



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PLASMÍDEOS NATURAIS DE *Chromobacterium violaceum*:  
ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE UM  
VETOR PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

**ANDRÉA FELIX LISTIK**

**MANAUS**

**2014**

**ANDRÉA FELIX LISTIK**

**PLASMÍDEOS NATURAIS DE *Chromobacterium violaceum*:  
ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE UM  
VETOR PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

Bióloga Msc. Andréa Felix Listik  
Orientador: Profº. Drº. Spartaco Astolf Filho

**Tese apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, da Universidade Federal  
do Amazonas, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Biotecnologia, Área de Concentração:  
“Biotecnologias para a Saúde”.**

**Manaus**

**2014**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L773p Listik, Andréa Felix  
PLASMÍDEOS NATURAIS DE *Chromobacterium violaceum*:  
ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE UM VETOR  
PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA / Andréa Felix Listik. 2014  
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Vetores de Clonagem. 3.  
Transformação Genética. 4. Plasmídeos Naturais. 5.  
Sequenciamento Molecular. I. Astolfi Filho, Spartaco II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

**ANDRÉA FELIX LISTIK**

**PLASMÍDEOS NATURAIS DE *Chromobacterium violaceum*:  
ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE UM  
VETOR PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA**

**Tese apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, da Universidade Federal  
do Amazonas, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Biotecnologia, Área de Concentração:  
“Biotecnologias para a Saúde”.**

**APROVADA em 24 de janeiro de 2014.**

- |                                              |                       |
|----------------------------------------------|-----------------------|
| <b>1. Prof.Dr. Spartaco Astolfi Filho</b>    | <b>UFAM</b>           |
| <b>2. Prof.Dr. Eduardo Rezende Honda</b>     | <b>CEPEM/LACEN/RO</b> |
| <b>3. Prof.Dr. Luís André Morais Mariuba</b> | <b>FIOCRUZ-AM</b>     |
| <b>4. Prof.Dr. Carlos Gustavo da Silva</b>   | <b>UFAM</b>           |
| <b>5. Prof.Dr. Adolfo José da Mota</b>       | <b>UFAM</b>           |

**Manaus  
2014**

Ao plano superior, meu Deus por me dar forças todos os dias da minha vida;

Ao Paulo Arthur pelo amor, carinho e compreensão durante a realização deste trabalho.

A minha mãe Elizete Silva e meu pai Sérgio Listik, que com muito amor, carinho, atenção e dedicação contribuíram decisivamente para minha formação pessoal e profissional;

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Spartaco Astolfi Filho, pela paciência, orientação e por ter contribuído de forma significativa para meu amadurecimento científico e pessoal;

Aos meus familiares, Izia Pinho, Arténir Pinho, Givaldo Pinho, Josenélia Guedes, Rose Mery Barreto que mesmo de longe me deram força;

Aos meus avós, Maria Felix e Benedito Paulo, *in memori*, que mesmo no céu ora por mim;

Aos professores, Edmar Vaz de Andrade, Sonia Carvalho, Odair Pereira, Carlos Gustavo, Andréa Belém, entre outros;

Aos meus sempre Mestres, Dr. Gaus de Andrade, Dra. Iraildes Assunção, Dra. Iracilda Lima;

Aos membros da banca de defesa, Eduardo Honda, André Mariuba, Carlos Gustavo e Adolfo Mota;

Aos meus amigos alagoanos, Raimunda Braz, Geraldo Lima, Juliana Sheila, Paula Braz, Alesson Braz, Carina dos Anjos, Ludmina Andrade, entre outros;

Aos meus amigos que conheci em Manaus, Cristiane Suely Melo de Carvalho, Francisca Holanda, Taciana Silva, Daniel Dultra, Bruna Protti, Erika Izumi, Patrick Souza, Carlos Victor Lamarão, Jefferson dos Santos, entre outros;

Aos meus amigos de laboratório, Edson do Carmo Junior, Jeane Cristina Ribeiro Lima, Rogério Oliveira Neves, Ernedina Assunção, Elza Quadros de Lima, Patrícia Barroso, Anita Solza, Lanna Lôbo, Hugo, Ivanete, entre outros;

As minhas queridas, Lucia Regina, Senna Seíça e Mara por além de serem amigas, deixam nosso ambiente de trabalho limpinho e cheiroso todos os dias;

Aos secretários que me aturaram, Nubiane Truycy, Roberto Lira, Josué Freitas, Paula Dias, Thayna Cavalcante, Saha, Gerbeson Adrião e Angela Neiva.

