition of tetracycline resistance determinant genes on R plasmid pRSD1 in Esterichia coli Mol. Gen. Genetic 168: 173-184 (1979).
80. Mayer, F.C.; Larner, J: Substrate cleavage points of α - and β -amylases Biochim. Biophys Acta, 29, 465 (1958).
81. Michel, B; Niaudet, B; Ehrlich, S.D: DNA Cloning in Bacillus subtilis. Transformation of competent cells by internally repeated plasmids. Molecular cloning and gene regulation in Bacillus, 73-120. Academic Press (1982).

82. Mielenz, J.D.: Bacillus stearothermophilus contains a plasmid-borne gene for α -amylase. Proc. Natl. Acad. Scie. USA: 80, 5975-5979 (1983).
83. Moran, C.P; Lang,N; Le Grice, F,J; Lee,G; Stephens, M; Sonenshein, A.L; Pero, J.; and Losick, R: Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 186: 339 (1982).
84. Mottes, M; Grandi, G; Sgaranella, V.Canosi, O. Morelli G; Trautner, T.A: Different Specific activities of the monomeric and oligomeric forms of plasmid DNA in transformation of Bacillus subtilis an E. coli. Molec. Gen. Genet. 174: 281-286 (1979).
85. Murphey, W.H, Barkaby, C; Lin, F.J, Kaplan, N.O : Malate dehydrogenases: II- Purification and Properties of Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli malate dehydrogenases. J. Biol. Chem 242, 1548 (1967).
86. Nakajima, R.; Imanaka T; Aiba, S: Nucleotide sequence of the Bacillus stearothermophilus α -amylase gene. J. of Bacteriol. 163(1): 401-406 (1985).
87. Neugebauer, K; Sprengel, R. and Schaller, H. Penicillinase from Bacillus licheniformis: nucleotide sequence of the gene and implications for the biosynthesis of a secretory protein in a Gram-positive bacterium. Nucleic Acids Research. 11, 2577-2588 (1981).
88. Niaudet, B; Janniere, L; Ehrlich, SD: Recombination between repeated DNA sequences occurs more often in plasmids than in the chromosome of Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 197: 46-54 (1984).
89. Nicholson, W.L; Chambliss, G.H: Molecular Cloning of cis-Acting Regulatory Alleles of the Bacillus subtilis Amy R Region by using gene conversion transformation. J. of Bacteriol. 165(3): 663-679(1986).
90. Obata, R.T; Silva,E.F; Pueyo M.T.: Study of amylolytic activity from E.coli cells transformed by the gene of a

thermostable α -amylase. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 30 (1):45 (1988)

91. O'Farrell, P.Z: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins: J. Biol. Chem. 250: 4007-4021 (1975).
92. Orlepp, A.S; Ollington, F.J; McConnell, J.D. Molecular cloning in Bacillus subtilis of a Bacillus licheniformis gene encoding a thermostable α -amylase. Gene 23:267-276 (1983).
93. Otozai K; Yamane K: Instability of a chimeric plasmid containing Bacillus subtilis aro T^+ Tmr B genes, pBR322 and pUB110, during Bacillus subtilis transformation: Agric. Biol. Chem. 49(2) 351-357 (1985).
94. Oshima, T. Structural and Functional Analysis of thermophile Proteins. in Protein Engineering: applications in Science, Medicine and Industry. Edited by Masayori Inouye and Raghupathy Sarna. Academic Press, Inc. 81-91 (1986).
95. Duchterlony, O. Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. Ann. Arbor. Sci. (1968).
96. Palva, J. Molecular cloning of α -amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens and its expression in Bacillus subtilis. Gene 19: 81-87 (1982).
97. Palva, I; Pettersson, R.F, Kalkkinen, N, Lehtovaara, P. Sawas, M, Soderlund, H; Takkinen, K; Kaariainen L: Nucleotide sequence of promoter and NH_2 - terminal signal Peptide region of the α -amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens. Gene 15 43-51 (1981).
98. Parzur, J.H; Okada, S: A Novel Method for the Action Patterns and the differentiation of D-1,4-glucan hydrolases. JBC: 241: 4146 (1986)
99. Pechke, V; Benck, V; Bujard, H; Gentz, R; Le Grice, S: Efficient utilization of E. coli transcriptional signals in Bacillus subtilis . J. Mol. Biol 186: 547-555 (1985).
100. Peterson, B.C; Rownd, R.H: Homologous sequences other than insertion elements can serve as recombination sites in

