

Estudo de uma proteína Cry com actividade nematocida e obtenção da sequência genética codificante

Dissertação de Mestrado

Pedro Miguel Cordeiro Sousa

Mestrado em

Ciências Biomédicas



Estudo de uma proteína Cry com actividade nematocida e obtenção da sequência genética codificante

Tese de Mestrado

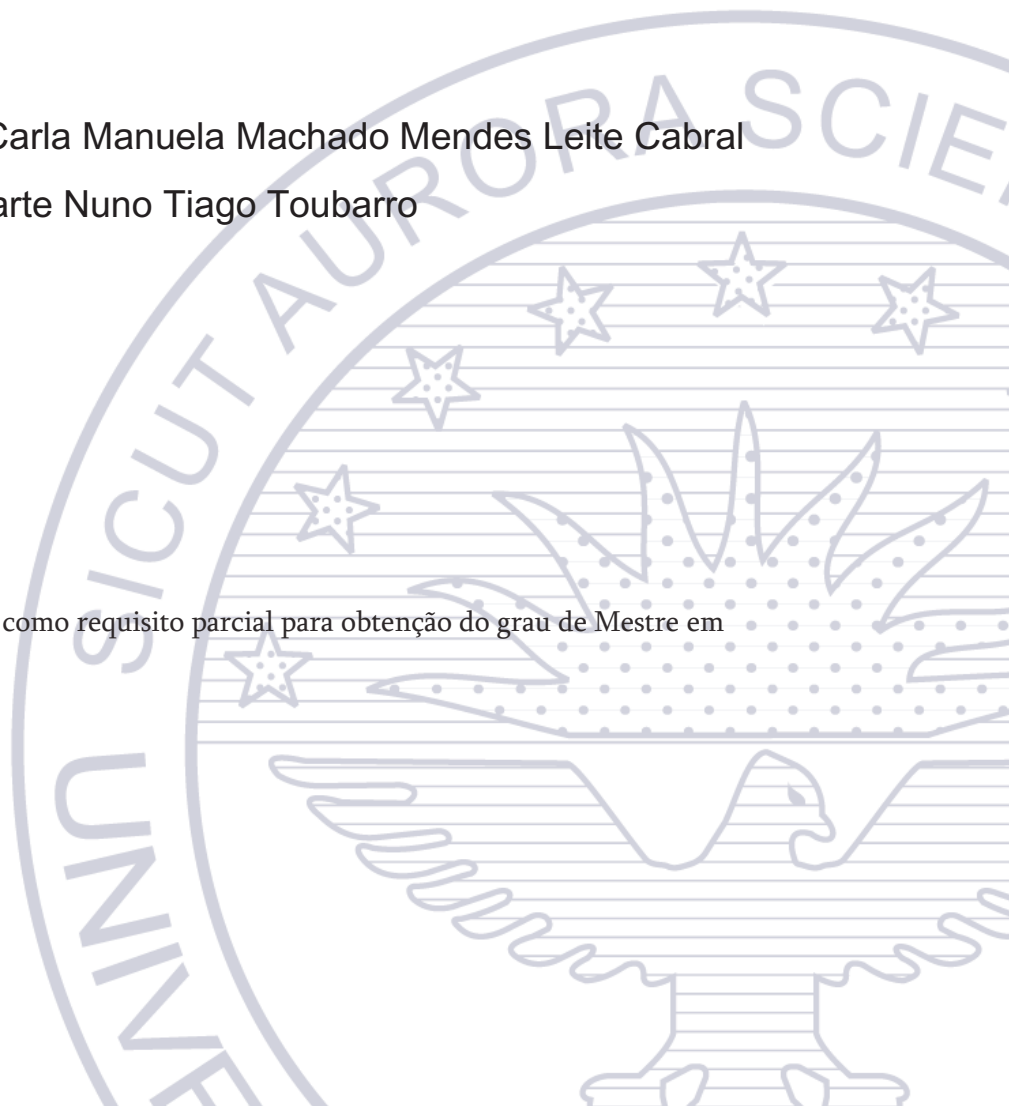
Pedro Miguel Cordeiro Sousa

Orientadores

Professora Doutora Carla Manuela Machado Mendes Leite Cabral

Professor Doutor Duarte Nuno Tiago Toubarro

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



Índice

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Objectivos.....	15
Material e métodos.....	16
Cultivo do isolado.....	16
Produção de esporos e cristais.....	16
Obtenção dos cristais.....	16
Obtenção da proteína solúvel – optimização das condições.....	17
Solubilização da proteína.....	17
Fraccionamento da proteína.....	17
Separação em SDS-PAGE.....	18
Ensaio de actividade nematicida.....	18
Manutenção e preparação da população.....	18
Preparação da população a testar.....	19
Preparação das microplacas para ensaio em meio líquido.....	19
1º Ensaio – Cristais de L8D e <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	19
2º Ensaio – Cristais e formas vegetativas de L8D em meio sólido.....	20
3º Ensaio – Cristais e proteína solúvel.....	20
4º Ensaio – Frações cromatográficas.....	20
Análise dos resultados.....	21
Determinação da sequência genética codificante.....	21
Extracção de DNA.....	21
SON-PCR.....	21
Preparação do mix de PCR.....	22
Condições de PCR.....	23
Observação dos resultados.....	24
Clonagem em TOPO-TA e transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	24
Seleção dos clones e extracção do DNA plasmídico.....	24
Sequenciação e análise das sequências.....	26
Obtenção da sequência codificante da região N-terminal da proteína Cry.....	26
Análise da sequência.....	27
Resultados.....	28
Obtenção dos cristais.....	28
Obtenção da proteína solúvel – optimização das condições.....	28
Fraccionamento da proteína.....	29

Separação em SDS-PAGE.....	32
Resultados dos ensaios nematocidas em <i>C. elegans</i>	33
1º Ensaio – Ensaio de mortalidade comparativa de cristais de L8D e <i>Bacillus thuringiensis kurstaki (BTK)</i> em meio líquido.	33
2º Ensaio - Ensaio de mortalidade em meio sólido de cristais e formas vegetativas de L8D em <i>C. elegans</i>	34
3º Ensaio – Ensaio de mortalidade em meio líquido de cristais de L8D e proteína solúvel em <i>C. elegans</i>	35
4º Ensaio – Ensaio de mortalidade das fracções correspondentes aos 3 principais picos do fraccionamento obtido por exclusão molecular.....	36
Obtenção da sequência codificante.....	36
Discussão.....	39
Obtenção da proteína solúvel - Optimização das condições	39
Separação por SDS-PAGE.....	39
Resultados dos ensaios nematocidas.....	40