Aos alunos de Engenharia Genética de 2006 a 2010 e 2012;

A Universidade Federal do Amazonas, PPGBIOTEC, CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar) pela oportunidade de está realizando meu doutoramento.

A CAPES, CNPq, SUFRAMA, FAPEAM pelo apoio financeiro ao projeto e bolsa de doutorado.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Aspecto de <i>Chromobacterium violaceum</i> CVT2</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Micrografia de varredura de uma célula de <i>E. coli</i> rompida para liberação seu DNA genômico</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Modelo de particionamento do plasmídeo R1 durante o ciclo celular</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Mapa do plasmídeo de clonagem molecular pSC101</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Mapa do vetor de clonagem molecular pBR322</b>	<b>23</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Mapa do vetor de clonagem molecular pUC18</b>	<b>24</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Mapa físico do vetor pAC92</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Mecanismos de transferência horizontal de bactérias</b>	<b>27</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Foto de satélite da Região do Baixo Rio Negro</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Perfil dos plasmídeos naturais da amostra de <i>C. Violaceum</i></b>	<b>41</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.1</b>	<b>44</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.2</b>	<b>47</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Sequência da provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2</b>	<b>50</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.3</b>	<b>52</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Sequência da provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.3</b>	<b>53</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Esquema da construção do pCVK2</b>	<b>63</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade aos antibióticos em <i>C. violaceum</i> CVP1C3</b>	<b>68</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade ao antibiótico canamicina em <i>C. violaceum</i> CVT2 e CVP1C3</b>	<b>69</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade ao antibiótico estreptomicina em <i>C. violaceum</i> CVT2 e CVP1C3</b>	<b>69</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Mapa físico do plasmídeo pCVK2</b>	<b>70</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Fotografia mostrando os clones transformantes de <i>E. coli</i> cultivados na presença de canamicina</b>	<b>71</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Fotografia do DNA plasmidial, pCVK2, extraídos de <i>E. coli</i></b>	<b>72</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Perfil de restrição do plasmídeo pCVK2</b>	<b>73</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Fotografia os clones transformantes de <i>C. violaceum</i> P1C3</b>	<b>74</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Perfil do DNA plasmidial, pCVT2.2, extraídos de <i>C. violaceum</i></b>	<b>75</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Fotografia os clones transformantes de <i>C. violaceum</i></b>	<b>77</b>
<b>Figura 27</b>	<b>Fotografia do pCVK2, extraído de <i>C. violaceum</i> P1C3</b>	<b>77</b>

## TABELA

<b>Tabela 1</b>	<b>Nível de similaridade dos <i>contigs</i> com sequências de outros plasmídeos depositadas no <i>GenBank</i></b>	<b>42</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>Similaridade do plasmídeo pCVT2.1, com outras sequências depositadas no <i>GenBank</i></b>	<b>43</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>Apresenta a caracterização das ORFs do plasmídeo pCVT2.1, percentual de similaridade com as proteínas depositadas no <i>GenBank</i></b>	<b>45</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>Mostra os sítios únicos de restrição do pCVT2.1</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 5</b>	<b>Apresenta percentual de similaridade do plasmídeo pCVT2.2, com outras sequências depositadas no <i>GenBank</i></b>	<b>47</b>
<b>Tabela 6</b>	<b>Apresenta a caracterização das ORFs do plasmídeo pCVT2.2, percentual de similaridade com as proteínas depositadas no <i>GenBank</i></b>	<b>48</b>
<b>Tabela 7</b>	<b>Mostra os sítios de restrição no pCVT2.2</b>	<b>49</b>
<b>Tabela 8</b>	<b>Mostra os sítios únicos de restrição importantes no pCVT2.3</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 9</b>	<b>Perfil de resistência/sensibilidade das amostras CVT2 e CVP1C3 de <i>C. violaceum</i> coletadas no Rio Negro próximo a ponte Rio Negro</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 10</b>	<b>Resultado da clonagem, mostrando números de colônias de <i>C. violaceum</i> P1C3 transformadas por sistema de transformação</b>	<b>76</b>

