



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

THAIS SOUZA CUNHA

**ESTUDO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE DA SINTASE DO CASBENO EM
Jatropha curcas L.**

**FORTALEZA
2018**

THAIS SOUZA CUNHA

ESTUDO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE DA SINTASE DO CASBENO EM
Jatropha curcas L.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C98e Cunha, Thais Souza.

Estudo do número de cópias do gene da sintase do casbeno em *Jatropha curcas* L. /
Thais Souza Cunha. – 2018.
52 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.

1. *Jatropha curcas* L.. 2. Sintase do casbeno. 3. Southern Blot. I. Título.

CDD 570

THAIS SOUZA CUNHA

ESTUDO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE DA SINTASE DO CASBENO EM
Jatropha curcas L.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabiano de Moura Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. José Roberto da Silva Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

Dedico esse trabalho aos meus pais e ídolos, Cezário e Zé (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe (e pai), Silvana, por estar sempre presente, mesmo que às vezes a mais de 5.600 km; e por seu infinito amor e apoio. Sem a senhora, nada disso seria possível.

Ao Professor Francisco Campos, a quem sou muito grata pela disposição do seu Laboratório e por ter me aceitado como estudante. Gostaria de agradecer pelo tempo, pelas valiosas sugestões e por todas as correções que me ensinaram a trabalhar de forma mais objetiva e clara.

Ao Fabiano, por estar sempre disposto a ajudar independentemente da situação, sempre me aconselhando com muita lucidez. Muito obrigada pela inesgotável gentileza e bondade, e por me orientar sobre o mundo acadêmico.

Ao José Roberto, por toda a imensurável ajuda durante o tempo em que passei no Laboratório. Tenho muito a agradecer por todo o conhecimento transmitido e toda a paciência que teve comigo. Meu muito obrigada por ter confiado na minha capacidade, isso foi fundamental para o crescimento da minha autonomia e confiança no meu próprio trabalho.

À minha avó Ana e minha tia Germana, que contribuíram imensamente para o meu crescimento pessoal, não poupando esforços e recursos para me manterem confortavelmente ao longo de todos os meus anos de vida.

Aos meus demais familiares, que através dos nossos momentos de glória, fracasso, benquerença e ojeriza, me ensinaram quase tudo do pouco que sei sobre a vida.

Ao meu namorado, Gabriel, pela extraordinária paciência, amor, carinho e apoio nesses últimos meses extenuantes. Meu muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos fantásticos e sempre muito solícitos que conheci no Laboratório de BioMol: Nil, Roberto, Fabiano, Isabelly, Moab, Domingos, Victor, Raquel, João, Manu, Magda e Jéssica, agradeço de coração toda a troca de informações, todas as brincadeiras, as acaloradas discussões e os lanches da tarde, que me fizeram crescer muito, tanto academicamente como pessoalmente.

Aos meus grandes amigos Átila, Nil, Mirele, Lucas, Mayara, João Marcos, Pedro e Carol, alguns dos maiores presentes que a graduação me deu. Não tenho palavras para agradecer todos os momentos compartilhados.

Aos meus amigos de infância e juventude, por todo o apoio e companheirismo, meu muitíssimo obrigado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante o período em que fui bolsista de iniciação científica.

À UFC, por todos os momentos de deleite e suplício.

“Não tenhamos pressa, mas não
percamos tempo.”

José Saramago

RESUMO

A planta *Jatropha curcas*, popularmente conhecida no Brasil por pinhão manso ou purgueira, é hoje objeto de muitos estudos dadas suas múltiplas potencialidades. A principal delas é a sua aptidão para o fornecimento de biocombustível para motores a diesel a partir da extração de óleo das suas sementes. Além disso, há o crescente interesse de se utilizar a massa de resíduo resultante da extração do óleo, muito rica em valor protéico, na suplementação da ração de rebanhos animais, uma vez eliminados os componentes tóxicos presentes na mesma. Os mais nocivos são os ésteres de forbol, diterpenos cuja via biossintética ainda não foi completamente elucidada, mas da qual se conhece a participação fundamental da enzima sintase do casbeno. Estudos demonstraram a presença de várias cópias para o gene da sintase do casbeno no genoma de *J. curcas*, e esse trabalho se propôs a investigar o número delas através do método de Southern Blot. Primeiramente foram realizadas diversas extrações de DNA genômico de folhas jovens para que pudéssemos, a partir de PCRs, obter duas sondas diferentes (foram usados dois pares de primers) marcadas com digoxigenina. Parte do DNA extraído foi digerido com as enzimas de restrição Pst I, Hind III, NcoI, NdeI e EcoR V. Para verificação da correta marcação das sondas com digoxigenina, foram feitos géis de agarose 1,5 % e testes de Dot Blot. Por fim, foi realizado o experimento de Southern Blot, imediatamente seguido pela detecção das sondas hibridizadas ao material nucléico fixado às membranas de nylon. Para tanto usou-se a reação de NBT/BCIP ao anticorpo anti digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina. O resultado obtido mostrou que pelo menos para os controles positivos (soluções contendo as sequências complementares às sondas, e também marcadas com digoxigenina) houve a transferência destas do gel para a membrana. Não se pôde visualizar reação alguma nas colunas em que foram aplicados o DNA digerido pelas enzimas de restrição. Um dos motivos pode ter sido o não reconhecimento do DNA pela sonda marcada, o que inviabilizaria a hibridização entre ambas; ou a quantidade de DNA digerido aplicado ao gel não ter sido suficiente para que houvesse hibridização em quantidade satisfatória para a visualização de bandas nas membranas.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L. Sintase do Casbeno. Southern Blot.

ABSTRACT

Jatropha curcas L., best known in Brasil as pinhão-manso and purgueira, it's nowadays an object of many studies given the large amount of it's different uses. The most important reason for many of these studies it is the fact that the oil extracted from the seeds can be used to produce a biofuel in engines run by diesel. Besides, there are an increasing interest for the kernel meal obtained after the oil extraction because of its high value in proteins, which could be used as a supplement in livestock feed, once eliminated all of its toxic constituents. The most harmful ones are phorbol esters, diterpenoids whose biosynthetic pathway was not completely elucidated, even though it is known the crucial participation of the casbene synthase enzyme. It has been demonstrated by studies the existence of many copies for the casbene synthase gene in the genome of *J. curcas*, but the number of copies is uncertain, thus this particular study has as a goal to inquire how many copies there is, through Southern Blot method. First, it was performed several DNA extractions of young leaves so that we could obtain two different probes (using two sets, forward and reverse, of primers) marked with digoxigenin, acquire from PCR. Part of this extracted DNA were digested with restriction enzymes such as Pst I, Hind III, NcoI, NdeI e EcoR V. To verified if the probes were marked correctly with digoxigenin, tests were performed using 1.5% agarose gel and Dot Blots. At last, the Southern Blot experiment was carried out, followed immediately for the detection of the hybridization between probes and DNA attached to the nylon membrane. The results showed that at least the positives controls were successfully transferred from the gel to the membrane. However, was not possible to see any reaction on the columns where is was applied digested DNA. One of the reasons may be the lack of recognition from the probe to the DNA, causing the non-hybridization between both of them. The amount of DNA digested put on the wells of the gel might have been insufficient for the hybridization with the probe since there was no hint of a band on the membranes.

Keywords: *Jatropha curcas* L. Sintase do Casbeno. Southern Blot.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Folhas de <i>Jatropha curcas</i> L	20
Figura 2	– Reação de transesterificação.	22
Figura 3	– Ciclização de Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP) em casbano pela sintase do casbano.	23
Figura 4	– Exemplificação da Hipótese de Neofuncionalização e Subfuncionalização.	25
Figura 5	– Representação gráfica da estrutura molecular da digoxigenina (DIG)–dUTP.	27
Figura 6	– Captura de tela do Programa PerlPrimer.	31
Figura 7	– Configuração esperada para a Sonda 1.	32
Figura 8	– Configuração esperada para a Sonda 2.	32
Figura 9	– Fotografias de alguns dos géis de agarose 1% das primeiras semanas de extração de DNA.	37
Figura 10	– Géis de eletroforese 1% de algumas das extrações de DNA fracassadas.	38
Figura 11	– Géis de eletroforese 1% das últimas extrações de DNA onde não se aplicou RNAses.	39
Figura 12	– Fotografia do gel de agarose 2% mostrando o resultado do teste para averiguação dos primers desenhados.	40
Figura 13	– Fotografia do gel de agarose 2% com produtos de PCR em duplicata.	40
Figura 14	– Fotografia de gel de agarose 2% com produtos de PCR marcados com digoxigenina.	41
Figura 15	– Fotografia de gel de agarose 2% de PCR com valores diferentes de temperatura de anelamento.	42
Figura 16	– Fotografia de gel de agarose 1,5% com os produtos de PCR.	43

Figura 17 – Fotografia das Membranas do Dot Blot das sondas amplificadas com os primers 1 e 2, respectivamente.	45
Figura 18 – Fotografia do Dot Blot feito com as sondas 1 e 2 amplificadas usando-se o Tampão Colorless.	45
Figura 19 – Fotografias do gel de agarose 1% para a visualização da digestão do DNA com enzimas de restrição.	47
Figura 20 – Fotografia da membrana onde se usou a sonda 1, após 25 minutos de reação.	48
Figura 21 – Fotografias das membranas onde foram usadas as sondas 1 e 2, após 3 horas de reação.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela da correspondência entre os valores de temperatura da PCR e dos algarismos numéricos que os representam na fotografia da Figura 14.

42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RT-PCR	Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PKC	Protein kinase C
FISH	Fluorescent in situ hybridization
PCR	Polymerase Chain Reaction
DIG	Digoxigenina
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Milli-Q	Água deionizada
bp	Base pair
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
UV	Ultraviolet
SSC	Saline-Sodium Citrate
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris/Borato/EDTA
PVP	Polyvinylpyrrolidone
BSA	Bovine serum albumin

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
³² P	Isótopo do Fósforo
³⁵ S	Isótopo do Enxofre
¹²⁵ I	Isótopo do Iodo
³ H	Trítio (Isótopo do Hidrogênio)
μL	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
pH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	<i>Jatropha curcas</i> L.	20
2.1.1	<i>Óleo de Jatropha curcas</i> L.	21
2.1.2	<i>Ésteres de forbol</i>	22
2.2	Cópias de um gene	24
2.3	Sondas marcadas com digoxigenina	25
2.4	Southern Blot	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	29
4.1	Extração de DNA	29
4.1.1	<i>Digestão do DNA com enzimas de restrição</i>	30
4.2	Desenho de primers	30
4.3	Fabricação da sonda marcada com digoxigenina	32
4.4	Dot Blot	33
4.5	Southern Blot	34
4.6	Detecção da sonda hibridizada na membrana de nylon	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Extração de DNA	36
5.2	PCR para construção das sondas marcadas com DIG	39
5.3	Dot Blot	43
5.4	Digestação com enzimas de restrição	46
5.5	Southern Blot	47
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O mundo enfrenta um grande dilema que envolve os âmbitos econômicos, sociais e ambientais: há o impulso de expandir mercados e de se fabricar mais produtos para a população humana constantemente em crescimento; e as suas consequências que são o agravamento, alguns diriam já beirando a irreversibilidade, dos impactos ao meio ambiente. O grande questionamento enfrentado por essa geração é o de buscar uma solução favorável para a necessidade de se produzir eficientemente causando o mínimo possível de agressões aos ecossistemas já tão lesados pela ganância do homem.