Obtenção da sequência codificante	41
Considerações finais.....	42
Bibliografia.....	43
Anexos.....	50
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	54
Anexo 3.....	55
Anexo 4.....	57
Anexo 5.....	58
Anexo 6.....	60
Anexo 7.....	62

Resumo

É vital a pesquisa de novas toxinas com actividade nematicida, uma vez que os nematodes estão associados a uma vasta gama de problemas de saúde nos humanos e a presença de populações resistentes tem vindo a aumentar. Um estudo prévio revelou que um isolado de *Bacillus thuringiensis* do banco de entomopatógenos da Universidade dos Açores tinha a presença de uma sequência parcial de um gene com homologia com genes codificantes de uma família de proteínas de inclusão cristalina parasporal (Cry) com actividade nematicida. Este trabalho teve como objectivo averiguar a presença desta proteína, proceder a uma caracterização parcial e determinar a sua actividade nematicida. Teve por objectivo também a determinação da sua sequência genética codificante, utilizando a sequência parcial conhecida como base para uma abordagem de *chromosome walking*. Os cristais proteicos produzidos pelo isolado foram recolhidos, solubilizados, separados por SDS-PAGE, fraccionados por FPLC de exclusão molecular e a actividade nematicida de todas estas formas da proteína foram testadas. Para o *chromosome walking* procedeu-se a 3 ciclos de SON-PCR (*Single Oligonucleotide Nested PCR*), clonagem em TOPO-TA, transformação em *E. coli* e sequenciação *Sanger* dos fragmentos clonados. Os resultados mostraram que a proteína Cry, tanto na sua forma de protoxina cristalina de ~140kDa de peso molecular como na sua forma solúvel de ~70kDa apresentava toxicidade de forma dose-dependente, com mortalidades médias em *C. elegans* acima dos 90% nas doses superiores a 6,1µg de proteína solúvel. A sequência genética codificante obtida (4550bp) mostrou homologias na ordem dos 70% com sequências codificantes de outras toxinas de *Bacillus thuringiensis*, e a sequência de aminoácidos da proteína predita revelou baixas homologias (<45%) com outras proteínas Cry nematicidas (Cry21Ba1) e a presença de um domínio conservado relativo à família das toxinas Cry. Os resultados dos testes nematicidas apontam para o isolado em estudo como fonte de um eficaz agente nematicida, tanto na forma cristalina como solúvel da toxina. Relativamente à sequência codificante obtida, a homologia da sequência da proteína predita é baixa o suficiente para constituir um novo primeiro *rank* de nomenclatura de proteínas Cry, segundo o *Bacillus thuringiensis delta-endotoxin nomenclature committee*. Em suma, os resultados da toxicidade associados às baixas homologias encontrada para proteína predita apontam para que a proteína em estudo represente uma possível nova família de toxinas Cry com elevada toxicidade contra nematodes.