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTO</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iii</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>iv</b>
<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>15</b>
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<b>15</b>
<b>O potencial biotecnológico de <i>C. violaceum</i></b>	<b>16</b>
<b>1.1.2. O Genoma de <i>C. violaceum</i></b>	<b>17</b>
<b>1.2. Plasmídeos Bacterianos Naturais</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Vetores de clonagem molecular para <i>Escherichia coli</i></b>	<b>21</b>
<b>1.4. Transformação genética em bactérias</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II - Isolamento e sequenciamento de plasmídeos Naturais de <i>Chromobacterium violaceum</i> isoladas no Rio Negro-Manaus, AM.</b>	<b>35</b>
<b>RESUMO</b>	<b>35</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>37</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>1.1. MATERIAL</b>	<b>38</b>
<b>1.1.1. Linhagens celulares</b>	<b>38</b>
<b>1.1.2. Condições de cultivo da amostra <i>C. violaceum</i> CVT2</b>	<b>39</b>
<b>1.2. MÉTODOS</b>	<b>39</b>

1.2.1. Extração de DNA dos plasmídeos	39
1.2.1.1. Quantificação de DNA	39
1.2.2. Sequenciamento da amostra plasmidial	39
1.2.2.1. Análise e anotação das sequências	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
2.1. Extração da amostra plasmidial	41
2.2. Sequenciamento e análise “ <i>in silico</i> ” do DNA plasmidial da amostra <i>C. violaceum</i> CVT2	42
2.2.1. Anotação das sequências dos plasmídeos naturais de <i>C. violaceum</i> CVT2	43
2.2.1.1. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.1	43
2.2.1.2. Representação esquemática do pCVT2.1	44
2.2.1.2.1. Análise das ORFs do pCVT2.1	44
2.2.1.3. Análise dos sítios de restrição do pCVT2.1	45
2.2.2. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.2	46
2.2.2.1. Representação esquemática do pCVT2.2	47
2.2.2.2. Análise das ORFs do pCVT2.2	48
2.2.2.3 Sítios únicos de restrição do pCVT2.2	49
2.2.2.4. Origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2	49
2.2.3. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.3	51
2.2.3.1. Representação esquemática do pCVT2.3	51
2.2.3.2. Análise da ORF do pCVT2.3	52
2.2.3.3. Origem de replicação (ORI) do plasmídeo pCVT2.3	52
<b>CONCLUSÕES</b>	54
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	55
<b>CAPÍTULO III Construção de um vetor para transformação genética de <i>Chromobacterium violaceum</i></b>	58

<b>RESUMO</b>	<b>58</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>60</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
<b>1.1. MATERIAL</b>	<b>61</b>
<b>1.1.1. Linhagens celulares</b>	<b>61</b>
<b>1.1.2. Plasmídeos</b>	<b>61</b>
<b>1.2. MÉTODOS</b>	<b>62</b>
<b>1.2.1. Antibiograma das amostras <i>C. violaceum</i></b>	<b>62</b>
<b>1.2.2. Construção de um vetor para transformação genética</b>	<b>62</b>
<b>1.2.2.1. Extração do DNA plasmidial</b>	<b>64</b>
<b>1.2.2.1.1. Quantificação de DNA</b>	<b>64</b>
<b>1.2.2.2. Isolamento do gene de resistência a canamicina e do plasmídeo pCVT2.2</b>	<b>64</b>
<b>1.2.2.3. Ligação do gene Canamicina no plasmídeo pCVT2.2</b>	<b>65</b>
<b>1.2.3. Transformação genética de <i>C. violaceum</i></b>	<b>65</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Seleção do marcador genético</b>	<b>67</b>
<b>2.2. Construção do vetor de clonagem molecular pCVK2 a partir de um plasmídeo natural de <i>C. violaceum</i></b>	<b>70</b>
<b>2.2.1. Transformação genética de <i>Escherichia coli</i> com o plasmídeo pCVK2</b>	<b>71</b>
<b>2.3. Transformação genética de <i>C. violaceum</i> CVP1C3</b>	<b>73</b>
<b>2.3.1. Transformação genética com o plasmídeo pCVT2.2 para resistência a estreptomicina</b>	<b>73</b>
<b>2.3.2. Transformação genética de <i>C. violaceum</i> com o plasmídeo pCVK2 para resistência a canamicina</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>83</b>

