



Universidade Estadual de Maringá
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas – Área de concentração:
Biologia Celular e Molecular

Prospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse
biotecnológico e identificação molecular por DNA barcoding dos
microrganismos selecionados

Introdução

As enzimas são proteínas globulares constituídas de heteropolímeros formados a partir de vinte diferentes aminoácidos, geralmente (exceto as ribozimas que são constituídas de RNA); algumas incluem em sua estrutura um componente não-proteico, designado grupo prostético. O que caracteriza cada enzima é o número de aminoácidos componentes de sua cadeia e a ordem em que eles se encontram, ou seja, sua estrutura primária.

Apresentam alta eficiência catalítica, que, de modo geral, é muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas também têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas e funcionam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pressão. Poucos catalisadores não biológicos apresentam tais propriedades. A atividade catalítica das enzimas depende da integridade da sua conformação nativa. Se a enzima é desnaturada e separada em subunidades, ou quebrada em seus aminoácidos constituintes, a atividade catalítica geralmente é destruída, por isso as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

O uso prático das enzimas tem sido explorado pelo ser humano há milhares de anos de forma direta, via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal, ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. A partir de meados do século XX, com avanços tecnológicos e científicos em áreas como a bioquímica, as enzimas passaram a ser extraídas das células produtoras e a ocupar papel importantíssimo em produtos e processos industriais. Dessa forma, a atenção destinada às enzimas foi intensificada, permitindo comercializá-las e empregá-las em larga escala.

Classificação

As enzimas estão divididas em seis classes, segundo a reação catalisada:

- 1) Oxidorredutases: catalisam reações de oxido-redução.

- 2) Transferases: catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra.
- 3) Hidrolases: catalisam reações de hidrólise.
- 4) Liases: catalisam reações de quebra de ligações, formando dupla ligação ou ainda, catalisam a adição de grupos a duplas ligações.
- 5) Isomerases: catalisam reações de mudança intramolecular em que o substrato é transformado e um produto isômero.
- 6) Ligases: catalisam a ligação covalente de moléculas com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (ex: na molécula de ATP).

A determinação do nome das enzimas é normatizada por um comitê especializado, o *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB).

Tecnologia de hidrólise

A tecnologia de hidrólise enzimática movimenta uma soma considerável de recursos e vem apresentando grande destaque no mercado industrial, pois pode substituir os compostos químicos atualmente utilizados, os quais provocam o desgaste de materiais e agridem o meio ambiente. Os processos biocatalisados por enzimas apresentam bom potencial por serem simples, de baixo custo financeiro e energético e com menor impacto ambiental, uma vez que as enzimas são biodegradáveis. Além disso, elas são ativas, seletivas e versáteis realizando diversas transformações em condições suaves de temperatura e pressão nas reações. A catálise química, ao contrário da enzimática, é de difícil controle e pode alterar o produto final, gerando poluentes. Sendo assim, a tecnologia da hidrólise enzimática apresenta considerável relevância por ser específica, por não apresentar reações e produtos secundários, por ser relativamente simples e fácil de controlar, por ser eficiente energeticamente e de baixo custo, preservando os tanques de reações e diminuindo os rejeitos industriais.

Enzimas industriais

As enzimas industriais são representadas pelas hidrolases (amilases, celulasas, peroxidases, lipases, fitases, entre outras), mas há também as enzimas consideradas especiais ou terapêuticas, que são utilizadas em kits de diagnóstico e em química quiral. Atualmente, as hidrolases constituem a classe de enzimas de maior uso (~75% do total) movimentando o mercado de importação e exportação pelo mundo todo. O mercado mundial de enzimas é da ordem de US\$ 4 bilhões, sendo US\$ 2.2 bilhões de dólares movimentados no mercado de enzimas industriais. Em relação ao mercado externo brasileiro, no ano de 2005, dos US\$ 147,2 milhões movimentados na comercialização de enzimas, 86% desse valor corresponderam a importações, demonstrando o desequilíbrio tecnológico e estratégico em termos de produção e utilização desses catalisadores no país.

Obtenção de microrganismos

Os organismos comumente utilizados hoje para a produção e perscrutação de enzimas são bactérias e fungos, pois são facilmente cultivados e suas enzimas geralmente podem ser purificadas mais facilmente. Ademais, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, o que torna sua produção e uso mais convenientes.

A perscrutação de novos microrganismos produtores se dá, na maior parte das vezes, por meio de processos de isolamento e identificação microbiana. Muitos pesquisadores optam por esses estudos de isolamento junto aos substratos (ar, solo, águas, resíduos) que lhes estão afetos, descobrindo-se, assim, novas e até mesmo, melhores e mais adaptadas linhagens. Após isolamento, estas são então repassadas para tubos de ensaio de cultura-estoque, cultura esta que pode estar em meio sólido (tubo inclinado com ágar nutritivo), meio líquido, em pó junto a inertes ou na forma liofilizada. Nessas últimas formas, inicialmente o microrganismo deve ser reidratado, para então se iniciar o processo de cultivo. A cultura estoque é aquela cujas características microbianas são conservadas através das técnicas, ao longo do tempo. Da cultura-estoque, em meio sólido, o microrganismo é transferido por

via asséptica, na maior parte das vezes, usando-se uma alça de platina flambada e resfriada, ao meio sólido ou líquido, cuja composição é adequada às exigências nutricionais do microrganismo.

A aquisição de um microrganismo também pode ser feita através de Coleções de Cultura. Os microrganismos depositados nessas instituições são listados em manuais que contêm informações sobre a origem, condições de manutenção-estoque e de cultivo, nutrientes específicos ou limitantes, pH e temperatura ótimos etc. A identificação dos organismos selecionados pode ser feita morfo ou molecularmente (DNA bacoding). No primeiro caso, são observadas características da morfologia do microrganismo, como, textura, coloração, crescimento; no segundo, uma extração do material genético é necessária para identificação molecular.

Microrganismo ao uso

As aplicações de enzimas estão vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais, referem-se à biotecnologia, envolvendo microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica no processamento de materiais por agentes biológicos. As enzimas são frequentemente utilizadas para melhoria de processos e possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos.

Observando os lados positivos das enzimas e seus possíveis usos, pode-se ter uma ideia errônea quanto à facilidade de seu uso em grandes escalas. Suas diversas qualidades são entravadas pela produção nos organismos-fonte. Independente do organismo que seja produtor da enzima de interesse, sua produção nunca será exacerbada naturalmente, ela sempre terá sua produção controlada conforme as condições do meio. Por isso é tão comum trabalhos de identificação de organismos produtores e otimização da produção. E, mesmo com a presença de grandes quantidades do substrato e sendo ele a única fonte de carbono, por exemplo, o organismo que sobrevive e cresce nestas condições nem sempre será um bom produtor e seu crescimento poderá ser

lentíssimo, pois tudo depende do potencial genético do organismo produtor e também dos mecanismos de controle da expressão.

A grande diversidade de organismos presentes na natureza faz com que as fontes de estudo em busca da seleção e melhoramento de produtores de enzimas seja inesgotável. A exploração da biodiversidade biológica na busca de organismos hábeis a produzir enzimas consiste em uma boa perspectiva para as áreas científica e comercial.

