



**Universidade:
presente!**

UFRGS
PROPEAQ



XXXI SIC

21. 25. OUTUBRO • CAMPUS DO VALE

Evento	Salão UFRGS 2019: SIC - XXXI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Caracterização Físico-Química e Funcional de Fatores de Transcrição Dof de Eucalyptus grandis
Autor	YURI DA ROSA RIGO
Orientador	GIANCARLO PASQUALI

Caracterização Físico-Química e Funcional de Fatores de Transcrição Dof de *Eucalyptus grandis*

Yuri da Rosa Rigo, Giancarlo Pasquali

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências e Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

A regulação da gênese da madeira representa uma das áreas de mais alta complexidade no estudo de plantas. A família de fatores de transcrição Dof (ligação a DNA com um dedo, do inglês, ‘DNA binding with One Finger’) compreende proteínas exclusivas de plantas, caracterizadas pela presença de um motivo de ligação ao DNA semelhante ao domínio ‘dedo-de-zinco’ (do inglês, ‘zinc finger’). Estas proteínas podem agir tanto como ativadores quanto repressores da transcrição gênica e parecem ter evoluído para controlar a expressão de genes de processos característicos de plantas. Considerando o número de fatores Dof descritos em plantas bem como a diversidade de metabolismos controlados por estas proteínas, a manipulação gênica dos genes codificadores oferece grande potencial para a obtenção de plantas mais produtivas ou com características mais benéficas às práticas agrossilviculturais. A partir de resultados anteriormente obtidos pelo grupo com a caracterização filogenética e dos perfis de expressão dos genes *Dof* de *Eucalyptus grandis*, foram identificados três genes *Dof* de *E. grandis* com perfil de expressão preferencial em tecidos vasculares, os genes *D00607*, *D01698* e *K00405*. Uma das etapas para o estudo destes três genes é a obtenção e purificação das proteínas codificadas por eles. Diferentes condições de expressão heteróloga foram anteriormente testadas utilizando o vetor pGEX-4T-1 e diversas linhagens de *Escherichia coli*. No entanto, nenhum dos testes resultaram satisfatórios: as proteínas foram expressas em corpos de inclusão ou em baixíssimas concentrações, o que dificultou a purificação e a obtenção de quantidades apreciáveis. Portanto, neste trabalho, optou-se por utilizar o plasmídeo pET-15b (Novagen), o qual codifica uma cauda de histidina fusionada à porção N-terminal da proteína que aumenta a solubilidade e facilita sua purificação. Sequências dos sítios de clivagem das enzimas NdeI e BamHI foram adicionados aos *primers forward* e *reverse*, respectivamente. *Amplicons* dos três genes foram obtidos a partir de PCRs dos cDNAs e purificados utilizando um *kit* de purificação de DNA (Ludwig Biotech). Todos os genes foram clivados com as enzimas BamHI (Promega) e NdeI (NE Biolabs), possibilitando, assim, a ligação dos insertos ao plasmídeo. Posteriormente, foi realizada a inserção dos produtos da clonagem, via transformação por choque-térmico, em *E. coli* DH5 α . Para confirmar a presença dos genes *Dof*, realizou-se a extração e purificação dos mesmos e, em seguida, a clivagem com as enzimas de restrição HindIII e XbaI (Promega). Confirmadas as bandas de tamanho esperado, os genes em pET-15b foram então sequenciados integralmente, comprovando-se a identidade das sequências. Como resultado, as três ORFs foram amplificadas e inseridas em *E. coli* Lemo21(DE3) para futura expressão, purificação e caracterização das proteínas Dof de *E. grandis*.