Após os entraves econômicos posteriores a primeira crise do petróleo em 1973, muitos pesquisadores brasileiros voltaram as suas atenções às fontes de biocombustíveis, como o álcool, que já vinha sendo estudado no país desde a década de 1920, de forma pioneira. Era de se esperar com a descoberta de que se poderá usar o petróleo e seus derivados por pelo menos mais 80 anos, que os estudos a cerca de fontes renováveis diminuíssem. No entanto, os prognósticos sombrios para o futuro recente devido às mudanças climáticas, fez com que se intensificassem as buscas por candidatos a fornecedores de energia limpa e que assim se diminuíssem os valores nas emissões de gases poluentes.

É nesse cenário que a planta *Jatropha curcas* L., comumente conhecida por pinhão manso, se destaca entre as oleaginosas, pois além de possuir óleo em quantidade e qualidade satisfatórias para o uso como biocombustível em motores a diesel, ainda gera um resíduo (torta) da extração do óleo que é bastante rico em conteúdo protéico e que pode vir a ser usado como recurso alimentar de rebanhos uma vez eliminados as moléculas tóxicas presentes na mesma. Não obstante, a *J. curcas* é conhecida por ser um vegetal de “terrenos marginais”, ou seja, cresce e floresce em solos pouco férteis ou que estejam entre áreas de cultivo de monoculturas para a produção de commodities indispensáveis à alimentação humana e animal (KING, 2009). Isso é de grande magnitude visto que para a semeadura dessa espécie de *Jatropha* não há renúncia em se plantar uma cultura que sirva como fonte alimentar de base.

Tendo em vista o máximo aproveitamento dos recursos, há bastante interesse em se desintoxicar a massa ou torta resultante da extração do óleo da

semente do pinhão manso. Já há a utilização desse resíduo como adubo uma vez que o mesmo apresenta elevados valores de nitrogênio, potássio e fósforo, mas espera-se que no futuro seja possível utilizar a torta na alimentação animal haja os valores altos de proteína. A principal razão pelo seu não emprego como suplemento em dietas de rebanhos é a presença dos ésteres de forbol (MAKKAR *et al.*, 1997). Não se conhecem ainda todas as rotas responsáveis pela produção desses compostos, mas sabe-se que a participação da enzima sintase do casbeno é essencial para a formação destes.

É imperativo que se elimine os ésteres de forbol de *Jatropha curcas* L. para que se possa usar comercialmente sua torta para fins alimentícios. Um modo eficiente é eliminando ou modificando a biossíntese dos ésteres de forbol a nível molecular. No entanto, antes que qualquer ação possa ser tomada, são necessárias investigações a fundo a respeito das funções desses compostos no metabolismo da planta e quais seriam as implicações sobre a fisiologia da mesma uma vez removidos esses componentes. Para que essas investigações possam ser realizadas, precisa-se elucidar primeiro as etapas que compõem a via biossintética dos ésteres de forbol e necessita-se conhecer os participantes envolvidos nela.

Com o intuito de expandir os conhecimentos acerca do gene da sintase do casbeno e sabendo que existem cópias do mesmo codificados no genoma de *J. curcas*, esse trabalho tem como objetivo principal estimar a quantidade de cópias desse gene. A partir disso, pode-se desenvolver estudos direcionados a fim de se esclarecer se as diferentes cópias atuam em diferentes pontos no metabolismo da planta, e quais seriam as principais delas envolvidas na produção dos ésteres de forbol. Posteriormente, testes poderiam ser realizados para verificar se o silenciamento das cópias de sintase do casbeno preditas para a formação dos ésteres de forbol é eficaz, uma vez que não haja mais a detecção dessas moléculas na planta; e se o vegetal não apresenta nenhuma alteração metabólica que venha a prejudicar seu desenvolvimento e reprodução.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas L. é uma planta da família Euphorbiaceae nativa dos trópicos americanos (Figura 1), mas que agora apresenta vasta distribuição, tanto na Ásia quanto na África, dada suas particularidades como resistência a longas estiagens e doenças. Ela é considerada um organismo de inúmeros serviços, podendo ser utilizada tanto para prevenir como controlar a erosão do solo, sendo também utilizada como cerca viva em fazendas, para impedir o trânsito de animais (OPENSHAW 2000; KING *et al.*, 2009). Apresenta diversas vantagens bastante importantes no seu sucesso em regiões áridas como se estabilizar bem ao solo seco e crescer rapidamente nessas condições. Além disso, possui em suas folhas substâncias tóxicas aos animais, o que lhe resguarda da herbivoria (OPENSHAW 2000).

Figura 1 – Folhas de *Jatropha curcas* L.



Fonte: dados do autor.

O epíteto genérico *Jatropha* deriva da palavra Grega “Jatros” que significa doutor, com “tropa” que significa comida. A etimologia do nome científico da planta explicita o seu histórico no tratamento de enfermidades, com determinados órgãos e tecidos tendo diversos propósitos. Extratos de pó de folhas solubilizadas em metanol e água destilada apresentaram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa*, essa última espécie bastante conhecida por sua resistência aos antibióticos e antissépticos comuns (AKINPELU, 2009).

A planta também apresentou atividade antiinflamatória estatisticamente significativa comparável ao fármaco Piroxicam e atividade analgésica comparável ao fármaco Paracetamol quando extratos de pó de folhas com metanol foram usadas em testes de indução de inflamação em ratos albinos Wistar (UCHE e APRIOKU, 2008) o que explica em parte os seus usos tradicionais em casos de picadas de cobras e reumatismo, por exemplo.

Quanto ao cultivo da planta, seus custos são geralmente baixos, uma vez que não são necessários grandes investimentos em adubação visto que a mesma cresce em solos pouco férteis e que se pode usar o próprio resíduo da extração do óleo da semente como adubo. Há facilidade na colheita das sementes e elas podem ser armazenadas por longos períodos sem que haja deterioração causada pelo seu óleo, como ocorre com outras oleaginosas. *Jatropha curcas* leva em torno de três anos para começar a produzir óleo em quantidades satisfatórias, estendendo sua produtividade por até quatro décadas (EMBRAPA, 2012).

2.1.1 Óleo de *J. curcas* L.

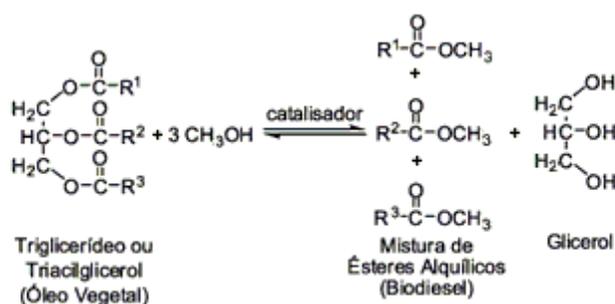
A planta apresenta de 25 a 50% de óleo viscoso em suas sementes (BRAGA, 1976; PRAMANIK, 2003), apresentando os maiores valores possíveis quando submetida a boas condições de plantio e disponibilidade de água. Do total da composição do óleo, 14,1% correspondem a ácido palmítico, 6,7% de ácido esteárico, 47% de ácido oleico e 31,6% de ácido linoleico, podendo-se obter frações com números um pouco diferentes a depender da variedade de *J. curcas* (KUMAR e SHARMA, 2008).

O óleo pode ser utilizado na fabricação de sabões e velas, e como substituto do querosene na indústria de cosméticos (KUMAR e SHARMA, 2008). Não é usado como recurso alimentar por apresentar substâncias tóxicas na sua composição, os ésteres de forbol. Foram identificados seis diferentes ésteres de forbol no óleo de *Jatropha curcas*, todos contendo o mesmo esqueleto de 12-hydroxy-16-deoxyphorbol (ADOLF *et al.*, 1984).

O grande interesse, no entanto, ao óleo do pinhão manso é o de que ele pode ser usado em motores a diesel pois a planta apresenta alguns dos ácidos graxos mais comumente usados como biodiesel: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoléico (KNOTHE, 2008). Para que materiais como o óleo de vegetais, gorduras animais e óleos usados em frituras possam ser convertidos em biodiesel, é necessário que ocorra a reação de transesterificação (Figura 2), reação onde um éster (triglicerídeo) e um álcool ao reagirem na presença de um catalisador, produzem um novo álcool e novo éster (monoéster) que possui propriedades físicas comparáveis ao diesel proveniente do petróleo (KNOTHE, 2008; KING, 2009).

Testes já realizados com biodiesel de pinhão manso mostraram uma emissão 80% menor de hidrocarbonetos e matéria particulada quando comparada com as emissões de diesel de origem mineral (MAKKAR e BECKER, 2009), o que indica a vantagem sustentável dessa fonte alternativa de energia em detrimento da queima de derivados do petróleo. Ainda não se utiliza de forma comercial o potencial do óleo de *J. curcas* no Brasil apesar das estimativas mais pragmáticas de que é possível se obter no mínimo duas toneladas de óleo por hectare (CARNIELLI, 2003).

Figura 2 – Reação de transesterificação.



Fonte: modificado de RINALDI, 2007.

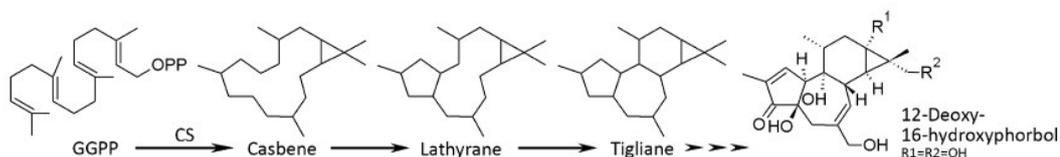
2.1.2 Ésteres de forbol

Após a extração do óleo, obtém-se um resíduo rico em proteína (de 53 a 63%), denominado de torta, que poderia ser utilizado na alimentação animal (ADERIBIGBE *et al.*, 1997; MAKKAR *et al.*, 1997; GOEL *et al.*, 2007), o que é inviável dada a presença de componentes tóxicos nessa massa, os ésteres de forbol. Esses ésteres são compostos de um diterpeno tetracíclico, o tigliano, e dois ácidos graxos

esterificados nos carbonos 13 e 16 do esqueleto de tigliano. São as moléculas mais tóxicas encontradas em *J. curcas*, sendo também produzidas por muitas outras plantas das famílias Thymelaeaceae e Euphorbiaceae (MAKKAR *et al.*, 1998; HAAS *et al.*, 2002).

A via biossintética é muito pouco conhecida e o único passo pressuposto de ocorrer é a ciclização do tigliano pela sintase do casbeno (Figura 3), onde geranylgeranyl pyrophosphate é convertido em um diterpeno monocíclico, o casbeno (SCHMIDT, 1987). A expressão gênica da sintase do casbeno é observada em plantas com mais de dez dias de germinadas, folhas maduras, raízes e na polpa de frutos, mas não em sementes (NAKANO, 2012). Uma vez que são encontrados ésteres de forbol nas sementes, mas estudos com RT-PCR em tempo real não mostraram expressão para nenhuma das sequências preditas de sintase do casbeno nas mesmas, provavelmente está ocorrendo o transporte desses ésteres dos tecidos onde são expressos para as sementes (KIRBY *et al.*, 2010; NAKANO, 2012).

Figura 3 – Ciclização de Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP) em casbeno pela sintase do casbeno.



Fonte: modificado de NAKANO *et al.*, 2012. Ciclização de Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP) em casbeno pela sintase do casbeno. O esqueleto de forbol tem por base a molécula de Tigliano (diterpeno tetracíclico) e todos os seis ésteres de forbol identificados no óleo de *Jatropha curcas* L. possuem 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol.