Palavras-Chave: *B. thuringiensis*, proteínas Cry, nematodes, nematicida, SON-PCR.

Abstract

Because nematodes are associated with a vast range of health problems in humans, and since there has been a rise in resistant populations, the search for new nematicidal toxins is of vital importance. A previous study showed a nematicidal parasporal crystalline inclusion protein (Cry) sequence homology with a partial genetic sequence from a *Bacillus thuringiensis* isolate from the Azorean entomopathogenic collection of the Universidade dos Açores. This study intended to ascertain the presence of this protein in the isolate, partially characterize it and determine its nematicidal activity. It also intended to determine the protein's coding sequence, by using the known partial sequence as the base for a chromosome walking approach. The crystalline proteins produced by the isolate were collected, solubilized, separated by SDS-PAGE, fractioned by size-exclusion FPLC, and its nematicidal activity determined in all the above forms. For the chromosome walking approach, 3 SON-PCR (Single Oligonucleotide Nested PCR) cycles were run, followed by TOPO-TA cloning, *E. coli* transformation and Sanger sequencing of the cloned fragments. Results showed that in both its ~140kDa molecular weight crystalline protoxin and ~70kDa soluble form, the protein showed dose-dependent toxicity in *C. elegans*, with over 90% average mortality rates on soluble protein doses greater than 6,1µg. The protein coding sequence obtained (4550bp) showed ~70% homologies with known *Bacillus thuringiensis* toxins, while the predicted protein amino acid sequence showed low homologies (<45%) with other known nematicidal proteins (Cry21Ba1), as well as showing the presence of a Cry toxin putative conserved domain. The nematicidal assays demonstrate that the Cry protein produced in question constitutes a powerful nematicidal agent, both in its crystalline and soluble form. Regarding the coding sequence obtained, predicted protein homologies are low enough to establish a new first rank of Cry protein nomenclature, according to the *Bacillus thuringiensis delta-endotoxin nomenclature committee*. In summary, considering the assayed protein toxicity and low predicted protein homologies, this protein may in fact represent a novel high nematicidal activity Cry protein family.

Keywords: *B. thuringiensis*, Cry proteins, nematodes, nematicidal, SON-PCR.

Introdução

Bacillus é um género de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, que apresentam uma forma alongada característica e produzem endósporos (Turnbull 1996). Apesar de alguns serem patogénicos para humanos, causando doenças como o carbúnculo, a maioria são saprófitos inofensivos. Estas bactérias, ubíquas no meio ambiente, são de grande importância económica, ambiental, médica e farmacêutica, com aplicações que vão desde a produção de antibióticos até à sua utilização em inseticidas (Turnbull 1996). Os *Bacillus* são extensamente utilizados na produção de enzimas com as mais diversas aplicações: desde catalisadores industriais (Cherry e Fidantsef 2003), até antitrombóticos (Choi e Sa 2000); coadjuvantes de cicatrização (Yaakobi et al. 2007); ou adjuvantes a antibióticos. (Okumura et al. 1977). São também muito utilizados na descontaminação e biorremediação de solos e meios aquáticos (Cybulski et al. 2003), como probióticos (Guo et al. 2006) e como fonte de novos compostos antibióticos (o *B. subtilis* é capaz de produzir mais de 20 compostos antibióticos diferentes (Stein 2005)).

Algumas das diversas aplicações práticas dos *Bacillus* derivam da existência de inclusões proteicas parasporais denominadas δ -endotoxinas, ou proteínas Cry (Palma et al. 2014)

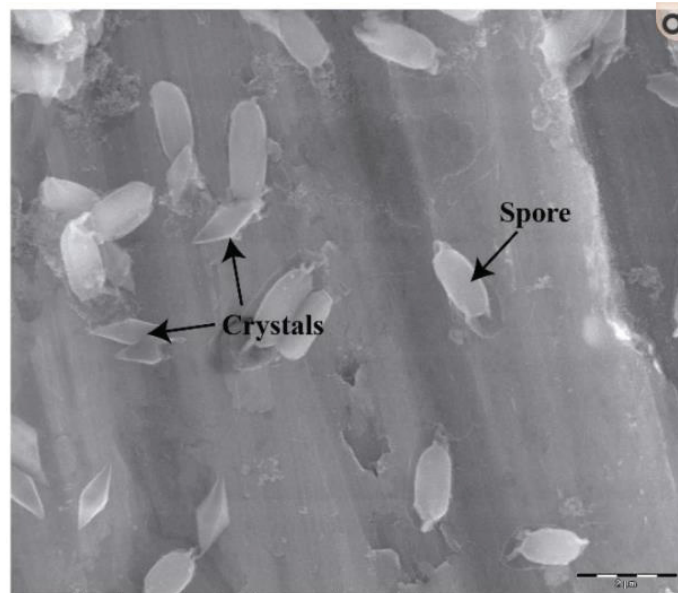


Figura 1: Preparação de microscopia electrónica de varrimento (20000x ampliação) de uma suspensão de proteínas Cry bipiramidais e esporos de *B. thuringiensis* H29.3 (Palma et al., 2004).