Enzimas de interesse industrial e suas aplicações

Amilases

A amilase é a enzima capaz de degradar moléculas complexas de amido em unidades menores chamadas de glicose. As amilases estão entre as enzimas industriais mais importantes, pois apresentam grande importância biotecnológica, tais como aplicações na fabricação de tecidos, cerveja, bebidas destiladas, pão, cereais para alimentação infantil, ração animal e nas indústrias têxteis, de panificação, liquefação e sacarificação do amido, química e farmacêutica. Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, as amilases microbianas geralmente encontram grande demanda industrial e, atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente. Bactérias como *Bacillus* spp. e fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. são consideradas as mais importantes fontes de amilases.

Um dos exemplos mais conhecidos da utilização bem-sucedida das amilases foi o ocorrido na década de setenta, quando o preço do açúcar estava elevado nos Estados Unidos. Houve um grande estímulo para se descobrir uma forma eficiente, por meio do uso de enzimas, para se produzir um substituto do açúcar da cana-de-açúcar, tendo como base o milho. Sendo os grãos do milho ricos em amido, foi desenvolvida uma técnica para a produção de um xarope doce de milho rico em frutose. Utilizaram-se três enzimas: amilase, amiloglicosidase e a glicose isomerase. A amilase foi utilizada para a realização da hidrólise do amido, de forma similar a amiloglicosidase. A

degradação completa do amido gera glicose. A frutose, por ser duas vezes mais doce que a glicose, foi escolhida como o açúcar final majoritário. A frutose foi produzida a partir da isomerização da glicose pela glicose isomerase. Dessa forma foi possível criar um xarope doce e um substituto do açúcar de cana. Um exemplo de empresa produtora da amilase industrial é a Novo Nordisk. Esta empresa utiliza a bactéria modificada *Bacillus licheniformis*. Ela foi modificada para possuir cópias extras de seu gene natural para a enzima amilase. As bactérias são cultivadas em tanques imensos e cada 500 mililitros da enzima purificada são capazes de converter uma tonelada de amido em açúcares. O transporte da enzima é feito em grandes tanques de caminhões.

Celulases

As celulases são um complexo de enzimas capazes de degradar a celulose, que é um importante componente da parede celular de plantas. Devido ao seu grande potencial biotecnológico, as celulases, constituem o terceiro grupo de enzimas de maior importância econômica, pois são vendidas em grande volume e apresentam diferentes aplicações na indústria como por exemplo, na indústria de alimentos, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de suco de frutas e de polpa de vegetais, indústria de papel, indústria têxtil, assim como na agricultura e em pesquisas. Atualmente, elas têm atraído grande interesse devido a sua habilidade na bioconversão de materiais lignocelulósicos em glicose, a qual pode ser convertida em etanol por fermentação. No entanto, o custo e o baixo rendimento dessas enzimas são os maiores problemas para a sua aplicação industrial.

Na natureza existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases. Em bactérias aeróbias, são descritos como produtores de celulases o gênero *Cellulomonas* e algumas espécies de *Bacillus* como *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus*. Entre as bactérias anaeróbias, destacam-se os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium* e *Ruminococcus*. As celulases dos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são as mais utilizadas e aplicadas industrialmente. Entretanto, outros gêneros são incluídos como principais produtores de celulases, como:

Cladosporium, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Paecilomyces*. Devido ao seu grande potencial de aplicação industrial, o complexo celulolítico de fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é considerado o mais bem caracterizado.

Lipases

As lipases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ésteres formados por ácidos graxos de cadeia longa. Embora a função biológica destas enzimas seja, primordialmente, catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, catalisando também reações de esterificação e transesterificação. As lipases constituem um grupo de catalisadores com várias aplicações biotecnológicas devido as suas características, tais como: amplo reconhecimento de substratos, alta estereoseletividade, estabilidade em solventes orgânicos e a falta da necessidade de cofatores. As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de enzimas valiosas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e pela facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial. O campo comercial mais importante para aplicação das lipases encontra-se na indústria de detergentes e limpeza. As lipases também são utilizadas no tratamento de efluentes e na indústria de papel e celulose para remoção de triacilgliceróis e ceras. Na indústria de alimentos pode ser utilizada para lipólise de manteiga e cremes, como aditivo na produção de queijos, panificação, e esterificação de gorduras e óleos. A estereoseletividade das lipases é útil na síntese de biopolímeros como polifenóis e poliésteres, na resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários em reações de hidrólise, na esterificação e transesterificação. Fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas. Um grande número de lipases de fungos filamentosos tem sido estudado extensivamente

sob os pontos de vista genético e bioquímico. As espécies melhores produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*.

Proteases

Proteases são enzimas degradativas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas produzindo peptídeos e aminoácidos. A abrangência catalítica das proteases possibilita que elas sejam utilizadas nas indústrias produtoras de alimentos, de detergentes e de rações; nas indústrias químicas e farmacêuticas; nas indústrias de processamento de couro; e no processamento de lixos. As enzimas atualmente comercializadas para uso industrial são produzidas por microrganismos (fungos e bactérias), plantas e animais. Poucas espécies de microrganismos são produtores de proteases utilizadas industrialmente e a grande maioria (90% aproximadamente) das proteases utilizadas não é de origem microbiana. As proteases de origem microbiana, entretanto, são preferidas em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para a aplicação biotecnológica. As proteases de origem microbiana são de bactérias do gênero *Bacillus* e de origem fúngica como as de *Aspergillus* spp.

Bioinformática

Como a bioinformática nos ajudaria neste processo de perscrutação e em estudos posteriores mais aprofundados? A bioinformática é simplesmente o uso da informática para a geração e gerenciamento de bioinformação. A internet possibilitou um compartilhamento de informação incrível. As pessoas estão mais acostumadas ao compartilhamento de fotos, músicas, mas no meio da pesquisa há, desde algum tempo, um crescente armazenamento de dados públicos. A bioinformática pretende representar, armazenar e distribuir dados, além de desenvolver ferramentas analíticas para desvendar o conhecimento contido nos dados. Desse modo, cientistas de todo o mundo que estudam

assuntos semelhantes podem se beneficiar de dados já obtidos, evitando etapas desnecessárias. Por exemplo, um pesquisador que estuda a hexoquinase de cães pode estar interessado em comparar a(s) sequência(s) gênicas obtidas com outras espécies para relacionar a filogenia entre elas. Em um passado não muito distante, seria necessário obter também as sequências das outras espécies de interesse. Hoje, com diversas sequências obtidas e armazenadas os trabalhos se tornam mais dinâmicos e práticos – economia de tempo e recursos.

Ao conjunto de dados armazenados e disponíveis se dá o nome de banco de dados. Os dados são relacionados entre e si, geralmente são inseridos com o respaldo de um artigo publicado, e são organizados de tal modo que o usuário recupere informações, tire conclusões e tome decisões, portanto, os dados devem ser dispostos de maneira lógica e auferível.

Banco de dados não englobam todos os dados possíveis de todas as áreas possíveis, mas focam em alguns tipos de dados. A maioria dos bancos de dados é direcionada para a biologia molecular que possui uma infinidade de informações que vão desde um sequenciamento completo de um organismo às proteínas resolvidas dos genes codificadores. Para exemplificarmos o que podemos obter a partir de um banco de dados de uma forma visual, pensemos em um gene. Pensemos no mesmo gene da hexoquinase de cães que citamos anteriormente. A figura 1 sumariza as informações auferíveis quando temos em mente um gene, que no nosso exemplo codifica a enzima hexoquinase em cães.

