

Produção de dsRNA em *E. coli* HT-115: viabilidade ao longo do tempo

Márcio Leandro da Silveira Fonseca¹, Eduardo Chumbinho de Andrade²

¹ Estudante de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bolsista da FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia), Cruz das Almas, BA; ² Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução: RNA interferente (RNAi) é um mecanismo natural de eucariotos e exerce um importante papel na regulação da expressão gênica e na defesa celular contra ácidos nucleicos invasores. O processo é ativado pela presença de moléculas de RNA de fita dupla (*double stranded* RNA ou dsRNA), ocasionando a degradação de RNAs homólogos ao dsRNA ativador. O uso de RNAi é um recurso potencial no controle ao Huanglongbing dos citros (HLB), por meio do uso de dsRNAs específicos para o controle do inseto vetor do HLB, o psilídeo *Diaphorina citri*. A presença de dsRNAs homólogos a genes essenciais ao psilídeo em brotações de citros acarretou elevada mortalidade nos insetos que se alimentaram nelas. A obtenção de dsRNA em grandes quantidades e baixo custo é essencial para a viabilidade da tecnologia de RNAi. Muitas pesquisas utilizam bactérias para a produção de dsRNAs através de processos fermentativos devido ao baixo custo envolvido, alta taxa de crescimento bacteriano e facilidade no manuseio. Uma das etapas deste processo de produção é a manutenção das estirpes de *E. coli* engenheiradas e dsRNA em meio de cultura sólido, que servem como inóculo inicial para o processo de produção de dsRNA.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade ao longo do tempo de bactérias engenheiradas para produção de dsRNA mantidas em meio de cultura sólido, visando estabelecer o período máximo de cultivo sem perda de rendimento. Além disso, foi avaliado o rendimento de dsRNA produzido ao se escalonar o volume de meio de cultura líquido de 10 mL para 100 mL e 500 mL.

Material e Métodos: O trabalho foi efetuado no laboratório de Virologia na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para os testes de viabilidade, a estirpe de *E. coli* HT115 contendo o gene Met-1, mantida em glicerol a -80 °C, foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de ampicilina a 100 mg/mL. Semanalmente uma colônia bacteriana foi utilizada para produção de dsRNA. A colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina e incubado a uma temperatura de 37 °C e velocidade de agitação de 180 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura da densidade ótica a 600 nanômetros (DO₆₀₀), em um espectrofotômetro. Ao atingir DO₆₀₀ igual a 0,4, a produção de dsRNA na bactéria foi induzida utilizando Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à uma concentração final de 0,4 mM, mantendo-se a cultura em crescimento até atingir uma leitura de DO₆₀₀ igual à 1,0, momento em que ocorreu a coleta da bactéria por meio da centrifugação à 9000 rpm por cinco minutos. O pellet bacteriano foi ressuscitado em 1 mL de tampão PBS 1X e aquecido a 95 °C por dois minutos e o dsRNA foi extraído utilizando Trizol. O produto da extração foi analisado em gel de agarose 1,5%. Os testes de escalonamento foram realizados seguindo o mesmo protocolo, apenas ajustando as quantidades ao volume de meio de cultura. Os testes de escalonamento foram realizados em duas temperaturas (30 ou 37 °C) e velocidades de agitação (180 ou 250 rpm).

Resultados: Nos testes de viabilidade realizados, as quantidades obtidas de dsRNA foram similares até a 5ª semana, reduzindo-se levemente na 6ª semana e tornando-se consideravelmente menores a partir da 7ª semana. Estes resultados demonstram que a estirpe de *E. coli* HT-115 mantida em meio sólido é capaz de manter o nível de produção de dsRNA por até 6 semanas. Após esse período é necessário estabelecer uma nova cultura bacteriana em meio sólido. Nos testes de escalonamento, a quantidade de dsRNA obtida por volume de meio de cultura (µg dsRNA/mL de meio), utilizando 100 mL ou 500 mL, não diferiu significativamente da obtida em volume de 10 mL, utilizados para a padronização das condições de crescimento e produção de dsRNA. Ao comparar duas extrações feitas com a mesma amostra, uma utilizando a quantidade dos reagentes no protocolo de extração a partir de 10 mL e outra utilizando cinco vezes mais reagentes, ambas as extrações obtiveram quantidades muito semelhantes de dsRNA. Assim, os dados indicam que o escalonamento para volumes maiores não prejudicou a quantidade de dsRNA obtida por volume de meio. Entretanto, o processo de extração ainda necessita de ajustes, sendo necessária a execução de mais testes de escalonamento.

Significado e impacto do trabalho: O uso de RNA interferente no controle de patógenos e vetores de doenças é uma tecnologia promissora. O estudo aqui proposto auxilia no aprimoramento do sistema bacteriano utilizado para produção de dsRNA, intensificando a futura utilização do RNAi no controle na agricultura.