<b>ANEXO A: Materiais utilizados</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 1: Composição do meio para cultivo de bactérias</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 2: Lista das endonucleases de restrição</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 3: Marcador padrão de peso e tamanho molecular</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 4: Kits comerciais</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 5: Soluções de uso geral</b>	<b>83</b>
<b>Anexo A. 6: Composição do gel de agarose</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO B: Protocolos</b>	<b>84</b>
<b>Anexo B. 1: Protocolo de extração plasmidial por lise alcalina</b>	<b>84</b>
<b>Anexo B. 2 Preparação de gel de Agarose para análise de DNA</b>	<b>85</b>
<b>Anexo B. 3. Protocolo de pirosequenciamento</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>88</b>

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A busca de metabólitos secundários para diversos processos biotecnológicos, assim como, os microrganismos que desempenham esse importante papel como produtores desses metabólitos, vêm sendo cada vez mais utilizados para a produção de produtos naturais. Hoje 60% dos fármacos são provenientes direta ou indiretamente de produtos naturais (MENEZES, 2009).

A *Chromobacterium violaceum*,  $\beta$  - proteobactéria Gram- negativa descrita pela primeira vez no final do século 19 (BOISBAUDRAN, 1882), está presente em ecossistemas das regiões tropicais e subtropicais. Na região Norte do Brasil, esta bactéria tem sido encontrada com alta frequência nas águas e margens do Rio Negro, um dos principais componentes da bacia Amazônia brasileira (CALDAS, 1990) e, como resultado tem sido estudado no Brasil ao longo das últimas quatro décadas (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Estudos relacionados à *C. violaceum* eram baseados no conhecimento de uma pequena fração da constituição genética do organismo. Além disso, as questões mais básicas dos mecanismos à capacidade de adaptação de *C. violaceum* não tinham sido profundamente investigadas nos níveis genéticos e moleculares (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Para ter o conhecimento mais profundo deste microrganismo, o genoma completo da amostra *C. violaceum* ATCC 12472 foi sequenciado e anotado. Isto revelou a complexidade molecular necessária para sua versatilidade, bem como, importantes informações a respeito do seu grande potencial para aplicações em processos biotecnológicos e farmacêuticos (ANDRIGHETTI-FROHNER, *et al.*, 2003).

Uma das dificuldades encontradas nos trabalhos com *C. violaceum* é a falta de vetores moleculares de transformação genética específicos para essa espécie bacteriana, já que os vetores mais eficientes utilizados para *E. coli* se mostram não funcionais para *C. violaceum*.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Em vista desta problemática e visando facilitar os processos de clonagem molecular em *C. violaceum*, neste trabalho propõe-se isolar plasmídeos naturais de *C. violaceum* proveniente das águas do Rio Negro, Manaus-AM, sequenciar e analisar “in sílico” as sequências obtidas identificando os sítios de restrição, as ORFs e ORIs (origem de replicação) e a partir daí, construir um vetor de clonagem molecular homólogo para *C. violaceum* para transformação genética dessa espécie bacteriana.

Esta tese está dividida em três capítulos, no primeiro capítulo está apresentado o referencial teórico relacionado ao microrganismo em questão, sobre os plasmídeos naturais de bactérias, vetores de clonagem molecular e por último, transformação genética de bactérias.

O segundo capítulo apresenta a fase inicial do trabalho que mostra o isolamento, sequenciamento e caracterização parcial de plasmídeos naturais de *C. violaceum*.