A sequência de cDNA da sintase do casbeno foi primeiro determinada para a planta *Ricinus communis* (RcCS1; MAU e WEST, 1994). Nakano *et al.* (2012) primeiro caracterizaram um homólogo da sintase do casbeno em *Jatropha curcas* (um cDNA de 2016 pb nomeado JcCSH) usando primers degenerados a partir de uma sequência bastante conservada em oito genes de sintase do casbeno de *R. communis* registradas nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Apesar de se conseguir extrair facilmente os ésteres de forbol das sementes em laboratório; os processos de extração com solventes usados em escala industrial ainda são incapazes de remover todos esses compostos da torta, o que inviabiliza o

seu uso na alimentação animal, por exemplo. Essas substâncias, dependendo da estrutura molecular do éster, podem induzir em animais tanto respostas inflamatórias, como também o surgimento de tumores a partir da ativação da proteína quinase C (PKC), que dentre outras funções, regula o crescimento e a diferenciação celular (MAKKAR *et al.*, 1997; GOEL *et al.*, 2007; ABDELGADIR e STADEN, 2013).

2.2 Cópias de um gene

Um dos primeiros pesquisadores a investigar a ocorrência de genes duplicados no genoma de um mesmo organismo foi Bridges em 1953. Ele estudava um exemplar de *Drosophila melanogaster* mutante que apresentava uma grande redução no tamanho do olho devido, ao o que autor considerou “um novo tipo desigual de crossing-over”, onde em um mesmo cromossomo foi encontrado duas cópias do mesmo gene (ZHANG, 2003; BRIDGES, 1953).

Desde então, percebeu-se com os primeiros sequenciamentos completos dos genomas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*), nematoda (*Caenorhabditis elegans*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), e de planta (*Arabidopsis thaliana*) que as cópias de genes eram muito comuns. É sugerido inclusive que a duplicação gênica oferece suporte para a diversificação evolutiva encontrada entre os seres vivos e que continua a impulsionar a diversidade visto que estudos atuais de sequenciamento de praticamente todos os seres eucarióticos exibem evidências de duplicações recentes de genes (LYNCH, 2002; LAWTON-RAUH, 2003).

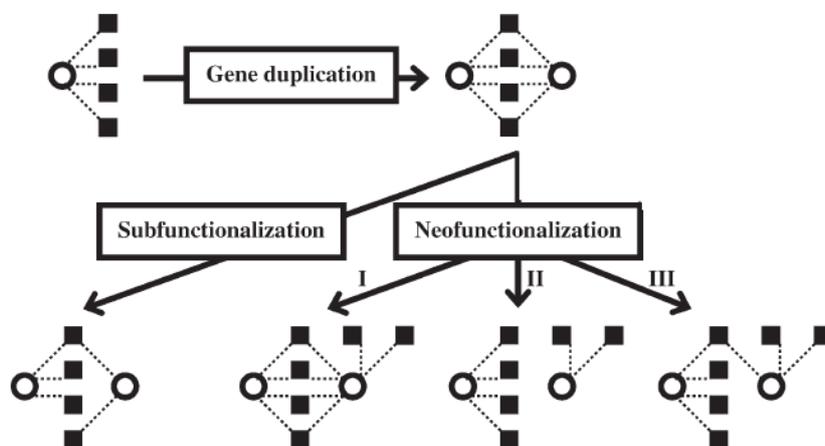
As causas para o surgimento de cópias de um mesmo gene são: crossing-over desigual, duplicação de um cromossomo ou mesmo de todo o genoma (muito comum em plantas) e eventos de retrotransposição (ZHANG, 2003). Após o evento de duplicação, espera-se que ocorra uma das três alternativas a seguir: uma das duas cópias passa a desempenhar uma nova função (a chamada hipótese de neofuncionalização; Figura 4); as duas cópias dividem a mesma função final, mas com cada uma desempenhando uma tarefa mais específica (hipótese da subfuncionalização; Figura 4); ou a seleção natural atua silenciando uma delas (FORCE *et al.*, 1999; LYNCH, 2002).

Alguns estudos recentes como os de Nascimento (2017) sugerem um número pressuposto de 14 genes para a sintase do casbeno em *J. curcas*, podendo-se

encontrar 7 sequências já anotadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), mas não se tem ainda um número concreto de quantas cópias esse gene possui. Também não existem trabalhos que diferenciam funções distintas, ou pelo menos etapas específicas, para as diferentes cópias do gene já anotadas.

A tentativa de silenciamento de todas as cópias, com o propósito de se tentar inviabilizar a produção dos ésteres de forbol, seria supérflua porque apesar de se conseguir cessar a síntese desses compostos, provavelmente afetaria-se também algum outro passo de uma dada via biossintética, acarretando em prejuízos para o organismo. Isso aconteceria porque se presume que pelo menos uma das cópias não esteja relacionada exclusivamente a produção dos ésteres de forbol, ficando assim evidente a necessidade de estudos que investiguem a fundo a quantidade de cópias e as suas devidas funções dentro do metabolismo de *Jatropha curcas*.

Figura 4 – Exemplificação da Hipótese de Neofuncionalização e Subfuncionalização.



Fonte: modificado de HE e ZHANG, 2005. Os círculos representam os genes, e os quadrados, as suas funções.

2.3 Sondas marcadas com digoxigenina

Uma sonda é uma molécula de fita (cadeia) simples de RNA ou DNA que possua uma grande afinidade por uma sequência específica de RNA ou DNA, visto que ambas (sonda e sequência alvo) são complementares, apesar de não o serem

perfeitamente complementares em algumas situações. O híbrido formado pode ser observado quando são usados tratamentos adequados de marcação e detecção. As sondas são muito utilizadas em experimentos de blotting e de hibridização in situ, e servem também para diagnosticar doenças ou síndromes como, por exemplo, pelo Método FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) bastante usado em investigações de anormalidades cromossômicas (WALKER e RAPLEY, 2005).

Geralmente, uma sonda de um gene apresenta de 100 a 1000 nucleotídeos, podendo abranger parte ou quase a totalidade da sequência de DNA do gene de interesse. Existem duas formas principais pelas quais se produzem esse tipo de sonda: através de clonagem ou de amplificação por PCR. No presente trabalho optou-se por utilizar o método de PCR porque além de amplificação se faz a marcação da sonda, no nosso caso com Digoxigenina.

As sondas podem ser marcadas com elementos radioativos ou não. As primeiras são marcadas com isótopos radioativos como ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I e ^3H sendo detectadas por autoradiografia. Esse tipo de sonda apesar de ter sido muito comum e de serem as mais sensíveis e com os maiores graus de resolução atualmente disponíveis para testes de hibridização, foram perdendo com o tempo a sua popularidade. Esse tipo de sonda gera resíduos perigosos às pessoas que as manipulam, apresentando riscos ao meio ambiente também, além de acarretarem em maiores despesas (MURO, 2005).

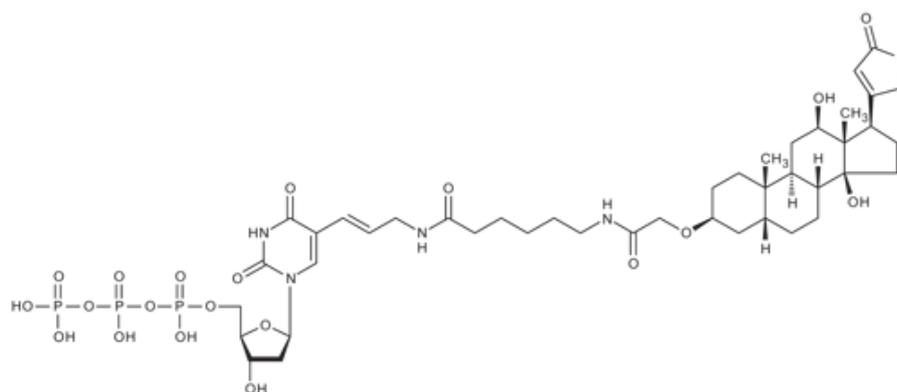
Sondas não radioativas apresentam inúmeras vantagens em relação as radioativas por serem mais seguras visto não possuem os riscos associados aos elementos radioativos, por apresentarem maior estabilidade, por serem menos dispendiosas e necessitarem de menos tempo para que o seu sinal seja detectado. Os métodos pelos quais se pode marcar e detectar sondas não radioativas são através do uso de Biotina, Enzimas, Quimioluminescência, Fluorescência, uso de Anticorpos e também pelo chamado DIG system (MURO, 2005); sendo o último o método escolhido.

Combinando-se a PCR com o método DIG obtemos por amplificação uma quantidade enorme de sonda marcada com digoxigenina. Esse tipo de PCR difere das demais porque se aplica à solução contendo um mix de dNTPs (com uma menor quantidade de dTTP) o marcador DIG-dUTP, que será incorporado à sonda enquanto esta estiver em processo de extensão no Termociclador.

A digoxigenina (DIG) é um esteróide hapteno encontrado em flores e folhas de três espécies do gênero *Digitalis* (*purpurea*, *orientalis* e *lanata*), geralmente é encontrada ligada a açúcares. É muito usada como um marcador de ácidos nucleicos justamente porque é introduzida por conjugação em biomoléculas, principalmente dUTPs (Figura 5), que posteriormente serão tratadas com anticorpos anti-DIG bastante específicos e de grande afinidade à digoxigenina (FARRELL, 2010). Geralmente o anticorpo anti-digoxigenina está conjugado a fosfatase alcalina que irá se ligar a sonda marcada com DIG hibridizada à sequência alvo. O sinal é detectado por colorimetria ou quimioluminescência para substratos da fosfatase alcalina.

O método mais convencional, e também o escolhido para esse estudo, de detecção colorimétrica é o que usa NBT (nitroazul de tetrazólio) e BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate). Ele consiste na hidrólise do BCIP pela fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo produzindo Indoxyl que ao formar dímeros dá origem a Leucoindigo. Esse último composto, por sua vez, sofre oxidação por NBT gerando blue 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro indigo (BCI). O NBT nessa reação é reduzido a Diformazan (DF), originando NBT-DF. Ao final da reação se obtém um precipitado de uma intensa cor roxa que é a mistura de NBT-DF e BCI (TRINH, 2007).

Figura 5 – Representação gráfica da estrutura molecular da digoxigenina (DIG) – dUTP.



Fonte: DIG Application Manual for Filter Hybridization.

2.4 Southern Blot

O experimento de Southern Blot é utilizado primordialmente para a detecção de uma dada sequência desejada de DNA que esteja espalhada em uma solução complexa com grandes quantidades de outras moléculas de DNA. O método foi

desenvolvido para identificar sequências homólogas no DNA genômico e para facilitar o mapeamento gênico (KROCKEZ, 1993). Ele é especialmente útil para estudos de múltiplas sequências similares no genoma pois é necessário apenas uma sonda para detectar essas várias sequências (HATTORI e USHIJIMA, 2011). O método foi desenvolvido por Southern (1975) e consiste, de fato, na transferência do material nucléico presente no gel de agarose para uma membrana, que pode ser de nylon ou nitrocelulose, a partir da qual se pode detectar sequências de interesse pela hibridização dessas sequências alvo a uma sonda marcada.

Antes que se possa realizar o procedimento de Southern Blot, é necessário extrair e purificar da melhor forma possível o DNA genômico do organismo de interesse. Em seguida, a amostra contendo o DNA deve ser digerida com uma ou mais enzimas de restrição (endonucleases) separadamente. A finalidade da digestão é a de que se obtenha fragmentos de variados tamanhos. Posteriormente, a amostra digerida é aplicada em um gel de agarose onde os fragmentos, que possuem carga, irão percorrer o gel por influência de um campo elétrico. A separação dos fragmentos dá-se pelo tamanho da molécula, onde aquelas que são maiores migram mais lentamente pela matriz de agarose.