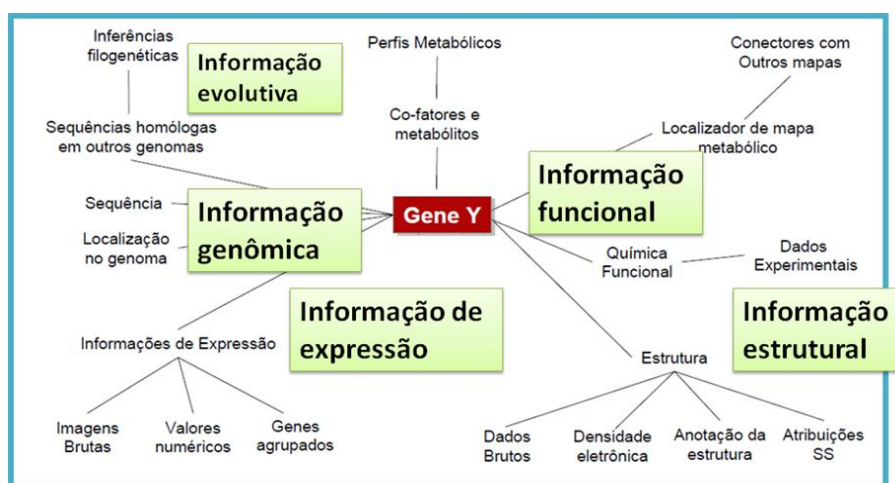


Figura 1. Informações encontradas em banco de dados quando se tem um gene em mente, que em nosso exemplo codifica a hexoquinase de cães, denominado Gene Y.

Assim, a partir das tecnologias atuais, é possível a partir de uma sequência ou um fragmento de sequência de uma proteína ou DNA, encontrar estruturas similares no banco de dados. Por meio destas ferramentas, associadas a uma infinidade de dados bibliográficos armazenados, podemos alcançar objetivos exemplificados na figura 1.

Além desta infinidade de informações, inerentes a organização celular, possuímos outra infinidade de organismos. Portanto, não é de se estranhar que o aumento no número de informações é impressionante, como representado pelos gráficos abaixo.

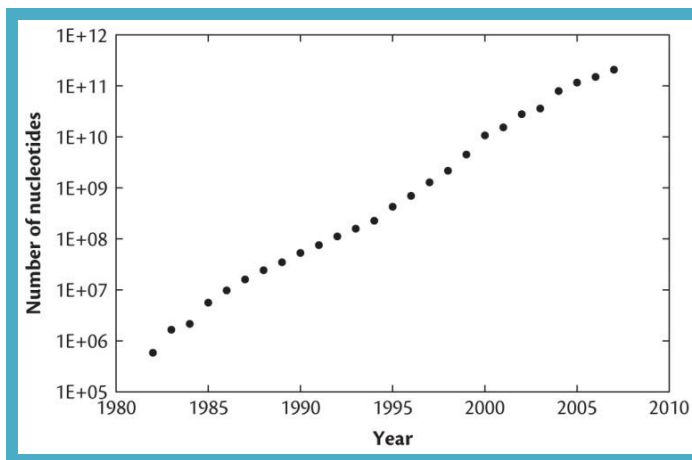


Figura 2. Crescimento do GenBank, um banco de dados de arquivos de sequências genéticas do US National Center for Biotechnology Information (NCBI).

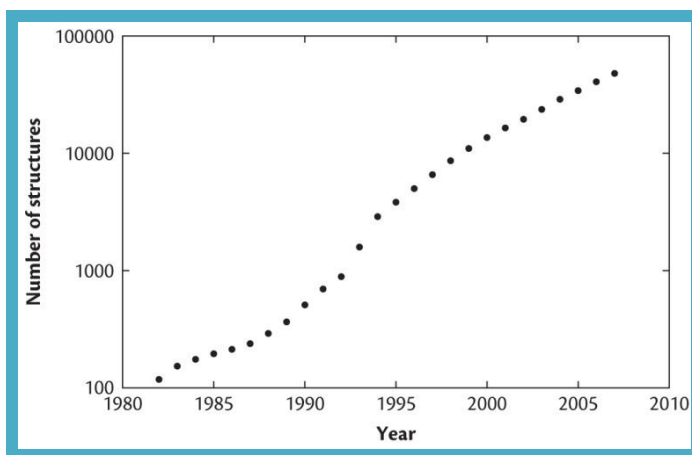


Figura 3. Crescimento do Protein Data Bank, um arquivo de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas.

Esse aumento exorbitante exige um aprimoramento contínuo para que estas informações estejam sempre acessíveis e organizadas. Ademais, a

necessidade de programas adequados para as diversas análises possíveis tornam a área da bioinformática extremamente promissora.

Os bancos de dados

Há dois tipos principais de banco de dados. Os primários, cuja deposição é direta e sem processamento, e os secundários, que derivam dos primários e apresentam alguns tipos de análises. Alguns links de banco de dados primários são:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (NCBI)

<http://www.ebi.ac.uk/> (EMBL)

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/> (DDBJ)

O arquivo de sequências é mantido por uma parceria entre as três entidades acima relacionadas. Já o arquivo de sequências proteicas é mantido pelo United Protein Database (Uniprot), que é um exemplo de banco de dados secundário. O Uniprot é uma junção dos bancos de dados do SWISS-PROT, do The Protein Identification Resource (PIR) e do Translate EMBL (TrEMBL).

<http://www.uniprot.org/>

Há vários outros tipos de banco de dados na Biologia Molecular, como banco de dados de genoma, banco de dados de genomas focalizados em espécies individuais (Ensembl), bancos de dados de padrões de expressão proteica (ETS), bancos de dados de rotas metabólicas (KEGG), bancos de dados bibliográficos (pubmed).

A análise de sequências obtidas geralmente é focada na procura por sequências similares em banco de dados. Imagine que você descobriu um gene em uma bactéria que codifica uma enzima necessária à utilização de um carboidrato específico. Provavelmente você gostaria de averiguar se existe em outras espécies um gene similar ao seu. Para tanto, o método escolhido por você deve ser tanto sensível, para que possa identificar até mesmo sequências pouco relacionadas, quanto seletivo, para que as sequências encontradas

possuam relações verdadeiras. Um dos programas mais utilizados para tanto é o PSI-BLAST (Position Specific Iterated-Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI.

Há diferentes tipos de BLAST, que diferem quanto ao tipo de sequência analisada:

- **BLASTN** – Pesquisa bancos de dados de nucleotídeos usando uma sequência de nucleotídeos em questão.
- **BLASTP** – Pesquisa bancos de dados de proteínas usando uma sequência de proteína em questão.
- **BLASTX** – Pesquisa banco de dados de proteínas usando uma sequência de nucleotídeo traduzida em questão
- **TBLASTN** – Pesquisa um banco de dados de nucleotídeos usando uma proteína em questão.
- **TBLASTX** – Pesquisa bancos de dados de nucleotídeos traduzidos usando uma sequência de nucleotídeo traduzido em questão.