Proteínas Cry, como definidas por Crickmore et al., 1998, são proteínas de inclusão parasporal produzidas por *B. thuringiensis*, que demonstrem efeitos tóxicos num determinado organismo. Com base na homologia das sequências de aminoácidos, mais de 300 holótipos foram organizados em ~70 grupos (Xu et al. 2014). Em 1989 foi estabelecido o *B. thuringiensis Toxin Nomenclature Committee* afim de regulamentar a nomenclatura referente às toxinas Cry, assim como manter e actualizar uma base de dados de todas as toxinas conhecidas, disponível online em btnameclature.info (Ziegler et al, 2016). A família de toxinas Cry subdivide-se em quatro grandes subfamílias: a família Cry de três domínios (*three-domain Cry family* ou 3d-Cry), as toxinas *binary-like* ou Bin, as toxinas *mosquito-like* ou Mtx e por fim as toxinas citolíticas ou Cyt (Gill, Bravo e Soberón 2005). Estas famílias não partilham filogenia, e dentro delas a 3d-Cry é a mais dominante, integrando mais de 50 grupos distintos (Lucena et al. 2014). Mais de 700 de toxinas Cry já foram identificados (Lucena et al. 2014), na maioria dos casos com as suas sequências genéticas codificantes localizadas em plasmídeos de grande tamanho molecular (Palma et al. 2014). Estas sequências codificantes podem ser manipuladas para a formulação de novos compostos insecticidas, ou até na manipulação genética de espécies vegetais transgénicas resistentes a pragas (Sanchis 2011).

Estas proteínas cristalinas são formadas durante a fase estacionária de crescimento dos bacilos (Höfte e Whiteley 1989). Algumas têm elevada actividade insecticida, nematicida, e até citocida preferencial de células cancerígenas (parasporinas) (Xu et al. 2014). Por oposição, estas proteínas globulares apresentam uma actividade muito reduzida noutros vertebrados, incluindo humanos, e são biodegradáveis, conferindo-lhes assim grande potencial como biopesticidas e nematicidas alternativos aos agroquímicos convencionais (Bravo, Gill, e Soberón 2007). Algumas destas toxinas apresentam grande selectividade, como por exemplo as proteínas Cry1 apresentam actividade maioritariamente contra lepidópteros, e as proteínas Cry3 contra coleópteros (Gill, Bravo e Soberón 2005). De facto, a eficácia destas proteínas é tal que os insecticidas à base de *Bacillus thuringiensis* já se tornaram nos mais vendidos insecticidas biológicos até à data (Roh et al. 2007).