Após a digestão o DNA precisa ser desnaturado usando-se uma solução alcalina, para que possa passar da conformação de dupla fita para uma fita simples, pois assim poderá hibridizar com a sonda. O gel então é posto em um aparato (sistema de transferência), de vidro ou de plástico, onde fica em contato com o tampão de transferência por baixo e a membrana logo por cima. Nas camadas superiores a membrana, são postas folhas de papéis toalha, uma placa de vidro e por fim um peso preferencialmente de 200 a 500g no topo do “sanduíche”, assim nomeado dado a disposição do conjunto. A pressão do peso, ou mesmo a utilização de sucção ao aparato, fazem com que por capilaridade o DNA presente no gel passe para a membrana mantendo a posição em que se encontrava anteriormente. Ao fim desse processo, a membrana é aquecida, se for de nitrocelulose, ou então é exposta a radiação UV, se for de nylon; para que o DNA fique aderido definitivamente à membrana. (ROCHE, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o número de cópias do gene da sintase do casbeno presentes no genoma de *Jatropha curcas* L. a partir do procedimento de Southern Blot.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair DNA de folhas de *J. curcas* L. para posterior digestão com enzimas de restrição.
- Desenhar primers específicos para o gene da sintase do casbeno a serem usados na construção da sonda marcada com digoxigenina.
- Fabricação de sonda marcada com digoxigenina provenientes de PCR para hibridização com o DNA genômico digerido.
- Experimento de Southern Blot para detecção do número de cópias da sintase do casbeno no genoma de *J. curcas* L.

4 METODOLOGIA

4.1 Extração do DNA

Inicialmente, folhas jovens de *J. curcas* L., germinadas em uma das casas de vegetação da Universidade Federal do Ceará, após coletadas, foram maceradas em nitrogênio líquido. O material obtido foi transferido para tubos eppendorf com 1 mL de tampão CTAB (2% CTAB; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% PVP). Cada tubo foi vortexado e em seguida posto em banho maria por uma hora a 65 °C. Transcorrido o tempo necessário, o material foi centrifugado a 13.500 rcf por cinco minutos e a fase aquosa foi transferida para outro tubo, onde foram adicionados 5 µL de RNase A, sendo os tubos postos para incubar por trinta minutos a 37 °C.

Findada essa parte, os tubos foram retirados do banho maria e adicionou-se 700 µL de clorofórmio e misturou-se a solução por leve inversão. Nova

centrifugação a 13.500 rcf foi feita por também cinco minutos, sendo 550 µL de solução aquosa transferida para um terceiro tubo onde foi adicionado igual quantidade de clorofórmio, para em seguida ser vortexado rapidamente. Novamente o tubo foi centrifugado nas condições já descritas e à camada aquosa, após ser depositada em um novo tubo, foi acrescido 550 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram então deixados por vinte minutos a temperatura de -20 °C, sendo depois centrifugados a 13.500 rcf por três minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao pellet que permaneceu no tubo foi adicionado 1,5 mL de etanol 70% gelado, para depois ser vortexado. Fez-se nova centrifugação a 13.500 rcf, mas dessa vez por dois minutos com o sobrenadante sendo descartado ao final. O pellet obtido como resultado desse processo foi colocado para secar por quinze minutos a temperatura ambiente. Uma vez seco, ele foi ressuspensado em 50 µL de água Milli-Q autoclavada sendo incubado a 65 °C por vinte minutos para posteriormente ser armazenado a -20 °C. Para comprovar a integridade do DNA extraído, 5 µL do material foram aplicados em um gel de agarose 1% em tampão TBE 1x (20 mL) usando-se a técnica de corrida em gel de agarose por eletroforese.

4.1.1 Digestão do DNA com enzimas de restrição

O DNA genômico extraído foi digerido em cinco tubos, separadamente, com as enzimas de restrição: Pst I, Hind III, NcoI, NdeI e EcoR V. Para as três primeiras enzimas a solução final foi de 80 µL, e para as duas últimas 50 µL. Em cada eppendorf foram adicionadas concentrações de água, tampão, enzima e DNA correspondentes aos exigidos pelos protocolos de cada enzima. Os conteúdos dos tubos foram misturados por pipetagem, sendo posteriormente postos no termociclador a 37 °C por meia hora. Findado esse tempo, foi adicionado uma segunda alíquota com as mesmas quantidades de enzima já previamente adicionadas, sendo os tubos deixados a 37 °C por 43 horas.

Após a digestão, 5 µL do material de cada tubo foi aplicado em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x (20 mL) para que fosse feita uma corrida em eletroforese a fim de averiguar se as enzimas haviam clivado com sucesso o DNA de *Jatropha curcas* L. para que o mesmo fosse usado como substrato para a

hibridização com a sonda. O restante do material foi armazenado na geladeira a 4 °C.

4.2 Desenho dos Primers

Primers são oligonucleotídeos curtos que se ligam a sequências complementares, e que são necessários para a atividade das DNAs polimerases na adição de novos nucleotídeos a cadeia crescente do DNA. Para o desenho dos mesmos fez-se um alinhamento dos aminoácidos de três sequências já descritas como sintase do casbeno para *J. curcas*: AIM47562.1, AIM47563.1, AIM47564.1 (código de acesso para essas sequências no NCBI); e duas para sintase do casbeno em *R. communis*: XP_015571191.1 XP_002513340.1 (código de acesso para essas sequências no NCBI). O alinhamento foi processado pelo programa MEGA Software.

Depois de escolhida a sequência mais conservada de aminoácidos, usou-se uma ferramenta do banco de dados do NCBI que faz a conversão de aminoácidos para bases nitrogenadas. Desse segmento obtido, várias possíveis sondas com seus respectivos primers foward e reverse foram testados no programa PerlPrimer para se descobrir quais seriam os melhores. O programa, como pode ser visualizado pela captura de tela (print screen) na Figura 6, indica os valores de anelamento, o conteúdo de C-G, a probabilidade de formação de dímeros entre os primers, dentre outras informações. A partir desses resultados, foram escolhidos dois pares de primers (foward e reverse para cada um) que servem para amplificar duas sondas diferentes no mesmo segmento como pode ser visualizado nas Figuras 7 e 8.

Figura 6 – Captura de tela do Programa PerlPrimer.



Fonte: dados do autor.

Figura 7 – Configuração esperada para a Sonda 1.

CGAGTATTTAGACAGCATGGTTTCAAATCTCTTCTGGTAAGCAACTTTAGATACATTTAA
 TAAGAACATGAATTGAATATATATACTAAACAACAATAAAATCAAGTAATATATACTG
 CAAATACTAGTTTGATTTGATGCATTGTGAATCAGATGTGTTCAACAAGTTCAAGGATAGTG
 ATGGTAAGTTCAAGGAATCCCTACTAAATGATATCAAAGGCATACTGAGCCTTTTTGAAGCT
 ACACATGTGAGCATGCCTAATGAACCCATTTTAGATGAGGCCTTAGCTTTCACCAAGGCTTT
 CTTGGAATCCTCTGCGGTTAAGTCATTCCCTAATTTGCAAAGCATATAAGCAGTGCACTAG
 AGCAGCCGGTACACAAAGGCATACCAAGGCTAGAGGCAAG

Primer forward 1:

CGAGTATTTAGACAGCATGG

Primer reverse 1:

CTTGCCTCTAGCCTTGGT

Fonte: dados do autor. As extremidades marcadas representam os trechos onde os iniciadores se ligam às bases complementares do DNA. O tamanho total da sonda é de 412 pb.

Figura 8 – Configuração esperada para a Sonda 2.

CAGAGTGCAGTTGCTACACCGAAGAATTAAGTCAATTTTCAAAGTAATTCATCTTTTTCTAT
 CAATATTGTTATTTTTTATTAATTAATCCTAATTAGAGTTTTGAACTTATAATTTTATGAT
 TAGAGGACTTATAAGTTAATAATTAACAATATTTTCAAGGTGGTGAAGAGTTTGAATATTAGT
 GCAGAGGTCCCATATGCAAGAAACAGAATGGCAGAGATTTTCTTTTGGGCGGTTTCTATGTA
 TTTTGAACCTCAATATGCAAAGGCTAGAATGATCGTCTCAAAGTCGTATTACTTATCTCAC
 TCATAGACGATACAATTGATGCATATGCCACTATTGATGAAATCCACCGTGTTCAGATGCA
 ATCGAAAGGTAAACATAAGTGGAGTTATTACAGGTAGAATAGGGGTACACAAATTAATGAA
 ATTTGATTTTTTATTTTCTGTTTAAATTTTCAATCAGGTGGGATATGAGATTAGTCGACCAACT
 GCCAATTACATGAAAGTAATCTATAGATTAATTATCAACACATTTGATGAATTTGAGAAAG
 ATTTGGAAGCAGAAGGAAAGTCCTACAGC

Primer forward 2:

CAGAGTGCAGTTGCTACACC

Primer reverse 2:

GCTGTAGGACTTTCCTTC

Fonte: dados do autor. As extremidades marcadas representam os trechos onde os iniciadores se ligam às bases complementares do DNA. O tamanho total da sonda é de 587 pb.

4.3 Fabricação de sonda marcada com digoxigenina

Quanto da construção das sondas para hibridização com a sequência de interesse no DNA genômico, foi realizada uma PCR (reação em cadeia da polimerase) com os seguintes reagentes: água Milli-Q RNase free (31,6 µL), mix com adenina, citosina e guanina (1 µL), timina (0,8 µL), uracila conjugada com

digoxigenina (2 μL), a enzima GoTaq® DNA Polymerase (0,6 μL ; Promega), os primers forward e reverse (2 μL cada) dos dois conjuntos de primers, o tampão (10 μL) que acompanha a enzima utilizada e a alíquota de DNA genômico (0,5 μL) que serviu de molde.

Foram usados os tempos e temperaturas recomendadas para cada ciclo no termociclador de acordo com as informações do protocolo das enzimas fornecido pelo fabricante. Com o produto de PCR obtido, fez-se uma eletroforese em gel de agarose para averiguação do sucesso do procedimento a partir da visualização em Transiluminador UV por comparação com o produto de uma outra PCR para uma sonda confeccionada a partir dos mesmos primers mas sem a uracila marcada com digoxigenina.

4.4 Dot Blot

Em seis tubos de 600 μL foram aplicados 2 μL de Tampão SSC 2x para se fazer uma diluição seriada da sonda marcada com DIG que seria comparada a diluição seriada de um controle também marcado com DIG, do qual sabia-se a concentração. No primeiro tubo foi aplicado 1 μL da solução contendo a sonda marcada. Após uma leve agitação no tubo seguido de uma centrifugação rápida no Spin, 1 μL da solução foi pipetada e adicionada ao segundo tubo. Tudo foi repetido igualmente até que se obtivesse 3 μL no sexto tubo. Da mesma forma se procedeu para as diluições feitas para o controle.

A seguir, 1 μL de cada tubo foi aplicado no espaço previamente delimitado de uma membrana de nitrocelulose, que foi deixada ao final das aplicações secando em uma placa de petri à temperatura ambiente por quinze minutos. A placa contendo a membrana foi então introduzida no aparelho de estufa, a 80 °C por duas horas para que a sonda ficasse fixada a mesma.