- plasmid drug resistance que amplification. J.Bacteriol 156: 177-185 (1983).
101. Pfueller, S.L; Elliot, W.H: The extracellular α -amylase of Bacillus stearothermophilus. J.Biol. Chem. 244-48 (1969).
 102. Piggott, R; Rossiter, A; Ortlepp, S.A; Pembroke, J.T; Ollington, J.F: Cloning in Bacillus subtilis of an extremely thermostable α -amylase: Comparison with other cloned heatstable α -amylase. Bioch. Bioph. Research. Com. 122(1) 175-183 (1984).
 103. Pollit, S and Zalkim, H: Role of primary struture and disulfite bond formation in β -Lactamase secretion. J. Bacteriol. 153: 27 (1983).
 104. Pustell, J & Kafatos F.C. : A convinient and adaptable package of DNA sequence analysis programs. Nucleic Acids Research 10:51 (1982).
 105. Pustell, J & Kafatos F.C. : A high speed, high capacity homology matriz: zooming through SV40 and polyoma. Nucleic Acids Research 4765 (1982).
 106. Preiss, J; Levi, C.: Starch Biosynthesis and Degradation.The Biochemistry of Plants,Academic. Press. Inc. Vol. 3, 371-423 (1980).
 107. Priest, F: Extracelular enzyme synthesis in the genes Bacillus. Bacteriol. Derieiros 41: 711-753 (1977).
 108. Radly, J.A. in Examination and analysis of starch and starch products: Applied Science publishers LTD, London; edited by J.A. Radley, (1976).
 109. Randall, L; Hardy, S.J.S: Export of Protein in Bacteria. Microbiol. Reviews, Dec: 290-298 (1984).
 110. Rapoport, G; Klier, A; Billault, A; Fargette, F; Dedonder, R.: Construction of a colony bank of E. coli containing hibrid Plasmids representative of the Bacillus subtilis 168 genome. Molec. Gen. Genetic. 176: 239-245 (1979).

111. Rinderknecht, H; Wilding, P; Haverback, B.J: A new method for the Determination of α -amylase. *Experientia*, 23: 805 (1967).
112. Robyt, J; French D: Action Pattern and Specificity of an amylase from Bacillus subtilis. *Arch. Bioch. Biophi.* 100,451-467 (1963).
113. Rodriguez, R.G; Bolivar, K; Goodman, H.M, Boyer H.w & Behlach, M.: in ICN-UCLA Symposium of Molecular and Cellular Biology 5, 471-477 (1976).
114. Rodrigues, R. Tait,R: Recombinant DNA techniques: an introduction. Addison - Wesley publishing company (1983).
115. Rudolph, C.F, Schmidt B.J; Saunders, C.W : Transformation of Bacillus subtilis by single-stranded plasmid DNA. *J.of Bacteriol* 165(3): 1015-1018 (1986).
116. Sadoff, H.L: *Prog. Ind. Microbiol.* 11, 1-27 (1972).
117. Satoh, H; Nishida, H; Isono, K: Evidence for movement of the α -amylase gene into two phylogenetically distant Bacillus stearothermophilus strains. *J.of Bacteriol.* 170(3): 1034-1040 (1988).
118. Silva, E.F.; Nonato,R.V.,Uehara, O.A; Huang, S; Yoshida, H.S; Lara, F.J.S, Santelli, R.V; Navarro, L.D; Pueyo, M.T. Cloning and expression of Bacillus stearothermophilus α -amilase in *E. coli*. *Brazilian J.Med. Biol. Res* 19 (4-5) 1986.
119. Silva, E.F; Nonato,R.V; Huang, S; Yoshida H; Uehara, O; Lara F.J.S.; Pueyo, M.T: Cloning and expression of a thermostable α -amylase in E. coli cells. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 30(1): 91 (1987).
121. Silva, E.F. e Pueyo M.T: Cloning B. stearothermophilus amylase gene into E. coli and B. subtilis cells: The use of new vector. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 31(1): 54 (1988).

