

## **IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA RIBONUCLEASE III (*rnc*) EM CEPAS DE *Bacillus* COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

**MARTENS, Stefani  
COSTA FILHO, João  
SOUSA, Oscarina  
MAGGIONI, Rodrigo  
FEIJÓ, Rubens  
LANES, Carlos Frederico  
MARINS, Luis Fernando**

**Orientador: MARINS, Luis Fernando  
stefanimartens@hotmail.com**

**Evento: Congresso de Iniciação Científica  
Área do conhecimento: Biologia Molecular**

**Palavras-chave:** bactérias recombinantes; dsRNA; gene *rnc*

### **1 INTRODUÇÃO**

A descoberta de um mecanismo de RNA interferente (RNAi) em camarões tem aberto a possibilidade para o desenvolvimento de uma nova ferramenta molecular antiviral. O RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico ativado naturalmente por moléculas de fitas duplas de RNA (dsRNA) de origem endógena ou exógena (Robalino *et al.* 2005). Entretanto, a síntese e disponibilização dessas moléculas em cultivos de camarões em larga escala têm custo proibitivo. A utilização de bactérias probióticas recombinantes pode viabilizar o uso dessa ferramenta na carcinicultura. Porém, para a produção dessas moléculas em bactérias é necessário o silenciamento do gene que codifica para a ribonuclease III (*rnc*), a qual promove a degradação de dsRNAs (Court *et al.* 2013). Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi clonar e sequenciar o gene *rnc* em cepas de *Bacillus* isoladas do trato digestório de crustáceos, para a posterior produção de uma cepa com o gene *rnc* nocauteado.

### **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

Tem sido demonstrado que o nocaute do gene *rnc* é letal para algumas espécies de procariontes como *Bacillus subtilis* (Durand *et al.* 2012). A ribonuclease III pode, em algumas situações, estar envolvida no processamento dos RNAs ribossomais. Assim, é necessária uma prospecção de bactérias com propriedades probióticas, para as quais o nocaute do gene *rnc* não cause letalidade.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Em um estudo prévio realizado na Universidade Federal do Ceará foram isoladas 18 cepas de *Bacillus* sp. e uma de *Paenibacillus agaridevorans*. Para o isolamento foi utilizado o trato digestório de crustáceos, como siris, caranguejos e camarões. Para a identificação dessas cepas foi realizado o sequenciamento do gene ribossomal 16S. As sequências obtidas foram analisadas a partir do alinhamento com sequências disponíveis no banco de dados GenBank. Uma árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento do gene 16S rRNA das cepas isoladas com sequências depositadas no GenBank para o gene 16S rRNA de

algumas espécies do gênero *Bacillus*.

Para identificação do gene *rnc* nas cepas foram realizadas PCRs e Nested PCRs com primers degenerados, desenhados através do alinhamento de sequências do gene *rnc*. Os produtos da Nested PCR foram purificados, quantificados e submetidos para sequenciamento.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um total de 19 cepas isoladas do trato digestório dos crustáceos, cinco foram de siris, oito de caranguejos e seis de camarões. Após a análise das sequências 16S, 18 isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e um do gênero *Paenibacillus*. Destes, nove *Bacillus* spp., dois *B. subtilis*, dois *B. megaterium*; dois *B. cereus*, dois *B. thuringiensis*, um *B. circulans* e um *P. agaridevorans*. Com base na filogenia, foi observada uma forte relação entre as cepas 09, 20, 26 e 28 com a espécie *Bacillus subtilis* QB928, amplamente utilizada em ensaios de manipulação genética e que tem seu genoma conhecido (Yu *et al.* 2012). O gene *rnc* foi amplificado por PCR (450 pb) em todas as cepas, exceto para *B. megaterium*. A análise das sequências mostrou um alto grau de conservatividade para este gene entre as cepas, resultando em apenas 5 grupos diferenciados.

#### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que o gene *rnc* é mais conservado do que o gene ribossomal 16S, comumente usado para a identificação taxonômica de procariontes. Assim, os primers desenhados para o gene *rnc* podem ser utilizados para o isolamento deste gene em outras espécies de *Bacillus*. As sequências *rnc* obtidas podem ser utilizadas como base para futuros experimentos de nocaute gênico por recombinação homóloga e determinação da essencialidade da atividade da ribonuclease III para a sobrevivência destas cepas de *Bacillus*.

#### REFERÊNCIAS

COURT, DL, G JIANHUA, Y-E LIANG, GX SHAW, JE TROPEA, N CONSTANTINO, DW WAUGH & X JI. 2013. RNase III: Genetics and Function; Structure and Mechanism. *The Annual Review of Genetics*, 47: 405–31.

DURAND, S, L GILET & C CONDON. 2012. The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes. *PLoS Genet*, 8 (12): e1003181.

ROBALINO, J, TC BARTLETT, E SHEPARD, S PRIOR, G JARAMILLO, E SCURA, RW CHAPMAN, PS GROSS, CL BROWDY & GW WARR. 2005. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? *Journal of Virology*, 79 (21): 13561-71.

YU, CS, KY YIM, SK TSUI, TF CHAN. 2012. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain QB928, a strain widely used in *B. subtilis* genetic studies. *J Bacteriol.*, 194 (22): 6308-9.