Em seguida, foram adicionados a placa de petri 10 mL de Tampão de Lavagem (0,1 M Ácido Maleico, 0,15 M NaCl; pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20). A placa então foi posta no agitador ficando sob oscilação, à temperatura ambiente, por três minutos, quando o tampão foi então descartado. 10 mL de Tampão de Bloqueio (0,1 M Ácido Maleico, 0,15 M NaCl; pH 7,5; 1% de BSA) foram adicionados a placa enquanto a mesma era agitada por trinta minutos. Após o descarte desse tampão,

foram adicionados 10 mL de Solução de Anticorpo (1 μ L de Anti digoxigenin- AP para 10 mL de Tampão de Bloqueio) e a membrana foi incubada sob agitação por trinta minutos.

Uma vez descartada a Solução de Anticorpo, a membrana foi lavada por agitação duas vezes com 10 mL de Tampão de Lavagem por quinze minutos cada. Ao final, a membrana foi equilibrada por três minutos com 10 mL de Tampão de Detecção (0,1 M Tris-HCl; 0,1 NaCl; pH 9,5). Para visualização dos pontos com a sonda marcada com digoxigenina, foi usado o Tampão de Colorização (10 mL de Tampão de Detecção; 350 μ L de NBT; 35 μ L de BCIP) que foi adicionado a placa de petri contendo a membrana após o descarte do Tampão de Detecção. O Tampão de Colorização permaneceu agindo por três horas, das quais esteve protegido da luz solar e artificial por papel alumínio envolvendo a placa. Quando os pontos apresentaram a intensidade desejada de cor, a reação foi terminada descartando-se a solução e substituindo-a por Tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), com o posterior armazenamento da membrana.

4.5 Southern Blot

O gel de eletroforese contendo o DNA genômico digerido foi depurinado ao ser submergido em 250 mM HCl, sob agitação em temperatura ambiente por 20 minutos, período em que o marcador azul de bromofenol presente no tampão mudou de cor para amarelo. Essa solução foi descartada e adicionou-se a Solução de Desnaturação (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) por 15 minutos, também sob agitação. Houve o descarte da solução e esse passo foi repetido. Depois do descarte da mesma, o gel foi lavado com água destilada, para ser submergido em Solução de Neutralização (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) à temperatura ambiente, por 15 minutos, sendo descartada ao fim do tempo para ser substituída por nova Solução de Neutralização repetindo-se o que havia sido feito por último. O gel foi então transferido para equilíbrio em 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM Citrato de Sódio, pH 7,0) por 10 minutos.

Em seguida o gel foi depositado no sistema de transferência, anteriormente descrito, para que os ácidos nucleicos fossem transportados por capilaridade, a partir da subida do Tampão de Transferência (20x SSC), para a membrana de

nitrocelulose. Esse procedimento perdurou por 12 horas (overnight). Transcorrido esse tempo, a membrana foi lavada com 2x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Citrato de Sódio, pH 7,0) e transferida para a estufa por duas horas a 80 °C com o propósito de fixar o DNA à mesma.

Após a determinação das quantidades necessárias de sonda, tampão de hibridização e a temperatura apropriada para a reação, deu-se início a fase de pré-hibridização que consistiu em transferir a membrana para um tubo Falcon de 50 mL contendo o Tampão de Pré-Hibridização (12,5 mL de Formamida; 7,5 mL de 20x SSC; 2,5 mL de Denhardt's solution; 250 µL de Herring Sperm DNA; 125 µL de SDS 20%). O tubo foi colocado na incubadora por meia hora a 42,0 °C sob agitação. Após esse período, o tampão foi substituído pelo de Hibridização (idêntico ao de pré-hibridização) acrescido da solução contendo a sonda (15 µL de sonda marcada com digoxigenina em 50 µL de água Nuclease Free). O tubo Falcon foi novamente posto na incubadora sob agitação, também à 42,0 °C, mas dessa vez permanecendo ali por 16 horas.

Na manhã seguinte, a membrana foi transferida para um reservatório de plástico contendo 40 mL de tampão Low Stringency (2x SSC contendo 0,1% SDS) sob agitação à temperatura ambiente. Passado cinco minutos, foi feita a troca do tampão usado por um novo de Low Stringency também de 40 mL mantendo-se as condições anteriores. Transcorridos mais cinco minutos, o tampão foi descartado e substituído pelo de High Stringency (0,1x SSC contendo 0,1% SDS) previamente aquecido a 68 °C ficando sob agitação por quinze minutos. Posteriormente o tampão usado foi substituído por um novo e repetiu-se o que havia sido feito antes.

4.6 Detecção da sonda hibridizada na membrana de nylon

A membrana foi inicialmente transferida para uma placa de petri contendo 10 mL de Tampão de Lavagem (0,1 M Ácido Maleico, 0,15 M NaCl; pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20) ficando sob agitação à temperatura ambiente por dois minutos, quando o tampão foi então descartado. 10 mL de Tampão de Bloqueio (0,1 M Ácido Maleico, 0,15 M NaCl; pH 7,5; 1% de BSA) foram adicionados a placa sendo a mesma posta no agitador por trinta minutos. Após o descarte desse tampão, foram adicionados 10

mL de Solução de Anticorpo (1,0 μ L de Anti digoxigenin- AP para 10 mL de Solução de Bloqueio) e a membrana permaneceu sob agitação por mais trinta minutos.

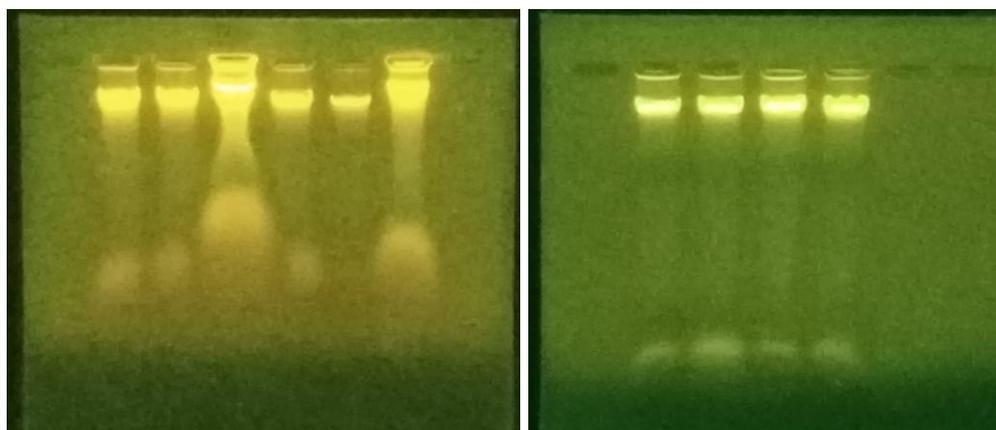
Uma vez descartada a Solução de Anticorpo, a membrana foi lavada sob agitação duas vezes com 10 mL de Tampão de Lavagem por quinze minutos cada. Ao final, a membrana foi equilibrada por três minutos com 10 mL de Tampão de Detecção (0,1 M Tris-HCl; 0,1 NaCl; pH 9,5). Para visualização das bandas com a sonda hibridizada ao DNA, foi usado o Tampão de Colorização contendo NBT/BCIP que foi adicionado a placa de petri contendo a membrana após o descarte do Tampão de Detecção. O Tampão de Colorização (0,1 M Tris-HCl; 0,1 NaCl; pH 9,5; 455 μ L de NBT; 45,5 μ L de NBIC) permaneceu agindo por três horas, das quais esteve protegido da luz solar e artificial por papel alumínio envolvendo a placa. Quando os pontos apresentaram a intensidade desejada de cor, a reação foi terminada descartando-se a solução e substituindo-a por Tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), sendo devidamente armazenada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrações de DNA

Durante todo o período que duraram os experimentos, foram feitas inúmeras extrações de DNA genômico necessários para a fabricação das sondas com digoxigenina e para a digestão com as enzimas de restrição, que posteriormente seriam usadas no Southern Blot. Nas primeiras semanas, como pode ser visto pelas fotografias (Figura 9) dos géis de agarose 1% para eletroforese, se conseguiu obter DNA “íntegro” (por conta dos processos de extração, não é possível se obter moléculas de DNA intactas, mas é possível conseguir moléculas de DNA relativamente não muito fragmentadas), e com valores de até 19,5 μ g/mL (ng/ μ L; [são requeridos no mínimo 5 μ g de DNA para cada aplicação nos poços do gel, segundo o protocolo seguido: DIG Application Manual for Filter Hybridization]) nas quantificações feitas no aparelho Qubit 2.0 fluorometer.

Figura 9 – Fotografias de alguns dos géis de agarose 1% das primeiras semanas de extração de DNA.



Fonte: dados do autor. O brilho, observado no transiluminador, das bandas de DNA deve-se a exposição do brometo de etídio (que se intercala aos pares de bases) à luz UV.

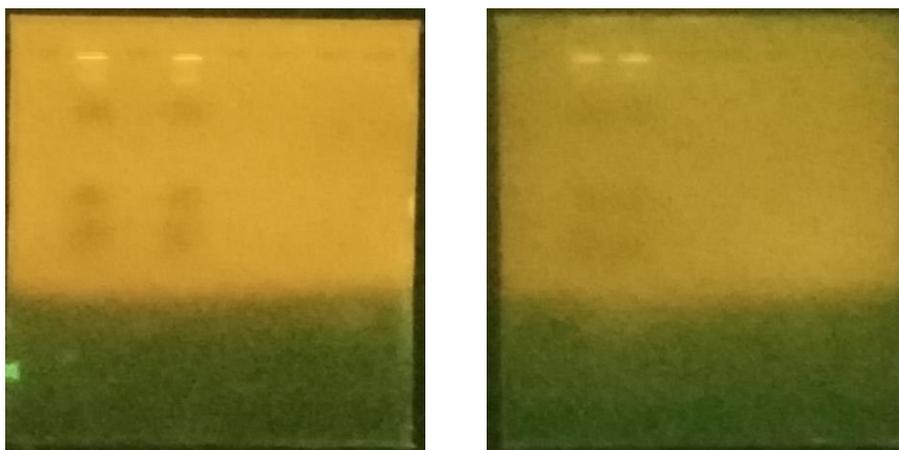
No entanto, findado o primeiro mês, as extrações se mostraram malsucedidas como se pode constatar pelas fotografias tiradas dos géis de agarose 1% na Figura 10 em que não é possível distinguir uma banda visível, próxima ao local de aplicação no poço, lugar em que se esperaria encontrar DNA. Como as amostras com DNA eram constantemente usadas para diversos fins, o fato de não estarmos mais conseguindo extrair DNA, usando o mesmo protocolo e sem alterar nenhum passo, foi alarmante. Nas semanas que se seguiram, foram feitos vários testes para se averiguar onde o erro poderia estar. Todos os tampões foram substituídos por novos, da mesma forma o foram as ponteiras. Apesar das mudanças, não houve diferença perceptível nos géis de agarose 1%.

Optou-se por fim, não seguir o passo do protocolo que estabelece a aplicação de RNase, pois era possível que os novos tubos eppendorf dessas enzimas (uma vez que as RNases em uso haviam acabado) estivessem contaminados com DNases o que poderia estar causando a degradação dos últimos DNAs extraídos. De fato, após essa decisão, não houve mais nenhum problema relacionado às extrações, mas as quantificações realizadas com Qubit 2.0 fluorometer mostraram valores de DNA variando entre 15,5 ng/ μ L e 18,0 ng/ μ L, o que é muito baixo e bastante discrepante em relação ao brilho intenso observado nos géis de eletroforese, como pode ser observado na Figura 11. Decidiu-se fazer a quantificação usando o aparelho NanoDrop e os valores variaram de 219 ng/ μ L a 383 ng/ μ L.