121. Schibler, V; Tosi M; Pittet, A-C; Fabiani, L; Wellaner, P.K.: Tissue-specific expression of mouse α -amylase genes. J.Mol. Biol.: 142, 93-116 (1980).
122. Sekiguchi, J and Okada, H.: Regulation of α -amylase production in a Bacillus subtilis Marburg Strain I. Isolation of mutants which produce high levels of amylase and analysis of their enzymes. J. Ferment. Technol. 50: 801-809 (1972).
123. Sekiguchi, J; Takada, N; Okada, H: Genes affecting the productivity of α -amylase in Bacillus subtilis Marburg. J.of Bacteriol 121(2): 688-694 (1975).
124. Sibakov, M: High expression of Bacillus licheniformis α -amylase with a Bacillus secretion vector. Eur. J. Biochem. 155: 577-581 (1986).
125. Singleton R, Amehuhxen, 2: Proteins from thermophilic microorganisms. Bact Reviews 37: 320-342 (1973).
126. Soberon, X; Covarrubias, L and Bolivar, F: Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR 325. Gene 9: 287(1980).
127. Stephens, M.A.; Ortlepp S.A; Ollington, J.F; McConnell: Nucleotide sequence of the 5' Region of the Bacillus licheniformis α -amylase Gene: Comparison with the Bacillus amyloliquefaciens gene. J.of Bacteriol. 158(1): 369-372 (1984).
128. Sueoka, N; Hoshino, T, McKenzie, T; Sonis, D: Membrane binding and regulation of replication initiation of pUB 110 in Bacillus subtilis. in Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications. Edited by A.T. Gannesan e James A.Hoch. Academic Press. 47 (1986).
129. Sullivan, M.A.; Yasbin, R.E; Young, F.E : New shuttle Vectors for Bacillus subtilis and Escherichia coli with allow rapid detection of inserted fragments. Gene 29:21-26 (1984).
130. Southern, E.M: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98: 503-517 (1975).

131. Takeichi, Y; Ohmura, K; Nakayama, K. Oozai, K; Yamane, K:
Cloning of Bacillus subtilis α -amylase structural gene in
Plasmid pUB110: Agric. Biol. Chem 47(1) 159-161 (1983).
132. Te Riele, H; Michel, B; Ehrlich, S.D: Are single-stranded
circles intermediates in plasmid DNA replication? The
Embo. J. 5(3): 631-637 (1986).
133. Te Riele, H. Michel, S; Ehrlich, S.D: Single-Stranded plasmid
DNA in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. Proc.
Nath. Acad. Sci. USA: 83: 2541-2545 (1986).
134. Te Riele, H.P.J.; Venema G: Heterospecific transformation in
Bacillus subtilis : protein composition of a membrane -
DNA complex containing unstable heterologous donor-
recipient complex: Mol. Gen. Genet. : 197: 478-485 (1984).
135. Thudt, G; Scheleifer, K.H.; Gotz, F.: Cloning and expression
of the α -amylase gene from Bacillus stearothermophilus in
several staphylococcal species. Gene, 37: 163-169 (1985).
136. Trevelyan, W.E, Procter, D.P. e Harrison, J.S: Detection of
sugars on paper chromatograms. Nature 166-444 (1950).
137. Tsukagoshi, N; Ihara, H; Yamagata, H; Udoka, S: Cloning and
expression of a thermophilic α -amylase gene from Bacillus
stearothermophilus in Escherichia coli. Molec. Gen.
Genetic. 193: 58-66 (1984).
138. Tsukagoshi, N; Iritami, S; Sasaki, T; Takenura, T; Ihara, H;
Idota, Y; Yamagata, H, Udaka, S: Efficient synthesis and
secretion of a termophilic α -amylase by protein-producing
Bacillus brevis 47 carryng the Bacillus
stearothermophilus amylase gene . J. of Bacteriol 164(3):
1182-1187 (1985).
139. Ulmanen, I. Ludstrom, K, Lehtovaara, P, Sarvas, M. Ruohoneh
M, Palva, I. Transcription and translation of foreign
genes in Bacillus subtilis by the aid of a secretion
vector. J.of Bacteriol. 162(1): 176-182 (1985).
140. Wasserman, P.B.: Thermostable enzyme production. Food
technology February: 78-98 (1984).