Um formato bastante comum para dados de sequências é o FASTA. Muitos programas utilizam o formato FASTA, que é definido pelo símbolo ">", para a leitura de sequências ou para a informação de seus resultados. Um exemplo de sequência em formato FASTA é dado abaixo.

```
>gi|121664|sp|P00435|GSHC_BOVIN GLUTATHIONE PEROXIDASE  
MCAAQRSAAALAAAAPRTVYAFSARPLAGGEPFNLSSLRGKVLIIENVASLUGTTVRDYTQMNDLQRRLG  
PRGLVVLGFPCNQFGHQENAKNEEILNCLKYVRPGGGFEPNFMFLFEKCEVNGEKAHPLFAFLREVLPTPS  
DDATALMTDPKFITWSPVCRNDVSWNFKFLVGPDPVPRRYSRRFLTIDIEPDIETLLSQGASA
```

Figura 4. Exemplo do formato FASTA da sequência da proteína Glutathione Peroxidase bovina. Na primeira linha há informações sobre a proteína.

Alinhamento de sequências

O alinhamento é a tarefa de localizar regiões equivalentes de duas ou várias sequências, tanto de nucleotídeos como de proteínas, para maximizar suas similaridades. É ele que permite a busca de similaridades em banco de dados, além de permitir a realização de medidas de conservação, análise filogenética, estabelecimento de motivos conservados e determinação de famílias de proteínas.

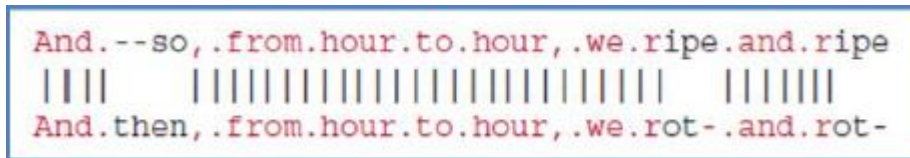


Figura 5. Exemplo teórico de alinhamento entre duas sequências.

O alinhamento é a atribuição de correspondências entre pares de resíduos. As diferenças existentes entre duas sequências são devidas às mutações, seleção natural, inserções ou deleções, fusão de sequências a partir de dois diferentes genes e duplicação gênica.

Através do alinhamento das sequências podemos determinar a identidade e a similaridade das mesmas. A *identidade* descreve o grau ao qual uma ou mais sequências são idênticas em cada posição de um alinhamento e é medida contando o número de bases idênticas pareadas no alinhamento; *similaridade* mensura o grau de semelhança entre duas sequências, e indica que determinados aminoácidos ou nucleotídeos em determinada posição compartilham propriedades semelhantes, mas não são idênticos.

O alinhamento precisa ser quantificado para se determinar a similaridade entre duas sequências. Com essa quantificação, pode se determinar se duas sequências são relacionadas, ou não, e o quanto são relacionadas.

DNA barcoding

O DNA barcoding é uma metodologia que visa, com base em alguns poucos genes ou regiões padronizadas, a identificação de espécimes desconhecidos, assim como aumentar a descoberta de espécies desconhecidas. O DNA, muitas vezes referido como o código genético, é responsável por armazenar toda a informação necessária para o desenvolvimento e multiplicação de um dado organismo. Mas, por ser um código mutável, isto é, por passar por mudanças que são então selecionadas pelo processo evolutivo ao longo do tempo, este código apresenta maiores ou menores diferenças conforme espécies são menos ou mais relacionadas, respectivamente. Portanto, a sequência do DNA de um gato será mais similar, por exemplo, ao DNA de um leão do que ao DNA de uma águia. Da mesma

forma, se um DNA desconhecido for de um espécime de gato doméstico (*Felis silvestris catu*) e se a sequência deste DNA desconhecido for comparada ao DNA conhecido de um outro gato, será revelado que as sequências são praticamente idênticas. Partindo deste princípio, a técnica do DNA barcoding surgiu, assim como a filogenia molecular. Note que o DNA barcoding visa apenas a identificação de espécimes desconhecidos com base em alguns genes ou pequenas regiões do DNA e a filogenia molecular visa agrupar espécies relacionadas, como famílias, por exemplo, com base nas diferenças no DNA ou diferentes sequências proteicas. O DNA barcoding, portanto, utiliza uma classificação já existente para a identificação.

O DNA barcoding não é uma ideia completamente nova. O uso de marcadores moleculares para a identificação, como aloenzimas (variantes de uma enzima codificados por diferentes alelos no mesmo locus), é um conceito antigo. O que esta técnica propõe hoje é uma padronização e o aumento em escala do uso desta técnica de identificação molecular. O sequenciamento de genomas inteiros é uma realidade em muitos laboratórios, mas não é um procedimento prático quando se têm um número elevado de amostras. A utilização de uma pequena porção do DNA para fins de identificação é essencial para o aumento da praticidade do método. Mas qual região usar? Há regiões do DNA que são altamente conservadas por codificarem RNAs ou proteínas essenciais e outras regiões que podem ter um número maior de variações em sua sequência. Se a região for altamente conservada e há quase nenhuma variação nela entre espécies diferentes, ela não é uma região útil na identificação. Se ela for altamente variável, até mesmo em exemplares da mesma espécie (variação intraespecífica), a identificação seria impossível igualmente. Portanto, houve e ainda há pesquisas para se descobrir regiões no DNA que apresentem uma baixa variação intraespecífica comparada com aquela entre espécies diferentes, que permitam, desse modo, a identificação eficiente.

Há no momento regiões do DNA que já são usadas rotineiramente para a identificação de espécies já classificadas e, algumas vezes, até mesmo como ferramenta auxiliar para a identificação de novas espécies, para diferentes grupos. Em fungos, por exemplo, a região ITS (do inglês, *Internal Transcribed*

Spacer) é uma região muito utilizada para o propósito de identificação. A região ITS é a região entre os genes dos RNA ribossomais da subunidade maior e menor, e existe em eucariotos como em procariotos. Já a identificação de plantas, são utilizados, por exemplo, os genes plastidiais da rubisco (*rbcL*) e maturase K (*matK*). Para animais o gene citocromo c oxidase I (COI) é bastante utilizado. As bactérias, no entanto, não apresentam uma sequência apenas que seja utilizada rotineiramente para a identificação de espécies. A região 16S é utilizada, mas não como uma forma cabal de identificação. Bactérias com características distintas podem apresentar genes para o rRNA 16S quase ou totalmente idênticos. Este gene é mais utilizado como uma ferramenta que auxilia nos estudos filogenéticos deste grupo. As bactérias apresentam troca genética horizontal muito grande e muitos lócus devem ser utilizados para identificações precisas.

Para que essas sequências possam ser utilizadas rotineiramente na identificação de amostras, é necessário que um número crescente de sequências de espécies seja depositado em bancos de dados para que um pesquisador a partir de uma amostra desconhecida possa chegar a uma espécie. Muitos projetos com esse intuito vêm surgindo, como, por exemplo, o Lepidoptera barcode of life (<http://lepbarcoding.org/>) que visa criar uma biblioteca COI para todas as espécies da ordem Lepidoptera. Da mesma forma, banco de dados curados, específicos para a identificação barcoding, também surgiram e podem ser utilizados pelos pesquisadores, como, por exemplo, o BOLD (do inglês, Barcode Of Life Data) Systems (<http://www.boldsystems.org/>).

De modo resumido, a técnica do DNA barcoding em um laboratório envolve 1) a extração do DNA da amostra, 2) amplificação do gene por PCR comum e 3) sequenciamento e pesquisa em banco de dados, como o BOLD, por meio de alinhamento BLAST, para a identificação da amostra.