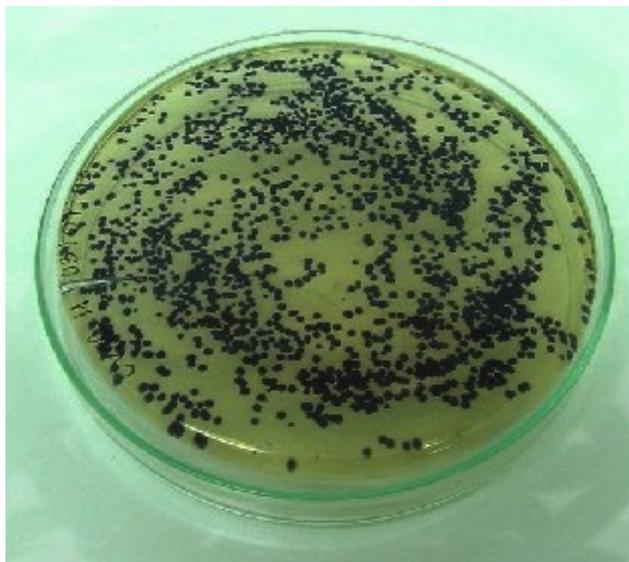
O terceiro capítulo se refere à construção de um vetor para transformação genética de *C. violaceum*.

## CAPÍTULO I

### REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.1. *Chromobacterium violaceum*

A bactéria *Chromobacterium violaceum* (**Figura 1**) é classificada como uma  $\beta$ -proteobactéria, família Neisseriaceae (BOONE E CASTENHOLZ, 2001), sendo classificada como um microrganismo de vida livre, saprófito, geralmente não patogênico, Gram negativa, anaeróbica facultativa, com formato de bastonete (GARRITY, WINTERS e SEALES, 2001).



**Figura 1** Aspecto de *Chromobacterium violaceum* CVT2 cultivada *in vitro*, em placa contendo meio LB sólido. A cor violeta característica deve-se à produção do pigmento violaceína.

A *C. violaceum* é uma entre milhões de espécies de microrganismos de vida livre apresentando distribuição em ambientes de ecossistemas tropicais e subtropicais, podendo

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

ser encontrado em amostras de solo e água ao redor do mundo (BOONE e CASTENHOLZ, 2001), dando prioridade a locais com poucos nutrientes, altas temperaturas e com alto índice de acidez (HUNGRIA *et al.*2004).

A presença de *C. violaceum* no Brasil foi relatada pela primeira vez em amostras de águas da estação de tratamento da cidade de Manaus para análise bacteriológica, e o resultado indicou a presença de colônias bacterianas brancas e violetas (CALDAS *et al.*, 1978). As colônias violetas foram identificadas pelo professor Wilson Chagas de Araújo como sendo *Chromobacterium violaceum* (CALDAS *et al.*,1978). Posteriormente foi verificado que, a *C. violaceum* é abundantemente encontrada nas águas pretas e nos bancos de areia do Rio Negro (CALDAS *et al.*, 1978; DIAS *et al.*,2002).

### **1.1.1. O potencial biotecnológico de *C. violaceum***

A *C. violaceum* sendo uma bactéria versátil é responsável pela produção de uma grande diversidade de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico. Esta bactéria tem sido objeto de estudos devido principalmente à sua característica fenotípica, o pigmento violeta denominado violaceína (ANTÔNIO, 1994; PITLOVANCIU, 2005). A violaceína possui atividade antibacteriana para as espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* onde foi verificado um efeito inibitório no crescimento celular dessas espécies (DURAN & MENCK, 2001) e também nas atividades: antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp., antiviral contra vírus hepáticos e poliovírus, antitumoral contra leucemia, tumores de pulmão e cólon (ANDRIGHETTI-FROHNER, *et al.*, 2003) e antifúngica com propriedade terapêutica na área dermatológica (ANTÔNIO, 1994).

Além da produção de violaceína, a *C. violaceum* tem capacidade de sintetizar homopolímero 3-hidroxivalerato (polihidroxivalerato ou PHV), bem como outros tipos de polihidroxialcanoatos (PHA'S), polímeros orgânicos com características físico-químicas semelhantes ao polietileno e polipropileno. Esses compostos são de interesse industrial e ambiental já que a partir destes é possível produzir plásticos biodegradáveis (DURAN E MENCK, 2001; VASCONCELOS *et al.*,2003).