Pode-se também visualizar na Figura 11 que há logo abaixo da banda de DNA, o brilho característico do brometo de etídio intercalado aos ácidos nucleicos, que são provavelmente RNAs (que ao dobrarem sobre si próprios geram o pareamento local de suas bases, permitindo que o brometo de etídio possa se intercalar entre elas) e também DNA fragmentado. É interessante notar que nos géis das últimas extrações de DNA, que não tiveram contato com as RNAses dos supostos tubos de eppendorf contaminados com DNAses, há um brilho mais intenso e mais “arrastado” de material nucleico logo abaixo da banda do DNA.

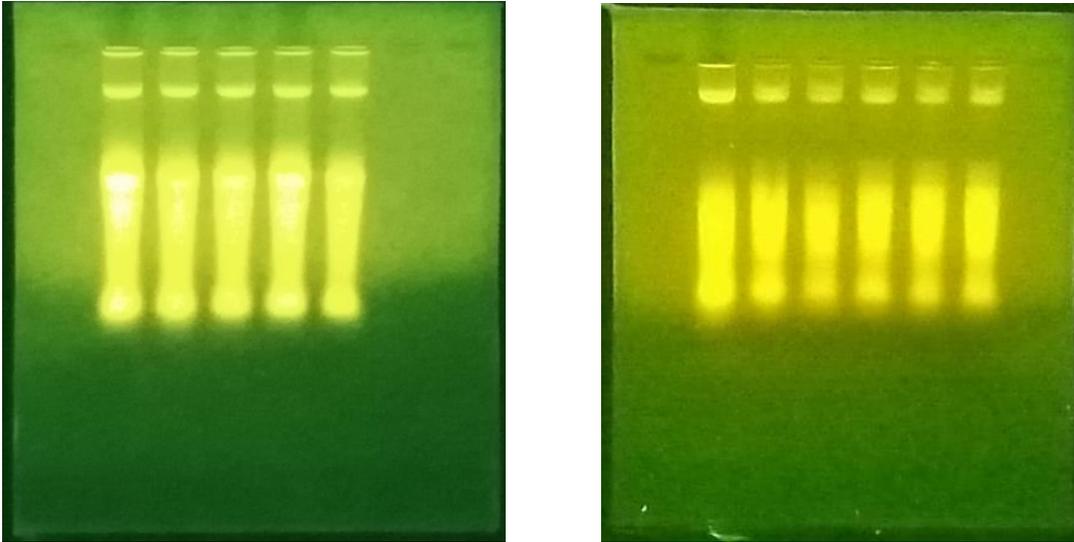
Ao compararmos os géis das Figuras 9 e 11, podemos perceber que em 9 o brilho do material nucleico abaixo da banda de DNA é muito menor, provavelmente porque as RNAses cumpriram seu papel e degradaram os RNAs ali presentes. Isso fez com que se diminuísse a quantidade de material nucleico abaixo da banda de DNA, conseqüentemente, havendo menos possibilidade para o intercalamento do brometo de etídio, e assim um brilho menor nessa região do gel em comparação aos géis da Figura 11 (onde não foram usadas essas enzimas). Quanto da comparação das fotos da Figuras 10 e 11, as colunas das fotografias da Figura 10 mal apresentam algum brilho, possivelmente porque além de ter tido seu RNA degradado pelas RNAses, teve também o seu DNA degradado pelos contaminantes de DNAses.

Figura 10 – Géis de eletroforese 1% de algumas das extrações de DNA fracassadas.



Fonte:dados do autor.

Figura 11 – Géis de eletroforese 1% das últimas extrações de DNA onde não se aplicou RNAses.

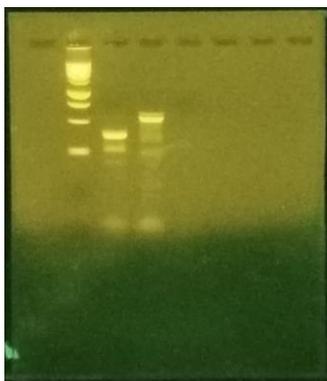


Fonte: dados do autor. A banda brilhosa superior é a de DNA íntegro, logo abaixo vemos o “arrastado” do restante do material nucléico (RNAs e DNA fragmentado).

5.2 PCR para construção das sondas marcadas com DIG

No dia 25/03 foi feito um teste para averiguação da eficiência dos primers desenhados. Como se pode observar pela fotografia do gel de agarose 2% (Figura 12) após a PCR com o Kit GoTaq® polymerase, os primers foram efetivos em se ligarem às suas respectivas sequências complementares. Na primeira coluna evidente (segundo poço), foi aplicado a solução contendo o marcador molecular. Na segunda coluna foi aplicado o produto de PCR da reação com o primer 1, o amplicon com 412 pb; e na terceira coluna, o produto da reação do primer 2, gerando o amplicon de 587 pb de tamanho.

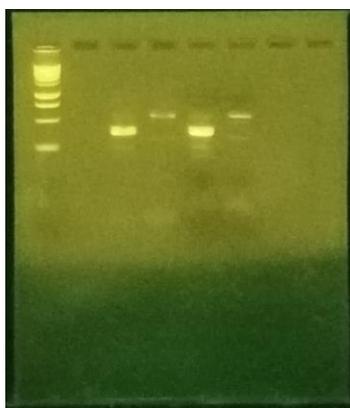
Figura 12 – Fotografia do gel de agarose 2% mostrando o resultado do teste para averiguação dos primers desenhados.



Fonte: dados do autor. Na primeira coluna se observam as bandas com os marcadores moleculares e nas demais, os produtos de PCR com os dois diferentes primers desenhados. 2ª coluna: amplicon do primer 1 (412 pb), 3ª coluna: amplicon do primer 2 (587 pb).

No dia 28/03 foi feito novo teste em duplicata com os dois primers, mas desta vez foi usado o Kit Pfu polymerase® (High Affinity, Promega) para a PCR. O intuito era o de se obter amplicons com o tamanho e sequência das sondas de interesse para que se usasse esses amplicons como molde para outra PCR usando-se DIG-dUTP e com isso evitar ligações indesejavéis entre os primers e sequências genômicas que não fossem o do gene da sintase do casbeno. Pode-se observar pela fotografia do gel de agarose 2% (Figura 13) dessa PCR que o resultado foi satisfatório.

Figura 13 – Fotografia do gel de agarose 2% com produtos de PCR em duplicata.

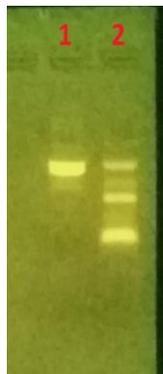


Fonte: dados do autor. Na coluna da esquerda estão as bandas dos marcadores moleculares. As bandas das colunas 2 e 4 pertencem a produtos de PCR em que se usou o mesmo primer (1). Da mesma forma, foi usado primer idêntico (2) para 3 e 5. Sondas não marcadas.

No entanto, por diversas vezes se tentou amplificar a sonda marcada com digoxigenina a partir dos produtos da PCR do dia 28/03, usando-se a enzima do kit Pfu polymerase®, sem sucesso como se pode ver em um dos géis de agarose 2% feitos, na Figura 14. Nessa foto, na segunda coluna onde foi usado o primer 2, vemos o brilho de três bandas quando era esperado que houvesse só uma, e com os fragmentos inespecíficos gerados menores do que deveriam ser. A fim de solucionar esse problema, foi feito um teste em que em uma mesma PCR seis tubos (para cada par de primers), foram submetidos a temperaturas de anelamento gradativamente maiores, para que se descobrisse a ideal.

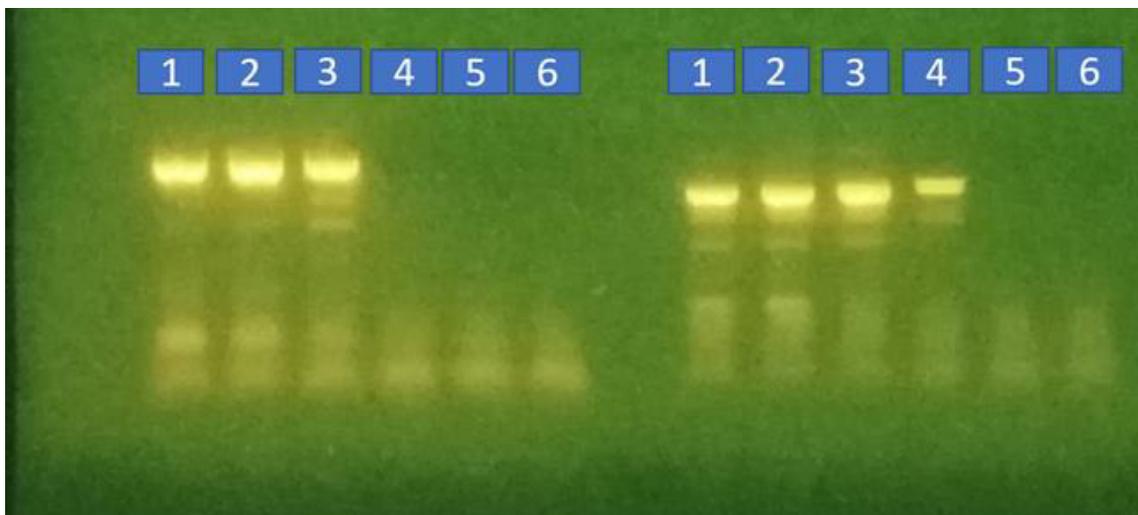
O objetivo era o de se conhecer a maior temperatura de anelamento possível para que dessa forma não se obtivessem fragmentos inespecíficos e menores do que aqueles requeridos. Como pode ser visualizado pela fotografia da Figura 15, a maior temperatura de anelamento para as duas sondas foi a de 59,7 °C. Nesse teste não foi usado DIG.

Figura 14 – Fotografia de gel de agarose 2% com produtos de PCR marcados com digoxigenina.



Fonte: dados do autor. Na coluna 1 temos a sonda amplificada pelo primer 1, e na coluna 2 temos fragmentos inespecíficos e menores do que o era esperado para a sonda amplificada pelo primer 2.

Figura 15 – Fotografia de gel de agarose 2% de PCR com valores diferentes de temperatura de anelamento.



Fonte: dados do autor.

Tabela 1 – Tabela da correspondência entre os valores de temperatura da PCR e dos algarismos numéricos que os representam na fotografia da Figura 14.

NÚMEROS	TEMPERATURA (°C)
1	55,0
2	56,3
3	59,7
4	63,4
5	67,3
6	69,6

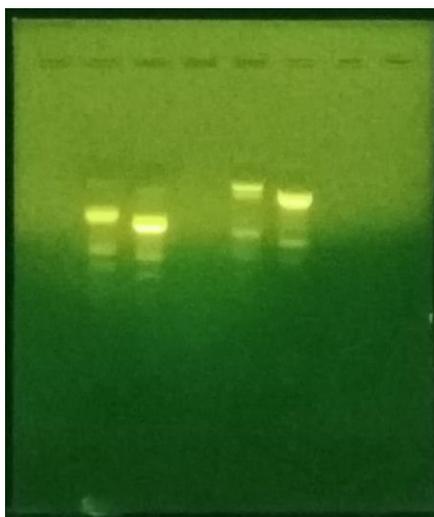
Fonte: dados do autor.