141. Watanabe, K; Shimima, M; Oshiwa, T. Heat-induced Stabilitity of RNA from an extreme thermophile, Thermus thermophilus. Biochem. Biophys. Res. Commum 72, 1137-1144 (1976).
142. Watson, M.E.E.: Compilation of published signal sequences. Nucleic Acids Research 12: 5145 (1984).
143. Weaver, L. H.; Kester, W. R. Ten. Eyck, L. F; Matthews, B.W . in Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Edited by H. Zuber Birkhawser, Base 31-39 (1976).
144. Williamson, R: Genetic Engineering. Edited by Robert Williamson . Academic Press. 16 Volume 3 (1982).
145. Wilson, J.J. Ingledew, W.M: Isolation and characterization of Schwaniomyces alluvius amylolytic enzymes: Appl. and Env. Microbiol. 44(2): 301-307 (1982).
146. Yamaguchi, K.Nagata,Y; Maruo, B.: Genetic control of α -amylase synthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol 119: 410-415 (1974).
147. Yamazaki, H., Ohmura, K, Nakayama, A; Taveichi, Y;Otozai, K; Yamasaki, M, Tamura,G, Yamane,K.: α -amylase gene (amy R2 am e+) from a α -amylase hiperproducing Bacillus subtilis strain. Molecular cloning and nucleotide sequence. J.of Biol. 156(1): 327-337 (1983).
148. Yang, M; Galizzi, A; Henner, D: Nucleotide sequence of the amylase gene from Bacillus subtilis. Nucleic Acids Research 11: 237 (1982).
149. Yoneda, Y; Maruo, B: Mutation of Bacillus subtilis causing hiperproduction of α -amylase and Protease, and its Synergistic Effect. J. Bacteriol. 124: 48-54 (1975).
150. Yoneda, Y: Regulation of α -amylase production in Bacillus subtilis. in Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli , Academic Press 111-119 (1982).
151. Yoneda, Y; Yamane,K; Yamaguchi, K; Nagata, Y; and Maruo, B.: Transformation of Bacillus subtilis in α -amylase productivity by deoxyribonucleic acid from Bacillus

- subtilis Var amylosacchariticus. J. Bacteriol. 120: 1144-1150 (1974).
152. Young, F.F: Impact Cloning in Bacillus subtilis on Fundamental and Industrial Microbiology. J.of Gener. Microbiol. 119: 1-15 (1980).
153. Young, F.E.; Wilson, G.A.: Bacillus subtilis. in Handbook of Genetics. Edited by Robert C. King. Plenum Press. (1) 69-113 (1974).
154. Young, M: Gene amplification in Bacillus subtilis . J. Gen. Microb. 130: 1613-1621 (1984).
155. Yuki, S. On the gene controlling the rate of amylase production in Bacillus subtilis . Jpn. J. Genet. 50: 155-157.(1986).