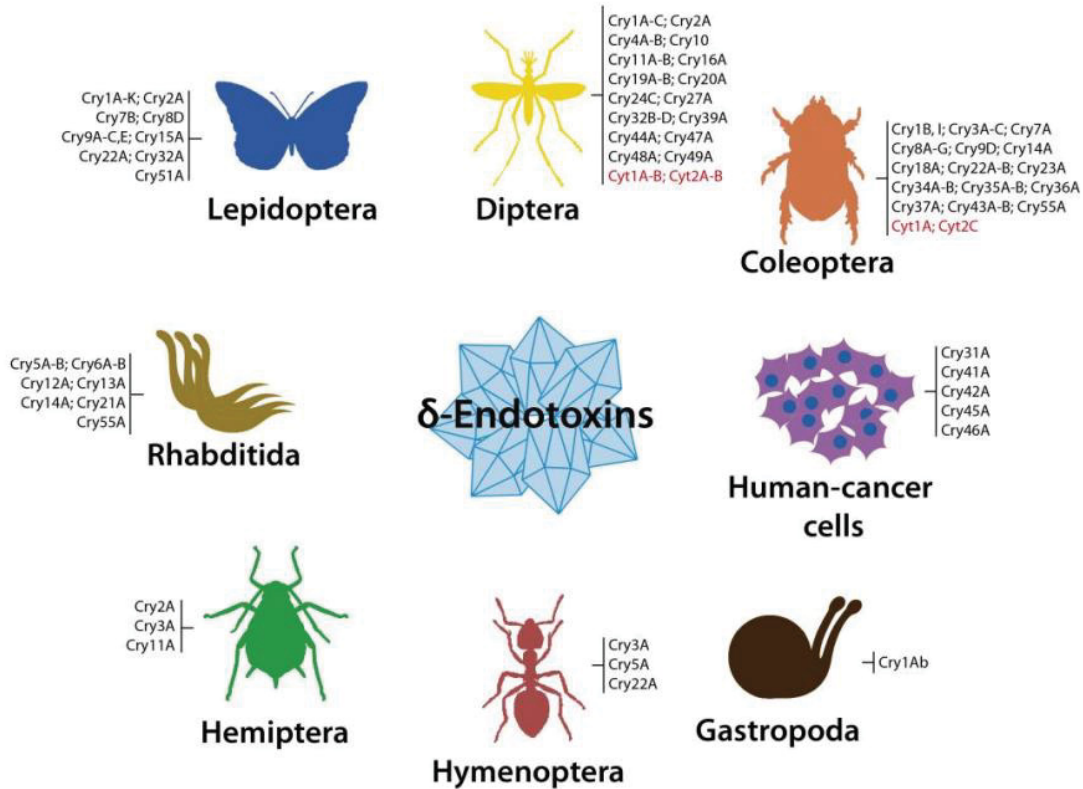


Figura 2: Esquema dos grupos taxonómicos onde se revelou toxicidade por parte de proteínas Cry e Cyt (a vermelho) (Palma et al. 2014).

Aquando da sua entrada em determinados organismos-alvo, como nematodes, as proteínas Cry funcionam como porinas de elevada especificidade, actuando ao nível dos receptores da mucosa intestinal. Após ingestão, as pró-toxinas são solubilizadas e proteoliticamente activadas na mucosa da secção intermédia do tubo digestivo. Posteriormente, por ligação a determinados receptores específicos, forma-se um poro, que leva à lise celular e eventual morte do organismo (Bravo et al. 2007).

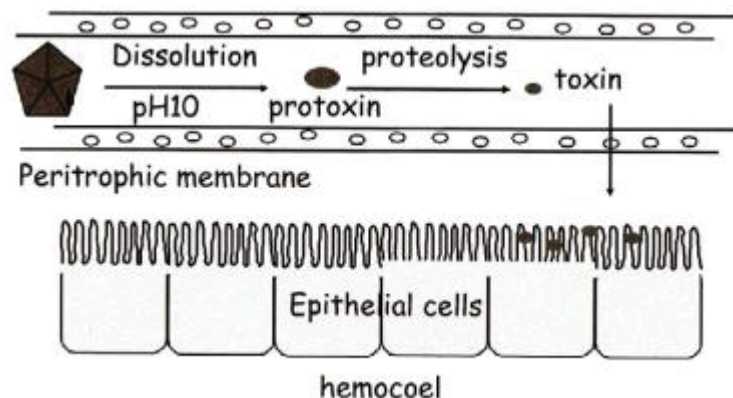


Figura 3: Esquema do modo de acção das proteínas Cry (Sanchis 2011)

Devido a este efeito as toxinas designam-se como “pore-forming toxins” ou PFTs. Existem dois grandes grupos de PFTs: toxinas α -hélice e toxinas folhas- β , dependendo da estrutura proteica constituinte do poro formado pelas toxinas (Xu et al. 2014). Tal como referido anteriormente, o maior grupo constituinte das proteínas Cry denomina-se de “*three-domain family*” ou 3d-Cry, pelos seus três domínios funcionais constituintes (Xu et al.) (Bravo, et al. 2007). O primeiro domínio é o principal responsável pela formação do canal iónico na membrana, e consiste num aglomerado de 7 α -hélices, em que 6 destas hélices se dispõem em torno de uma hélice central, a α -5. Estas hélices anfipáticas atravessam a bi-camada fosfolipídica da membrana para formar o canal iónico (Gill, Bravo e Soberón 2005). O segundo domínio determina a selectividade da proteína, e é o domínio menos conservado entre as diferentes Crys (de Maagd, Bravo, e Crickmore 2001). Consiste em folhas- β dispostas numa estrutura conhecida como o “ β -prism”. Por fim, o terceiro domínio consiste em duas folhas- β antiparalelas, e a sua função é a menos conhecida. Alguns estudos apontam para funções acessórias na formação do canal iónico (Schwartz et al. 1997), no entanto outros apontam para este domínio como responsável pela selectividade (de Maagd, Bravo, e Crickmore 2001).