Extração de DNA

- **Cuidados na manipulação**

Alguns cuidados devem ser observados na hora de manipular/extrair os ácidos nucleicos, seja para a identificação e/ou isolamento ou para a caracterização molecular de agentes patogênicos. A única diferença é que na manipulação do DNA e RNA o risco existente é a contaminação da amostra e não do operador. A preparação dos reagentes utilizados, a manipulação da amostra propriamente dita e o local de manipulação dos ácidos nucleicos, constituem os principais tópicos a serem observados para evitar a contaminação. Esses cuidados são comparáveis aos atribuídos na manipulação de microrganismos infecciosos.

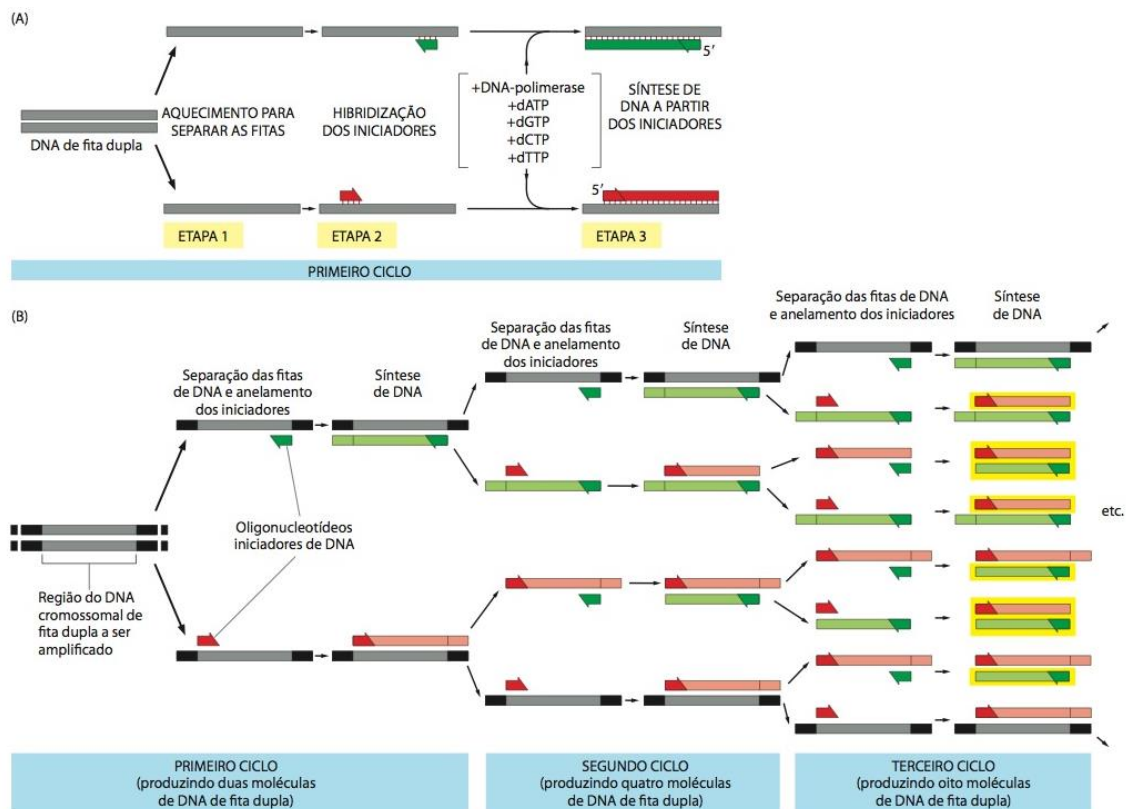
Para o isolamento de DNA plasmidial ou genômico de microrganismos a partir de células ou tecidos, deve-se sempre usar amostras frescas ou amostras que tenham sido congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. Este procedimento minimiza a degradação do DNA por limitar a atividade de nucleases endógenas.

PCR (Reação em cadeia da polimerase)

A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se duas sequências de nucleotídeos iniciadoras (ou *primers*) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Três eventos distintos ocorrem durante um ciclo de PCR:

- 1) O DNA é desnaturado. A desnaturação do DNA ocorre quando a reação é aquecida a 92 - 96 °C. Para sequências de DNA que possuem uma porcentagem alta de G+C, é recomendada a adição de glicerol, aumento da temperatura e tempo de desnaturação do DNA, e também uso de análogos de nucleotídeos para melhorar o produto da PCR.
- 2) Os *primers* ou iniciadores hibridizam com as fitas do DNA. Após a desnaturação do DNA, os *primers* oligonucleotídeos hibridizam com a sequência-alvo da fita simples de DNA. A temperatura desta etapa varia de 37 a 65 °C, dependendo da homologia dos *primers* com a sequência-alvo, assim como também da composição de bases dos oligonucleotídeos.

3) A síntese do DNA complementar à fita-molde de DNA é realizada pela polimerase termoestável com a incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs). A última etapa é a extensão do *primer* oligonucleotídeo pela polimerase termoestável. Tradicionalmente, esta etapa é realizada a 72 °C. O tempo necessário para copiar a fita-molde depende do tamanho do produto de PCR. A repetição dessas 3 etapas, por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um segmento de DNA de fita dupla cujo término é definido pela terminação 5' do *primer* oligonucleotídeo e cujo comprimento é definido pela distância entre os *primers*. Como os produtos de 1 ciclo de amplificação servem como molde para o próximo, cada ciclo sucessivo aumenta exponencialmente a quantidade do produto do DNA desejado.



Visto que a manipulação de DNA é sensível e com altas chances de contaminação exógena, algumas medidas estruturais e operacionais devem ser pré-estabelecidas pelo laboratório para reduzir ao máximo o risco de

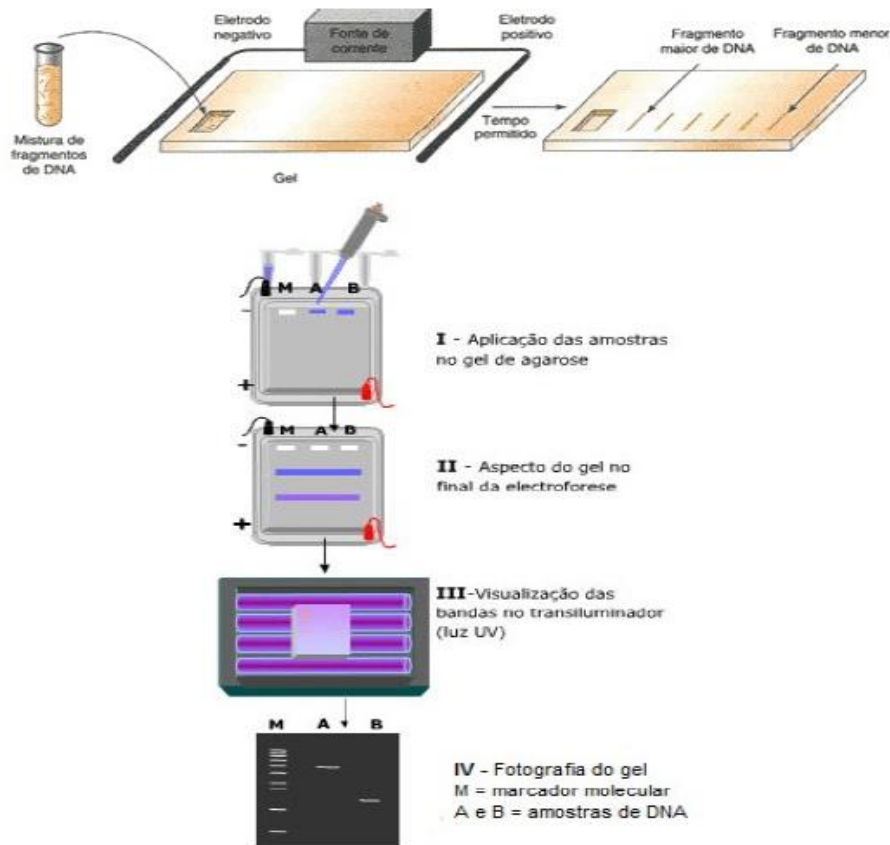
contaminação da amostra, principalmente se a realização da PCR for de rotina laboratorial. Observações importantes a considerar:

