

## Avaliação de métodos para extração e purificação de dsRNA produzido em *Escherichia coli* (HT-115) para o controle de *Diaphorina citri* via RNA interferente

Thaís de Jesus dos Santos<sup>1</sup>; Layanna Rebouças de Santana Cerqueira<sup>1</sup>; Eduardo Chumbinho de Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, BA, bolsista FAPESB, [thais.js16@hotmail.com](mailto:thais.js16@hotmail.com); <sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, [eduardo.andrade@embrapa.br](mailto:eduardo.andrade@embrapa.br)

O Huanglongbing (HLB) dos citros, reconhecida como a doença mais devastadora da citricultura mundial, foi detectada no estado de São Paulo em 2004 e atualmente está presente no Paraná e Minas Gerais. No país a doença é causada principalmente pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C.Las), transmitida pela espécie de psílido *Diaphorina citri*. Estratégia de controle baseada na tecnologia de RNA de interferência (RNAi) vem sendo desenvolvidos atualmente *D. citri*. O uso da tecnologia de RNAi depende do estabelecimento de sistemas de produção de dsRNA em larga escala e baixo custo. O uso de estirpes de *Escherichia coli* como a HT-115, para a produção de RNA de fita dupla (dsRNA) pode ser uma estratégia eficaz devido à facilidade de manuseio e à alta taxa de crescimento e expressão de moléculas heterólogas. O objetivo deste trabalho foi a avaliação de diferentes métodos para a extração e purificação de dsRNA produzido em *E. coli*. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), Cruz das Almas, BA. Foram testados três métodos para a extração do dsRNA: (1) lise por temperatura associado à extração orgânica: o pellet de bactéria foi ressuscitado em 1 mL de uma solução SDS 0,1%, fervido por 2 minutos a 95 °C e colocado no gelo. Foram adicionados 1 mL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturado e centrifugado a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e o dsRNA foi precipitado pela adição de 0,7 V de isopropanol e centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em 100 µL de água livre de nucleases. (2) lise por sonicação associado à extração orgânica: difere do método 1 apenas no processo de lise, que foi realizado pela incubação da suspensão bacteriana em sonificador de banho por 5 minutos; (3) lise alcoólica sem extração orgânica: o pellet bacteriano foi ressuscitado em álcool etílico 75% e incubado por 10 minutos. A produção de dsRNA seguiu um protocolo padrão a saber: um pré-inóculo foi preparado transferindo uma colônia de *E. coli* HT-115 / T7 express para 5 mL de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C / 250rpm por 16 horas. Em seguida, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferido para um tubo contendo 10 mL de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C / 250 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. A suspensão bacteriana foi induzida a produzir o dsRNA pela adição de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a uma concentração final de 0,4 mM quando a DO<sub>600</sub> atingiu 0,4. Ao atingir uma leitura de DO<sub>600</sub> igual a 1,0, a bactéria foi coletada por centrifugação a 5000 rpm / 5 minutos. Após a extração, 5 µL do dsRNA extraído foi tratado com DNase e RNase e analisado em gel de agarose 1,5%. A imagem do gel foi capturada utilizando sistema Kodak Gel Logic 200. Todos os métodos resultaram na obtenção do dsRNA em quantidades similares, porém os que contaram com extração orgânica resultaram em uma solução de dsRNA de melhor qualidade. A extração por lise alcoólica tem menor custo, podendo ser uma opção para situações que seja aplicado diretamente o extrato bruto de bactérias.

**Significado e impacto do trabalho:** Microrganismos como a *Escherichia coli* são extremamente úteis para a produção de biomoléculas para diferentes aplicações na agricultura. Este trabalho possibilitou a seleção de métodos para a purificação de moléculas de dsRNA produzidas em *E. coli* que poderão ser utilizados em processos de produção em larga escala.