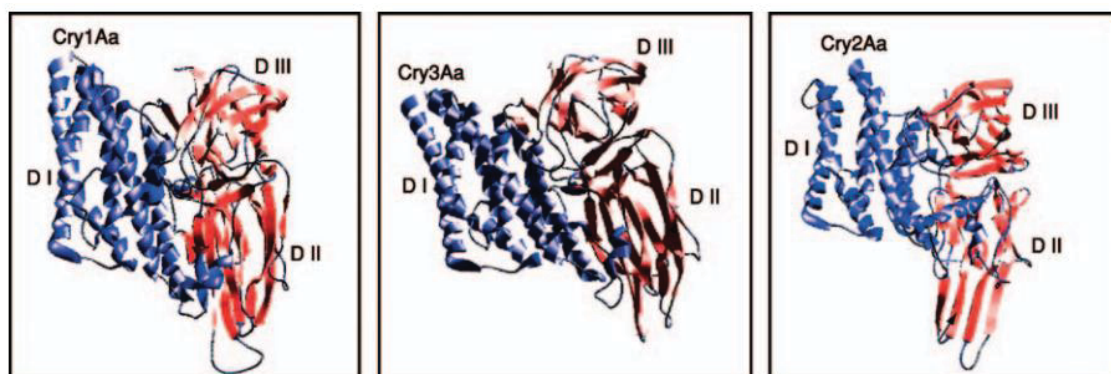


Figura 4. Algumas proteínas Cry, com os seus domínios identificados (Gill et al., 2005)

A sua eficácia contra nematodes tem vindo a ser comprovada cientificamente nas proteínas Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 e Cry55 (Zhang et al. 2012). Revela-se, por exemplo, que uma dose de 100mg/kg de Cry5B é capaz de eliminar até 90% do nematode *Ancylostoma ceylanicum* e até 70% de *Heligmosomoides bakeri* em hospedeiros suínos (Urban et al. 2013). Cry5B apresenta actividade tóxica contra um largo espectro de nematodes presentes na natureza. Também a Cry6Aa2 demonstrou uma forte atividade nematicida contra *C. elegans* e *Meloidogyne hapla*. Cry6A apresenta uma homologia muito baixa relativamente à sequência de aminoácidos de Cry5, o que implica

um modo de acção distinto devido a grandes diferenças na estrutura da proteína (Yu et al. 2014). Em *C. elegans* a Cry6A causou uma elevada taxa de mortalidade, redução do crescimento, dificuldades na mobilidade e diminuição da prole (Yu et al. 2015).

Nematode é a designação de todo um filo taxonómico, *Nematoda*, que engloba mais de 25.000 espécies diferentes de seres vivos (Hodda, 2007), ubíquos em quase todos os ambientes naturais do planeta, a maioria deles parasíticos. Os nematodes são protostómios multicelulares (~1000 células/indivíduo) de forma esguia e tubular, geralmente com ~1mm de comprimento e ~25µm de diâmetro (Lambert e Bekal, 2002). O organismo mais representativo do filo *Nematoda* é o *Caenorhabditis elegans*, um dos organismos biológicos mais estudados em toda a Biologia, e o primeiro ser vivo multicelular a ter o seu código genético mapeado. O estudo do *C. elegans* foi responsável por tremendos avanços na Biologia, especialmente em Biomedicina, nomeadamente ao nível da embriologia e biologia do desenvolvimento, biologia do comportamento, neurobiologia, e muitas mais. Permitiu também a compreensão de mecanismos evolutivos, funções e interações em células eucarióticas, e a parasita-hospedeiro (Corsi, et al 2015). Mais de 1200 artigos de investigação envolvendo *C. elegans* foram publicados nos últimos 5 anos, por mais de um milhar de laboratórios diferentes.

Uma das principais razões para a abundância de estudos envolvendo *C. elegans* prende-se com a sua versatilidade. Estes organismos têm um ciclo de vida relativamente rápido e um código genético extremamente bem caracterizado. É pouco dispendioso e relativamente fácil manter e manipular estes organismos, como poderá ser constatado na secção Material e Métodos. Também são bastante fáceis de observar, uma vez que o seu tamanho quase “macroscópico” e transparência do organismo dispensa técnicas de microscopia, colorações ou fixações para utilizações típicas. Contudo, ampliações maiores podem levar à observação de infraestruturas biológicas constituintes do nematode, o que permite aos investigadores estudarem mecanismos e interações ao nível de células individuais de determinados órgãos e sistemas. A utilização de proteínas fluorescentes como a GFP (*Green Fluorescent Protein*) possibilitou também o estudo de promotores genéticos (Goverse et al. 1998), expressão e regulação genética (Boulin, Etchberger, e Hobert 2006), e a estrutura e interacção entre proteínas (Feinberg et al. 2008).