- Contaminações ocorrem quando partículas como aerossóis, caem em reagentes e soluções de novas reações de PCR.
- As reações contaminadas serão sempre positivas (amplificadas), podendo gerar resultados falsos positivos. Para isso, um controle negativo (sem DNA molde) é sempre utilizado, mas é bom prevenir pela organização do laboratório, separando ambientes, de forma que o DNA amplificado não entre em contato com novas reações de PCR.
- As diferentes salas em um laboratório de PCR devem ter suas próprias micropipetas, ponteiros e reagentes. Estes materiais não devem sair desta sala ou entrar nas outras salas.
- Cada sala deve ter sua própria cabine de segurança biológica (cabine de fluxo laminar), se for necessário.
- Cores podem ser utilizadas para identificar cada ambiente.
- Desinfecção de bancadas e cabines de fluxo laminar com etanol 70% deve ser feita antes e depois dos trabalhos.

Eletroforese

Fragmentos de DNA e RNA podem ser separados de acordo com o seu tamanho através da eletroforese em gel de agarose. Os ácidos nucleicos possuem carga elétrica que pode ser utilizada para separar fragmentos de tamanhos diferentes quando colocados em um gel horizontal na presença de um campo elétrico. A agarose possui poros por onde as moléculas de DNA migram quando é adicionada uma corrente elétrica. A taxa de migração das moléculas é afetada pelo tamanho e forma das moléculas, densidade do gel e força da corrente elétrica. As moléculas maiores de DNA migram mais vagarosamente do que as moléculas menores. Após a corrida, os ácidos nucleicos podem ser visualizados no gel, pelo uso do brometo de etídeo, um corante fluorescente. Este composto intercala-se entre os pares de bases empilhados da molécula de DNA/RNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta. Em um dos poços do gel, onde as amostras

a serem avaliadas por eletroforese são colocadas, é adicionado um marcador de peso molecular contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido. Este tem como objetivo estimar o tamanho dos fragmentos gerados após a corrida. O tamanho de cada fragmento é medido em pares de bases (pb).



Sequenciamento

Para o sequenciamento, o produto de PCR deve ser primeiro analisado por eletroforese em gel de agarose para verificar se somente uma banda está presente. Se a PCR não estiver específica (ou seja, se múltiplas bandas estiverem presentes), as condições da PCR deverão ser modificadas até que somente o produto desejado seja amplificado.

A qualidade da amostra de PCR é um dos fatores mais críticos no seqüenciamento. É muito importante que a PCR esteja limpa e livre de contaminantes. A limpeza pode ser realizada por kits de purificação fornecido por várias empresas com seus respectivos protocolos, baseados em enzimas

que degradam nucleotídeos não incorporados, *primers* residuais e demais produtos de fita simples não desejáveis.

Após a purificação dos produtos de PCR, é necessário fazer a quantificação dos mesmos em gel de agarose 1,5%-2%. Em seguida as amostras são submetidas ao sequenciamento.

Método de Sanger - manual

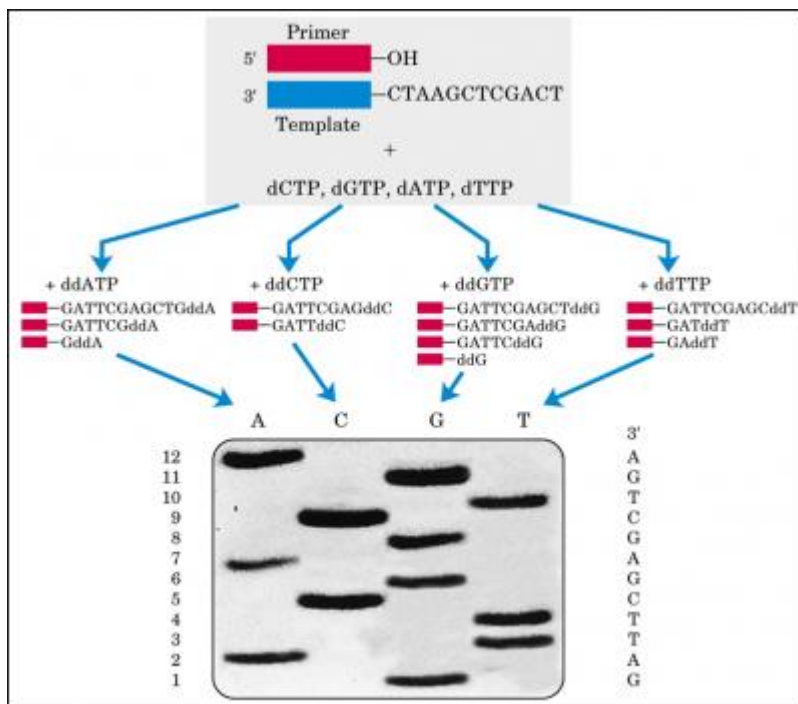
A caracterização completa de um fragmento de DNA clonado implica a determinação da sua sequência de nucleotídeos. Para este fim usa-se normalmente o método de Sanger, o qual permite determinar a sequência exata de uma cadeia de DNA com até 500 nucleotídeos.

O método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado - cadeias essas que são marcadas radioativamente numa extremidade e diferem entre si por um nucleotídeo. Por separação das cadeias truncadas (cadeia peptídica mais curta) através de eletroforese, pode estabelecer-se a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA original.

A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), os quais, e ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleosídeos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH. Assim, embora possam ser usados pela DNA polimerase na síntese de cadeias de DNA, não permitem a formação de uma ligação fosfodiéster com outro nucleotídeo trifosfato, pelo que a sua incorporação na cadeia resulta numa cadeia truncada, nesse ponto.