Essa espécie bacteriana produz também um conjunto de enzimas de interesse biotecnológico, como: fosfatases, RNAses, exonucleases dentre outros (VASCONCELOS, 2003).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### 1.1.2. O Genoma de *C. violaceum*

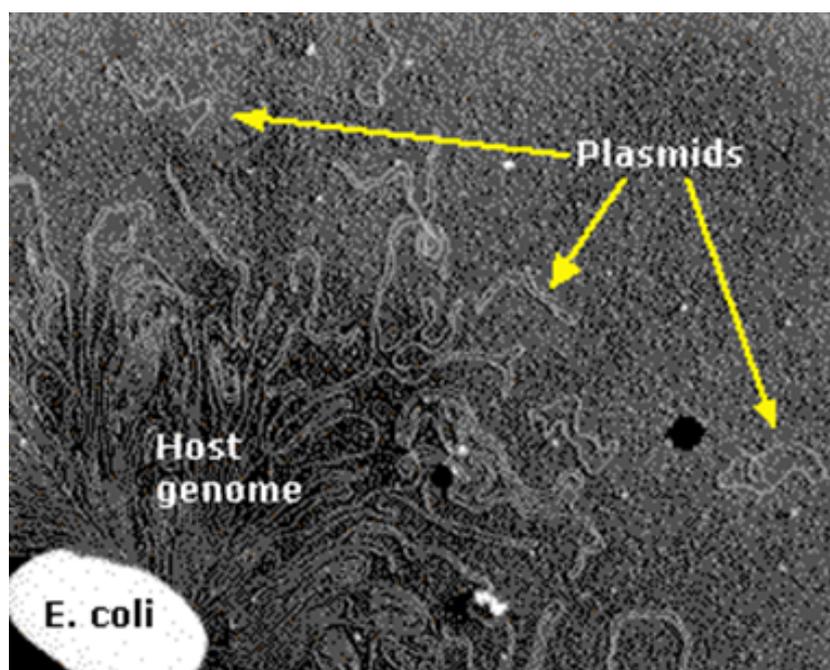
Devido ao grande potencial biotecnológico a *C. violaceum* teve seu genoma sequenciado pela Rede Nacional de Sequenciamento Nucleotídico (Projeto Genoma Brasileiro-CNPq).

Na época que ocorreu a anotação do genoma da *C. violaceum* foi possível identificar 4.431 ORFs, que correspondem a cerca de 89% do seu genoma (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Grande parte destas ORFs identificadas se apresentam relacionadas com a habilidade da *C. violaceum* em interagir e responder ao ambiente, o que garante a adaptabilidade e versatilidade a esta bactéria (VASCONCELOS *et al.*, 2003). No entanto, como em genomas de outros microrganismos, aproximadamente 40% das ORFs encontradas em *C. violaceum* foram classificadas como hipotéticas, pois não apresentaram homologia com sequências de genes conhecidos, ou seja, as funções bioquímicas e funções biológicas de 40% do patrimônio genético desta espécie ainda permanecem desconhecidas (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Estudos adicionais com as ORFs anotadas como hipotéticas são importantes, pois podem resultar na descoberta de novos genes e até mesmo de novas vias metabólicas e assim, desenvolver métodos para prospecção destes novos genes funcionais com supostos potenciais biotecnológicos.

## 1.2. Plasmídeos Bacterianos Naturais

Os plasmídeos (**Figura 2**) são moléculas de DNA extracromossômicos em sua maioria circulares, com a replicação autônoma utilizando uma sequência de DNA, origem de replicação ou *ori*, que serve como um ponto inicial para a replicação de DNA, e perpetuar em linhagens separadas das do cromossoma (GONÇALVES, *et al.*, 2004), possuindo como função evolutiva a transferência horizontal e/ou vertical de genes entre bactérias (FROST *et al.*, 2005).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 2** Micrografia de varredura de uma célula de *E. coli* rompida para liberação seu DNA genômico. O entrelaçamento corresponde à porção da molécula de DNA genômico de cadeia simples contendo mais de 4,6 milhões de pares de bases. As pequenas moléculas circulares são os plasmídeos. Fonte: Huntington Potter and David Dressler, ano