Um dos apanágios dos nematodes como organismo modelo é a sua semelhança com outros invertebrados, particularmente os insectos. Esta similitude revela-se em várias

facetar, como por exemplo na identificação de novos compostos insecticidas pela sua acção em *C. elegans* (Sluder et al. 2012), estudo da evolução e função de efectores antimicrobianos em artrópodes (Dierking, Yang, e Schulenburg 2016), entre outros. É possível também extrapolar hipóteses científicas para organismos mais complexos, como vertebrados, a partir de estudos nematológicos, tais como mecanismos de envelhecimento e longevidade em mamíferos (Altintas, Park, e Lee 2016), como modelo para estudos de toxicidade (Hunt 2017), e até no estudo de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Alexander, Marfil, e Li 2014).

As infecções causadas por nematodes presentes no solo e meios aquáticos representam uma grave preocupação ao nível da Saúde Pública em países em desenvolvimento. A taxa de mortalidade associada a estes nematodes chega a atingir valores comparáveis aos da malária ou tuberculose (Hu et al. 2010) (Hotez et al. 2008). A nível monetário, estima-se um gasto de aproximadamente 77 biliões de dólares americanos devido a nematodes parasitas (Sasser e Freckman 1987). Os nematodes são responsáveis por anorexia e subnutrição em crianças, para além de causarem défice cognitivo e de crescimento nas mesmas. No caso de mulheres grávidas, estas estão especialmente propícias à morte durante o parto, anemia, e a darem à luz a bebés mortos ou com baixo peso à nascença (Hu e Aroian 2012). As infecções por nematodes parasitas são também extremamente debilitantes do sistema imunitário do hospedeiro, exacerbando a severidade do HIV/Sida (cuja taxa de incidência é muito elevada nos países em desenvolvimento), aumentando a susceptibilidade à malária e tuberculose, e reduzindo a eficácia das vacinas contra a tuberculose e cólera (Hu et al. 2010). Estes problemas de saúde realçam que ainda existe uma ausência de compostos nematicidas eficazes. Também se verificam cada vez mais instâncias de populações resistentes às proteínas Cry, derivado à sua extensa utilização (Tan et al. 2010). É vital por esse motivo que haja uma pesquisa contínua de novos compostos nematicidas, com maior toxicidade e especificidade, para aumentar a diversidade de toxinas ao nosso dispor e ultrapassar possíveis problemas associados a populações resistentes. Neste aspecto as proteínas Cry com origem em *Bacillus* destacam-se como uma das melhores fontes naturais de novas toxinas (Gao et al. 2016). Para esta pesquisa, várias abordagens diferentes podem ser adoptadas. Exemplos incluem a elaboração e expressão de bibliotecas de DNA (Shu et al. 2009), hibridização de fragmentos de sequências *cry* como sondas (Beard, Ranasinghe, e Akhurst 2001), e amplificação por PCR recorrendo a múltiplos *primers* (Kalman et al. 1993). Estas

abordagens procuram e utilizam os chamados “*cry-type genes*”, fragmentos genéticos altamente conservados entre as sequências codificantes de Crys conhecidas (Kuo e Chak 1996). Estes genes contam com cinco blocos conservados na estrutura do gene, presentes em quase todos os genes *cry* (de Maagd, Bravo, e Crickmore 2001).

Raimundo et al. mostrou em 2016 a presença de um isolado, denominado L8D, com um destes *cry-type genes* na colecção de entomopatógenos do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores. Para o estudo deste isolado e da potencial toxina associada, atendendo às vantagens e desvantagens das diferentes abordagens (Noguera e Ibarra 2010), procedeu-se à amplificação por PCR recorrendo a múltiplos *primers*, num processo designado por *chromosome walking*, e clonagem de sequências flanqueantes. *Chromosome walking*, como definido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), é o procedimento através do qual uma zona conhecida do gene é utilizada como sonda para identificar e caracterizar outros fragmentos adjacentes de forma sucessiva, até se isolar o locus de interesse numa região desconhecida do código genético. Este procedimento está fortemente alicerçado em técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*), que utiliza pequenas fragmentos genéticos complementares (*primers*) como moldes para que uma DNA polimerase possa replicar a sequência de interesse, em ciclos térmicos.

Várias metodologias foram desenvolvidas ao longo dos anos para melhor utilizar o PCR no *chromosome walking*, introduzindo modificações especiais para ultrapassar a incapacidade de criar *primers upstream* e *downstream* da sequência a amplificar (Antal et al. 2004). Estas metodologias diferem ao nível da origem e constituição dos *primers*, a introdução ou não de passos de ligação (*ligation-mediated PCR*), entre outros (Wang et al. 2011). Naturalmente, estas técnicas possuem vantagens e desvantagens quando comparadas entre si, tais como a especificidade da reação, a quantidade de tempo e os recursos que são necessários despende, entre outros. A título de exemplo, o *inverse-PCR* levanta problemas devido à disponibilidade de sítios de restrição, e o *Random-PCR* produz produtos de PCR inespecíficos. Uma pequena revisão das vantagens e desvantagens das principais metodologias de PCR utilizadas no *chromosome walking* foi publicada por Tonooka e Fujishima em 2009. A abordagem escolhida para este trabalho designa-se SON-PCR, *Single-Oligonucleotide Nested PCR*, descrito pela primeira vez por Antal et al. em 2004. Esta técnica é uma modificação da muito popular TAIL-PCR (*Thermal Assymetric Interlaced-PCR*), que por sua vez é uma aplicação de *Nested-PCR*.