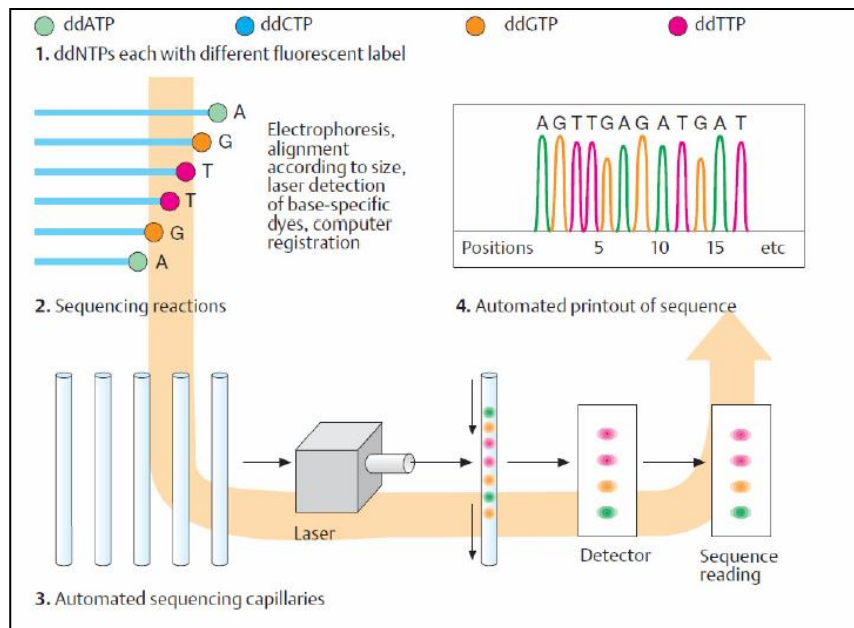
Assim, inicialmente procede-se à desnaturação do fragmento de DNA de dupla cadeia, originando cadeias molde para a síntese *in vitro* de DNA. São necessários *primers* para que se inicie a reação pela DNA polimerase. É também o *primer* que define qual a cadeia que é usada como molde. Usam-se ainda baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs. Em cada reação, um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização. A inclusão de marcadores fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias truncada pela respectiva fluorescência. Por exemplo, todas as sequências truncadas que terminem com um ddGTP podem ter fluorescência de cor amarela, as terminadas com ddATP com cor vermelha, etc., independentemente dos seus tamanhos. Por eletroforese das sequências

truncadas em gel de poliacrilamida, separam-se as diferentes cadeias simples de DNA (as quais diferem entre si apenas por um nucleotídeo). Existem máquinas que fazem detecção da fluorescência e que podem distinguir os 4 marcadores fluorescentes dos outros tantos ddNTPs. A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a sequência da cadeia de DNA complementar à cadeia usada como molde, ou seja, a sequência obtida não é a da cadeia molde, mas sim a da sua cadeia complementar.



Método automatizado

Criado em 1986 pela Applied Biosystems. O princípio é o mesmo do sequenciamento manual feito por Sanger. Os ddNTPs são marcados por fluorescência característica, permitindo a distinção das cadeias truncada pela respectiva fluorescência. Cada ddNTP utiliza um fluorocromo diferente, portanto as reações podem ser feitas em um mesmo tubo. As moléculas de DNA em suspensão são introduzidas em capilares por eletroinjeção. Cada fragmento recebe um feixe de laser de argônio, que será detectado por um sistema óptico e uma câmara de CCD (dispositivo de carga acoplada). A ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a sequência da cadeia de DNA complementar à cadeia usada como molde.



Identificação morfológica e molecular

A identificação morfológica de fungos, assim como de plantas e animais, é feita, na maior parte das vezes, por meio de chaves dicotômicas. Elas são baseadas nas características morfológicas destes organismos e orientam o pesquisador até uma família, gênero ou, dependendo da chave de identificação, uma espécie. No minicurso será apresentada uma pequena demonstração do funcionamento das chaves.

A identificação molecular é mais prática e não demanda um profissional taxonomista. Será feita análises em banco de dados a partir sequências já obtidas a partir de sequenciamentos para a identificação das espécies desconhecidas.

Cronograma

1. Segunda-feira –. Palestra. Tarde: introdução ao minicurso
2. Terça-feira – Revelação de meios para enzimas e isolamento monospórico
3. Quarta-feira – Extração de DNA de fungos

4. Quinta-feira – PCR, eletroforese de DNA e identificação por DNA barcoding
5. Sexta-feira – Palestra e encerramento

Protocolos e atividades práticas

Análise das atividades enzimáticas por halo de degradação

Para a análise da atividade enzimática por halo de degradação se faz um meio específico onde o substrato a ser degradado é a única fonte de carbono. Adotam-se geralmente limiares para se considerar uma atividade boa, média ou ruim. Em nosso minicurso será adotada o índice igual ou maior que dois um bom índice enzimático.

Para a determinação da atividade enzimática seguiremos o método de Hankin e Anagnostakis (1975), onde a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação (R) e o diâmetro médio da colônia (r) é igual ao índice enzimático ($IE = R/r$).

Atividade amilolítica

O meio comumente usado para a averiguação da produção de amilases é o ágar nutriente (extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, ágar 15 g/L) com 2 g/L de amido solúvel. Após o crescimento dos microrganismos, as placas são reveladas com 5 mL de solução de lugol (iodo 5 g/L; iodeto de potássio 10 g/L) para detecção do substrato remanescente. A atividade amilolítica é avaliada pela zona amarela clara ao redor da colônia de cada isolado, i.e., o halo de degradação do amido.

Atividade celulolítica

Na determinação da atividade celulolítica é usado um meio contendo: KH_2PO_4 7,0g/L; K_2HPO_4 2,0g/L; pH 5,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0g/L; extrato de levedura 0,6g/L; celulose microcristalina (Sigmacell) 10g/L e ágar 15g/L. Após um cultivo de 2 a 5 dias, para melhor visualização da zona de

clarificação as placas são estocadas a 50°C por 12 horas. Após esse período, as placas são reveladas com 5 mL de solução de lugol para detecção do substrato remanescente. A atividade celulolítica é avaliada pela zona amarela clara ao redor da colônia de cada isolado.

Atividade proteolítica

Para a seleção de microrganismos produtores de proteases utilizaremos o método da hidrólise da caseína em meio ágar-leite: leite desnatado 300 mL/L; ágar 20 g/L. Como o meio ágar-leite é opaco, a atividade da enzima é avaliada pela presença de halo de degradação transparente ao redor das colônias.

Atividade lipolítica

A atividade lipolítica será determinada através do seguinte meio de cultura: peptona 10 g/L; NaCl, 5 g/L; CaCl₂·2H₂O 0,1 g/L; ágar 17,0 g/L, e como substrato lipídico o polioxietileno sorbitan-monolaurato (Tween 20) 10 mL/L. O Tween 20 será autoclavado separadamente, por 15 minutos e adicionado, posteriormente, ao meio basal que também será esterilizado em autoclave. Após cultivo, as placas serão incubadas a 4°C, por 12 horas, para melhor visualização. A atividade lipolítica é avaliada pela presença de um halo opaco de precipitado branco formado ao redor das colônias.

Isolamento monospórico

(NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASSAS, W.F.O. **Fusarium Species, An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.)

1)Um fragmento de BDA contendo uma colônia é picotado e agitado em 5-20 mL de água destilada estéril.

2) Cem microlitros da suspensão obtida são espalhados na superfície de uma placa de 10 cm de diâmetro contendo ágar água 2,5%.

3) A placa é incubada por 18 a 48 horas a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

4) Com o auxílio de uma lupa, um fragmento do meio contendo apenas um esporo ou um fragmento de hifa germinando é removido e transferido para um tubo com meio BDA inclinado.

5) O tubo é incubado por cinco a sete dias, nas mesmas condições, e as características culturais são observadas.

Técnica de extração de DNA de fungo

O DNA será extraído utilizando o protocolo descrito por Koenig et al. (1997), com adição de uma etapa de extração com fenol.

Procedimentos:

1) Crescer os isolados em meio líquido de batata-dextrose por 5 dias a 22°C - 25°C.

2) Separar a massa micelial do meio líquido através de filtração em gaze estéril.

3) Macerar o micélio em nitrogênio líquido em um grau com pistilo, reduzindo o micélio a um pó fino.