Várias novas tentativas de se obter amplicons marcados com digoxigenina por PCR foram feitas, mas todas foram frustradas. Por fim, decidiu-se usar DNA genômico como molde para a amplificação e a enzima e o tampão Pfu polymerase® foram substituídos pelo Kit da enzima GoTaq®. Também foram

refeitos os cálculos para as quantidades de cada reagente e se descobriu que as concentrações de tampão, dNTPs e Água Nuclease Free estavam incorretos. Foi feito então nova reação de PCR com digoxigenina marcada para dois tubos contendo os primers separadamente e também um controle positivo para as duas sondas onde não se adicionou a digoxigenina. Como pode ser observado na Figura 16, o resultado foi aparentemente satisfatório pois houve amplificação do material, restando apenas testar por Dot Blot se as sondas estavam marcadas com DIG e se as quantidades das mesmas eram suficientes para o procedimento de Southern Blot.

Por apresentar a uracila conjugada a digoxigenina, e essa acarretar em um peso maior para a sonda, quando comparamos as sondas marcadas e não marcadas com DIG amplificadas com o mesmo primer, podemos perceber que as últimas “correm” mais no gel do que as primeiras apesar de ambas apresentarem o mesmo número de pares de bases (Figura 16).

Figura 16 – Fotografia de gel de agarose 1,5% com os produtos de PCR.



Fonte: dados do autor. As bandas da primeira e segunda colunas são, respectivamente, a sonda marcada com digoxigenina da reação de amplificação do primer 1 e o seu controle positivo sem digoxigenina. Da mesma forma, o são as bandas das colunas três e quatro da amplificação com o primer 2. O molde usado foi DNA genômico.

5.3 Dot Blot

O propósito do Dot Blot é averiguar a presença da sonda, visto que se usa um anticorpo anti-digoxigenina para a detectar, e também quantificar a concentração da mesma por cada μL ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Como pode ser observado na Figura

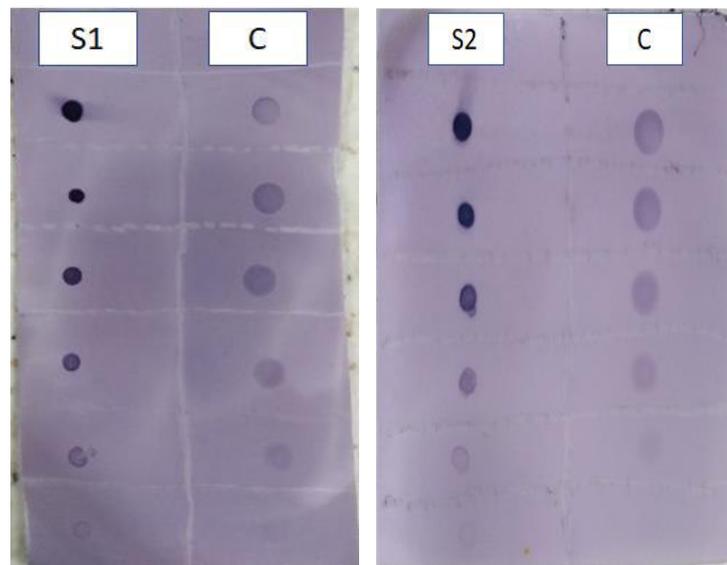
17, que mostra duas membranas onde foram aplicadas as sondas (S1 e S2, respectivamente para as sondas amplificadas com os primers 1 e 2) marcadas por DIG, pode-se constatar a existência de digoxigenina nas mesmas por conta da coloração roxa indicativa da reação entre a digoxigenina, o anticorpo e o NBT/BCIP. É possível perceber que os valores para a concentração das sondas são bastante altos pois apesar das diluições seriadas, ainda há muito material reagindo com o anticorpo até a terceira diluição.

Entretanto, não se observa a gradação de cor encontrada nas colunas das sondas para a coluna do controle (C) que seria usada para calcular as concentrações de DNA das sondas visto que a concentração de ácido nucléico (RNA) marcado com DIG na solução do controle é conhecida. Apesar das diluições seriadas, a intensidade da cor dos pontos do controle permanece praticamente a mesma nas três primeiras diluições.

Posteriormente fez-se novo Dot Blot, mas dessa vez com as sondas amplificadas por PCR usando-se o Tampão 5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer, pois havia a possibilidade de que o corante do Tampão 5x Green GoTaq® Reaction Buffer (usado na marcação das sondas da Figura 18) estivesse de alguma forma interferindo, aumentando ou diminuindo, a intensidade da cor dos pontos do Dot nas membranas. Também se esperava que os problemas encontrados nos pontos referentes aos controles no primeiro teste de Dot Blot fossem resultado de má pipetagem ou falhas ao se fazer as diluições.

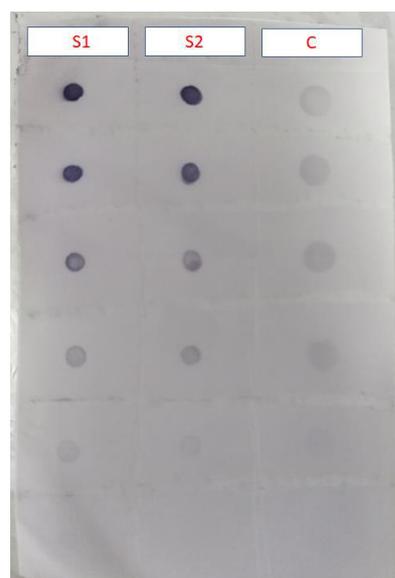
Entretanto, como pode ser visualizado na Figura 18, o problema persistiu e apesar das diluições seriadas, os pontos dois e três (de cima para baixo) são praticamente idênticos nos três testes para o controle, a despeito dos pontos das sondas, que em todos os testes, não apresentaram irregularidades. É provável que o problema esteja na solução do próprio controle, mas é difícil se precisar qual seria a causa para tanto.

Figura 17 – Fotografia das Membranas do Dot Blot das sondas amplificadas com os primers 1 e 2, respectivamente.



Fonte: dados do autor. As fotografias foram tiradas três horas após o início das reações. A coluna abaixo da letra S1 (sonda 1) contém os pontos resultantes da diluição seriada da solução contendo a sonda amplificada com os primers 1. Da mesma forma, as colunas abaixo das letras S2 (sonda do primer 2) e C (controle). Foi usado na PCR o Tampão 5x Green.

Figura 18 – Fotografia do Dot Blot feito com as sondas 1 e 2 amplificadas usando-se o Tampão Colorless.



Fonte: dados do autor. A fotografia foi tirada aproximadamente uma hora depois do início da reação. A coluna abaixo da letra S1 (sonda 1) contém os pontos resultantes da diluição seriada da solução contendo a sonda amplificada com os primers 1. Da mesma forma, as colunas abaixo das letras S2 (sonda do primer 2) e C (controle).

5.4 Digestão com enzimas de restrição

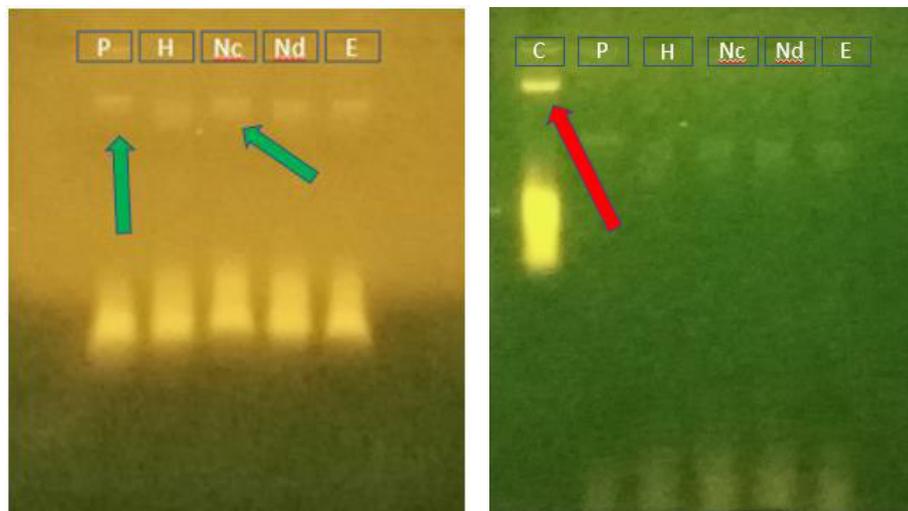
O DNA genômico selecionado para a digestão apresentava 383 ng/ μ L em um volume total de 250 μ L, sendo dividido para 5 tubos de 200 μ L. Nos tubos contendo as enzimas Pst I, Hind III e NcoI foram adicionados 52 μ L dessa solução de DNA, e nas dos tubos de NdeI e EcoR V, 26 μ L de solução de DNA. Isso porque as soluções contendo as três primeiras enzimas seriam divididas para as hibridizações com as duas sondas, já as soluções contendo DNA digerido com NdeI e EcoR V iriam hibridizar exclusivamente com as sondas 1 e 2 respectivamente.

Como pode ser observado pelas fotografias da Figura 19, tiradas depois de transcorridas 43 horas do início da digestão, o DNA foi de fato clivado. Na primeira fotografia, percebe-se o “arrastado” do material nucléico característico da fragmentação do mesmo, e também se nota a ausência de uma banda forte próxima aos poços onde se aplicam as amostras. O que vemos nesse local (setas verdes) é um fraquíssimo remanescente de DNA não digerido, talvez pelo fato de não ter sido possível que se passassem as 72 horas ideais de digestão, visto que o esperado era o de que o DNA estivesse o mais digerido possível.

Na segunda fotografia, que foi tirada após o acréscimo do controle negativo (C) ao mesmo gel da primeira fotografia; pode-se perceber a banda de brilho intenso do DNA não digerido na ponta da seta vermelha. Abaixo da banda de DNA vemos a presença de material nucléico, DNA (fragmentado naturalmente pelos processos de extração) e RNA, uma vez que a esse material não foi adicionado RNAses por medo de contaminação com DNAses (Figura 10).

É provável que parte do “arrastado” presente nas colunas identificadas por P, H, Nc, Nd e Ec seja desse mesmo material nucléico visualizado na coluna do controle (C), e surja a dúvida de que é somente isso o que vemos abaixo das setas verdes. Contudo é preciso lembrar que não há o brilho intenso da banda de DNA não digerido nessas colunas, o que indica que esse DNA foi de fato, em grande parte digerido pois nota-se sua ausência em todas as colunas onde foram usadas enzimas de restrição.

Figura 19 – Fotografias do gel de agarose 1% para a visualização da digestão do DNA com enzimas de restrição.



Fonte: dados do autor. P= Pst I; H= Hind III; Nc= NcoI; Nd= NdeI; E= EcoR V; C= controle negativo (sem enzima). Na segunda fotografia pode-se ver a coluna do controle negativo posteriormente adicionado ao gel. As setas verdes indicam os resquícios de DNA não totalmente digerido na reação com as enzimas de restrição. A seta vermelha indica a banda de DNA não digerido (controle).

5.5 Southern Blot

Para as duas sondas foram preparados dois géis de agarose 0,7% (seguindo o protocolo utilizado). Em cada gel, havia seis poços onde foram aplicados 20 μ L de solução. No gel da sonda 1, do primeiro ao sexto poço foram aplicados: a sequência complementar a sonda 1 (controle positivo), também marcada com digoxigenina; o produto da digestão com a enzima Pst I; o da digestão com Hind III; NcoI; NdeI; e DNA genômico não digerido (controle negativo). Para o gel da sonda 2 foram aplicados nessa ordem, do primeiro ao sexto poço: a sequência complementar a sonda 2 (controle positivo), também marcada com digoxigenina; o produto da digestão com a enzima Pst I; o da digestão com Hind III; NcoI; EcoR V; e DNA genômico não digerido (controle negativo).