Nested-PCR é uma técnica de PCR que se baseia na utilização de dois conjuntos de *primers*, em duas reações distintas e sucessivas de PCR, a fim de minimizar inespecificidades. A base teórica é que se houver amplificação inespecífica de vários fragmentos diferentes com o primeiro par de *primers*, o segundo par irá selecionar e amplificar especificamente a sequência de interesse de entre os amplificados com o primeiro par. O TAIL-PCR acrescenta uma terceira reação ao procedimento anterior, para ainda mais especificidade, mas combinando em cada reação um “*nested*” *primer* com um *primer* degenerado (*primer* inespecífico de sequência arbitrária). O TAIL-PCR é também caracterizado pelos “*supercycles*”, de ciclos de elevada e baixa estringência, isto é, com elevadas e baixas temperaturas de “*annealing*”. Os “*nested primers*” utilizados têm diferentes temperaturas de *annealing* e são usados em concentrações diferentes, para que durante os ciclos possam melhor amplificar o fragmento de interesse e minimizar inespecificidades. Os *primers* degenerados são utilizados para que se possa obter um bom número de cópias em cada reação, “ignorando” pequenas mutações que possam ter ocorrido durante o processo. No entanto, Antal et al. verificou que os *primers* degenerados estavam a ter um contributo mínimo para a sua reação de PCR, constatando que os “*nested primers*” tinham suportado por completo a amplificação. Assim, os *primers* degenerados podiam então ser omitidos por completo, e, por conseguinte, eliminar os “*supercycles*” associados, mantendo a especificidade da reação. Desenvolve-se então o SON-PCR, mantendo as três reações de PCR mas sem a utilização de *primers* degenerados. A ilustração abaixo, da autoria de Antal et. al, 2004 compara de forma concisa os dois métodos.

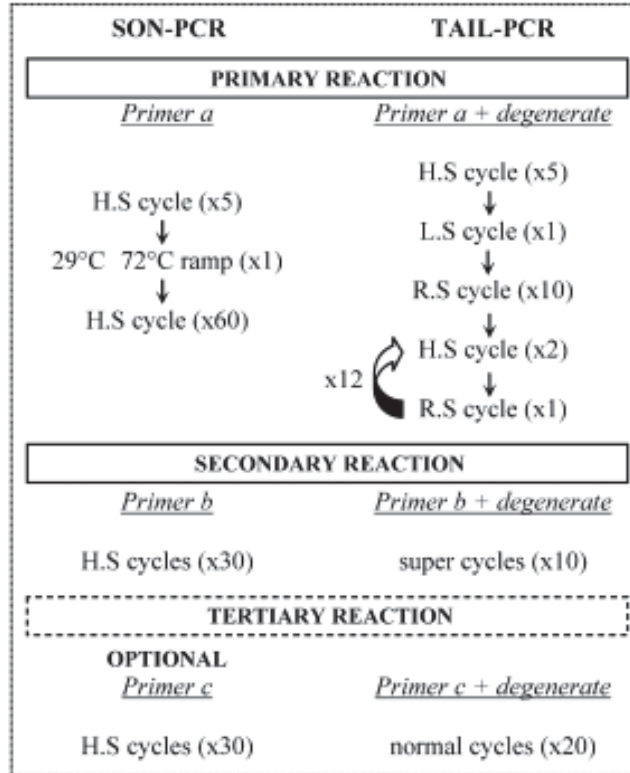


Figura 5: Esquema comparativo da reacção de TAIL-PCR e SON-PCR (Antal et al. 2004)

Objectivos

Este trabalho teve por objectivo o estudo de um isolado de *Bacillus thuringiensis* integrante do banco de entomopatógenos do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores, denominado L8D, onde se identificou a presença de uma sequência parcial de um gene com homologia com genes para Cry nematocidas (Raimundo, 2016). O estudo deste isolado passou por vários pontos:

- Obtenção dos cristais proteicos
- Solubilização, fraccionamento e caracterização parcial da proteína Cry
- Determinação da actividade nematocida do isolado L8D e da proteína Cry contra *C. elegans*
- Determinação da sequência genética codificante da proteína Cry por *chromosome walking*.
- Caracterização da proteína predita