4) Transferir o fino pó de micélio para tubos Eppendorf (aproximadamente 300 µL e adicionar o tampão de extração de DNA na proporção de 700 µL para cada 300 µL de micélio macerado. O tampão de extração consiste de uma mistura de: tampão lise do núcleo, tampão de isolamento do DNA e solução de sarcosina 5% na proporção de 1:1:0,4 (o preparo destes reagentes está descrito abaixo). Adicionar bissulfito de sódio ao tampão de extração na proporção de 3,8 mg/mL.

5) Manter os tubos em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Durante a incubação agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão.

6) Retirar os tubos do banho-maria e fazer a extração com solvente orgânico;

adicionando 500 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, em cada tubo. Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes até formar uma emulsão.

7) Centrifugar as amostras a 12.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e transferir com uma pipeta o sobrenadante (fase aquosa, aproximadamente 700 µL) para tubos limpos. Retire os tubos da centrífuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas.

8) Adicionar 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase em cada tubo contendo a fase aquosa e incubar em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

9) Adicionar 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de Proteinase K e incubar por 30 minutos a 56°C.

10) Adicionar 700 µL de isopropanol em cada tubo e agitar gentilmente para precipitar o DNA. Se o precipitado branco não for visível siga em frente mesmo assim, e para aumentar a quantidade de precipitado, os tubos devem ser mantidos por 60 minutos ou mais (overnight) a temperatura de -20°C.

11) Centrifugar os tubos a 12.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet.

12) Adicionar 500 µL de etanol 70% para lavar o pellet. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos e descartar o etanol.

13) Repetir procedimento anterior (12)

14) Secar o pellet assim como as paredes internas do tubo em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos.

15) Quando o etanol evaporar totalmente, adicionar 100 µL de TE (Tris pH 8.0, 10 mM e EDTA 1mM) para ressuspender o pellet. Transferir os tubos para um refrigerador a 4°C

16) A qualidade e a quantidade do DNA das amostras pode ser determinada por meio de corrida em gel de agarose 0,7 – 1% e pela leitura de absorbância. Quando a proporção entre as de absorbância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) for próxima de 2, significa que a amostra tem boa qualidade. A ausência de smear na corrida da amostra de DNA em gel de agarose é um indicador de que o DNA da amostra não está fragmentado.

A quantificação do DNA presente na amostra pode ser feita pela fórmula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L DNA} = (\text{fator de diluição da amostra} \times 50 \times \text{Abs}_{260}) / 1000$$

- Adicionar 5 µL da amostra a 195 µL de água (diluição de 40X) e ler a absorbância.

Etapas opcionais: Para as amostras que apresentarem um *pellet* escuro e/ou de difícil dissolução, pode-se utilizar o seguinte tratamento para melhorar a qualidade da amostra de DNA (tratamento com cloreto de lítio):

17. Adicionar 300 µL de cloreto de lítio (LiCl) 4 M, mantido em gelo, em cada tubo e manter os tubos em gelo por 30 minutos.

18. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4 °C (para isso, colocar a microcentrífuga em uma geladeira) e transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol e misturar a mostra agitando gentilmente. Manter em temperatura ambiente por 30 minutos.

19. Centrifugar os tubos a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 100 µL de etanol 70% gelado. Descartar o etanol e caso o pellet for removido da parede do tubo, centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.

20. Deixar o *pellet* e o interior do tubo secar em temperatura ambiente em uma câmara de fluxo laminar. Adicionar 100 µL de tampão TE.

PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Procedimentos:

1. Para uma reação, pipetar as seguintes soluções em um microtubo de 0,5 mL estéril:

Água miliQ.....	14,95 µL
Tampão (10X)	2,5 µL
dNTPs (10 mM)	0,5 µL
Iniciador direto (25 pmol/µL).....	1,0 µL
Iniciador reverso (25 pmol/µL).....	1,0 µL
MgCl ₂ (50 mM).....	0,75 µL
Taq DNA-polimerase (1 U/µl).....	0,3 µL
DNA molde (100 ng/µl).....	4 µL
Volume total.....	25 µL

2. Colocar a reação em um termociclador com a seguinte programação de ciclos de temperatura:

94°C/ 5 min - Temperatura Inicial/Denaturação do DNA

25 ciclos: (desnaturação/anelamento/extensão)

94°C/ 1 min e 30 seg - Denaturação

64°C/ 1 min e 30 seg - Temperatura de anelamento dos iniciadores

72°C/ 2 min - Extensão ou amplificação do DNA

72°C/ 10 min - Extensão Final

4° C/ indefinidamente - Armazenamento

3. Preparar 10 µl do produto da reação de PCR para eletroforese em gel de agarose

4. Submeter as amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Eletroforese

- **Materiais:**

Tampão TAE 50 X

Tris Base.....30,25 g

Ácido acético glacial.....7,14 mL

EDTA.....2,325 g

H2O q.s.p.....125 mL

Tampão de corrida: Diluir 5 mL do tampão TAE 50 X em 250 mL de H₂O

Corante de carregamento do gel (6X):

Azul de bromofenol.....0,0025 g

Xileno de cianol.....0,0025 g

Glicerol300 µL

H2O.....700 µL

Brometo de etídeo (10 mg/mL): Pesar 0,002g de brometo de etídeo e diluir em 200 µL de água.

- **Procedimento para preparo de gel de agarose 1,5%:**

Em um kitasato misture:

Agarose.....0,6g

Tampão TAE 50 X.....800 µL

H2O q.s.p.....40 mL

1. Aqueça no microondas por um minuto para derreter a agarose. Agite a solução, e repita o aquecimento por mais um minuto
2. Adicione 1,5 μL de brometo de etídeo (10 mg/mL)
3. Verta sobre a cuba previamente vedada e com o pente desejado. Espere solidificar.

Cuidado! O brometo de etídeo é mutagênico e cancerígeno. Não tocar nos géis corados com brometo de etídeo sem a devida proteção. Use sempre luvas para manusear o frasco e o gel com brometo de etídeo.

- **Preparo das amostras:**

Misturar nesta proporção: 10 μL de amostra com 2 μL do corante de carregamento do gel (6X)

- **Preparo do marcador:** 9 μL de tampão TE, 1 μL do marcador, 2 μL de corante de carregamento.

- **Eletroforese:**

1. Após a solidificação do gel, remova o pente e coloque o mesmo na posição de corrida na cuba
2. Cubra o gel com o tampão de corrida e carregue as amostras
3. Corra o mesmo por aproximadamente 30 minutos, com no máximo, 100V
4. Acompanhe a corrida pela migração dos corantes.
5. Visualizar as amostras de DNA resolvidas eletroforeticamente colocando o gel sobre transluminador com iluminação ultravioleta (Cuidado! O ultravioleta pode causar queimaduras e é mutagênico. Não visualizar os géis sem as devidas precauções de segurança). Usar óculos de acrílico com proteção UV.

Identificação por barcoding

Análises de diferentes sequencias obtidas por sequenciamento pelo programa BLAST.

Obs.: Se possível, trazer computador para todos realizarem esta parte prática.

Referências de base

Abe C. A., et al. Fungi Isolated from Maize (*Zea mays* L.) Grains and Production of Associated Enzyme Activities. **Int. J. Mol. Sci.** v. 16, p. 15328-15346, 2015

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** v. 67, p. 597-607, 1975

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HEBERT, P. D. N.; HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics** v. 23, p. 167-172, 2007.