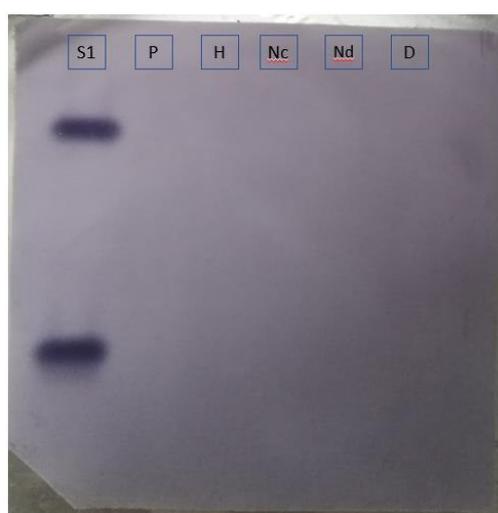
Aos géis no aparato de eletroforese foi aplicada baixa voltagem para que os fragmentos de DNA pudessem se distanciar uns dos outros satisfatoriamente na matriz do gel. Passadas duas horas de corrida, o gel foi posto no aparato de transferência para que os ácidos nucleicos migrassem para a membrana. No dia seguinte, a solução de hibridização foi vertida no tubo Falcon contendo a membrana

e no terceiro dia foram feitas as lavagens e os procedimentos de detecção, como já foi descrito na Metodologia.

Transcorridos 25 minutos do passo final do experimento de detecção (a reação entre o Anticorpo/NBT/BCIP), fotografou-se a membrana com a sonda 1 (Figura 20), onde se vê que houve a transferência do material aplicado ao gel para a membrana, pelo menos para as sequências complementares à sonda, devido a presença de duas bandas nesta coluna. O mesmo foi observado para a membrana contendo a sonda 2, apesar de não ter sido feito o registro fotográfico da mesma. Como o protocolo afirma que esse último passo deve prosseguir na completa escuridão e por aproximadamente três hora, os registros seguintes (Figura 21) foram feitos para as duas membranas após o término desse tempo mínimo.

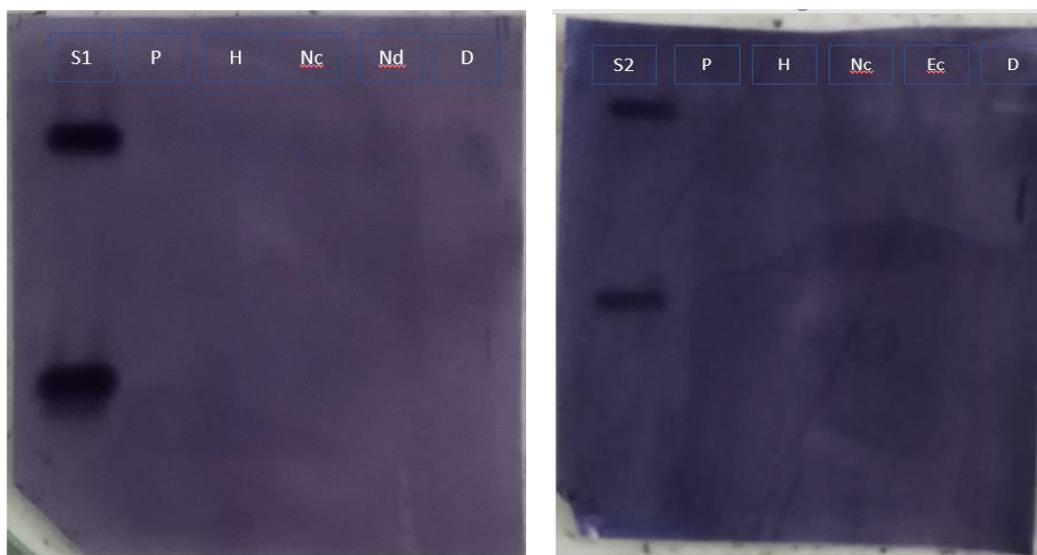
O fato de existirem duas bandas em cada uma das colunas das sequências complementares (Figuras 20 e 21) dizrespeito a dupla aplicação das soluções contendo essas sequências ao gel. Isso foi feito porque havia o receio de que por serem muito curtas (produtos de PCR) e pelo fato do gel ser 0,7% agarose, elas iriam “correr” rapidamente pelo gel sendo assim facilmente eliminadas da matriz, o que não aconteceu, talvez pelo fato de serem também marcadas com a digoxigenina, o que acarreta em um aumento no peso da molécula.

Figura 20 – Fotografia da membrana onde se usou a sonda 1, após 25 minutos de reação.



Fonte: dados do autor. S1= sequência complementar a sonda 1; P= Pst I; H= Hind III; Nc= NcoI; Nd= NdeI; D= DNA não digerido (controle negativo).

Figura 21 – Fotografias das membranas onde foram usadas as sondas 1 e 2, após 3 horas de reação.



Fonte: dados do autor. S1= sequência complementar a sonda 1; S2= sequência complementar a sonda 2; P= Pst I; H= Hind III; Nc= NcoI; Nd= NdeI; Ec= EcoR V; D= DNA não digerido. Pode se perceber que as bandas presentes na coluna S1 “correram” mais que as de S2, o que era esperado uma vez que S1 tem 412 pb e S2 tem 587 pb.

Como pode ser percebido pelas imagens, apesar de terem se passado as três horas de reação, não houve alteração nas membranas no que diz respeito ao aparecimento de bandas nas colunas onde foram aplicados o DNA digerido pelas enzimas de restrição. Também não foi possível ver bandas na coluna onde foi aplicado o DNA genômico não digerido pois esse material por não ter sido devidamente fragmentado em porções menores permaneceu relativamente muito concentrado próximo ao local onde foi aplicado o DNA no poço. Dessa forma então, dificultando o reconhecimento das sondas às sequências com quem deveriam hibridizar.

A não existência de bandas nas colunas do DNA digerido podem ser consequência do não reconhecimento pela sonda do DNA, mesmo tendo havido muito cuidado na seleção dos primers e das sequências que seriam amplificadas por eles. Além de toda a atenção direcionada para a escolha da sequência conservada a partir do alinhamento dos genes da sintase do casbeno em *Jatropha curcas* L. e *Ricinus communis* L.

É importante ter em mente que apesar da existência das bandas nas colunas das sequências complementares as sondas, não necessariamente houve

hibridização entre ambas. Isso porque, as sequências complementares também estavam marcadas com digoxigenina, o que seria suficiente para a detecção delas nas membranas, uma vez que a digoxigenina das mesmas poderia interagir com o anticorpo anti-DIG, e este por sua vez poderia interagir com NBT/BCIP. A intenção era de aplicar em um dos poços do gel a solução contendo as sequências complementares não marcadas com digoxigenina, mas pelo fato do gel só apresentar seis poços, isso não foi possível.

6 CONCLUSÃO

Apesar de ter havido a transferência (pelo menos para as sequências complementares a sonda) do material nucleico do gel para a membrana de nitrocelulose a partir do método de Southern Blot, não foi possível visualizar bandas nas colunas onde foi aplicado DNA digerido pelas enzimas de restrição Pst I, Hind III, NcoI, NdeI e EcoR V. Portanto, não foi possível estimar o número de cópias do gene da sintase do casbeno presentes no genoma de *Jatropha curcas* L.

Esse resultado, no entanto, direciona os próximos passos a serem tomados a fim de que se possa por fim detectar bandas nas membranas resultantes da hibridização da sonda com o DNA digerido. A primeira providência a ser tomada é a de se fazer um Dot Blot com o intuito de testar a possibilidade de hibridização da sonda ao DNA não digerido, e de descobrirmos se há o reconhecimento pela sonda das suas sequências complementares no DNA. Nesse mesmo teste, pode-se verificar a integridade das sondas (1 e 2), ao se usar como controle as sequências complementares não marcadas com digoxigenina. Ou seja, se houver a detecção dessas bandas na membrana é porque houve hibridização entre a sonda e as suas sequências complementares, mostrando que o problema não é de inviabilidade das sondas.

REFERÊNCIAS

ABDELGADIR, H. A.; VAN STADEN, J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. **South African Journal of Botany**, n. 88, p. 204-218, 2013.

ADERIBIGBE, A. O.; JOHNSON, C.O.L.E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter - and nitrogen degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, p. 223-243, 1997.

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.

AKINPELU, D. A.; AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. The bioactive potentials of two medicinal plants commonly used as folklore remedies among some tribes in West Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 8, p. 1660-1664, 2009.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3 ed. In: Congresso brasileiro de florestas tropicais, 2., 1976, Mossoró. Anais Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. p. 412-413 (Coleção Mossoroense, v. XLII).

BRIDGES, C. B., The Bar 'gene' a duplication. **Science**, v. 83, p. 210-211, 1936.

CARNIELLI, F. O combustível do futuro. Disponível em: www.ufmg.br/boletim/bul1413, n. 1413, 2003.

EMBRAPA. **Pesquisa e desenvolvimento para aproveitamento da torta de pinhão-mansão na alimentação animal**. 2012.

FARRELL, R. E. **RNA Methodologies - A Laboratory Guide for Isolation and Characterization**. 2010.

GOEL, G. *et al.* Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **Int J Toxicol**, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, 2002.

HATTORI, N.; USHIJIMA, T. **Handbook of Epigenetics**. 2011.

HE, X.; ZHANG, J. Rapid Subfunctionalization Accompanied by Prolonged and Substantial Neofunctionalization in Duplicate Gene Evolution. **Genetics**, v. 169, p. 1157–1164, 2005.

KING, A. J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2897–2905, 2009.

KIRBY, J *et al.* Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 71, n.13, p. 1466-1473, 2010.

KNOTHE, G. “Designer” Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 1358–1364, 2008.

KROCZEK, R. A. Southern and Northern analysis. **Journal of Chromatography**, n. 618, p. 133-145, 1993.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 1–10, 2008.

LAWTON-RAUH, A. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 396–409, 2003.

LYNCH, M. Gene duplication and evolution. **Science**, v. 297, p. 945-947, 2002.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K; SPORE, F., WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Agriculture and Food Chemistry**, n.45, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 111, p. 773–787, 2009.

MURO, M. A. Probe Design, Production, and Applications. **Medical Biomethods Handbook**, p. 13-23, 2005.

NAKANO, Y.; OHTANI, M.; POLSRI, W.; USAMI, T.; SAMBONGI, K.; DEMURA, T. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Plant Biotechnology**, v. 29, p. 185–189, 2012.

NASCIMENTO, J. R. S. **Análise da expressão de genes para a sintase do casbano em genótipos de pinhão manso com teor contrastante de ésteres de forbol**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1-15, 2000.

PRAMANIK, K. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. **Renewable Energy**, v. 28, p. 239-248, 2003.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007.

ROCHE DIAGNOSTICS GmbH. **DIG Application Manual for Filter Hybridization**. 2008.

SCHMIDT, R. J. The biosynthesis of tiglane and related diterpenoids; an intriguing problem. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 221-230, 1987.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Biotechnology**, v. 24, p. 122-139, 1975.

TRINH, L. A.; MCCUTCHEN, M. D.; BONNER-FRASER, M.; FRASER, S. E.; BUMM, L. A.; MCCAULEY, D. W. Fluorescent in situ hybridization employing the conventional NBT/BCIP chromogenic stain. **BioTechniques**, v. 42, n. 6, p. 756-759, 2007.

UCHE, F. I.; APRIOKU, J. S. The Phytochemical Constituents, Analgesic and Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Jatropha curcas* leaves in Mice and Wister albino rats. **J. Appl. Sci. Environ. Manage.**, v. 12, n. 4, p. 99-102, 2008.

ZHANG, J. Evolution by gene duplication: an update. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 18 n. 6, p. 292-298, 2003.