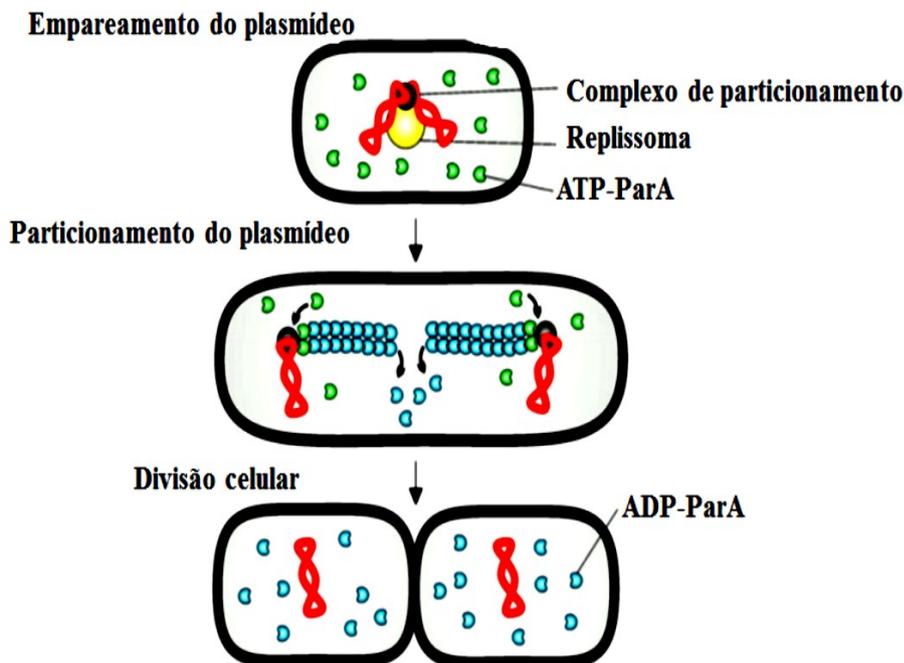
Os plasmídeos constituem-se de regiões constantes que contém os genes responsáveis por funções essenciais para sua manutenção, tais como a iniciação e controle da replicação. Alguns contêm genes que garantem a herança estável, como sistema de partição durante a divisão celular ou a transferência conjugal (COUTURIER *et al.*, 1988). Entretanto, possuem regiões variáveis onde se localizam os genes responsáveis por funções adaptativas e que conferem benefícios a seus hospedeiros, podendo ser desde resistência a agentes antimicrobianos, até a capacidade de metabolizar e obter energia de substratos que não podiam ser degradados a partir dos sistemas enzimáticos codificados pelo DNA genômico da bactéria (POGLIANO, 2002). Desta forma, permite que o hospedeiro se adapte às condições do meio ambiente no qual ele esteja inserido, garantindo assim o seu sucesso evolutivo frente a outros microrganismos (VALE, 2004).

A classificação dos plasmídeos pode ser realizada baseando-se em diferentes critérios: modo de replicação, número de cópias na célula, tamanho do plasmídeo, grupo de incompatibilidade e capacidade de transferências entre células (NOVICK, 1967).

Para que a replicação de um plasmídeo circular ocorra, geralmente, é necessária uma proteína Rep específica, codificada pelo plasmídeo, por exemplo, no plasmídeo R1 essa proteína é denominada de RepA. A região mínima necessária para a replicação

dependente da RepA (oriR) está contida numa zona de DNA geralmente com 188pb e é composta por (i) um domínio que se liga a DnaA de 9-pb, (ii) uma zona contígua de 100pb onde a RepA interage e (iii) uma zona adjacente rica em A-T onde ocorre a desnaturação do DNA dupla fita para iniciar a processo de replicação (Del SOLAR *et al.*, 1998).

O número de cópias é uma característica quantitativa dos plasmídeos, mas varia dependendo do hospedeiro e condições de crescimento (CUEVA-MÉNDEZ & PIMENTEL, 2007). Alguns plasmídeos para serem mantidos de forma estável na bactéria hospedeira, necessitam possuir um sistema de partição (Par) que segrega cópias do plasmídeo para a célula filha durante a replicação/conjugação, isso fornece herança estável deste plasmídeo na célula hospedeira (ZECHENER, 2000). Este sistema requer normalmente 1 (um) gene *trans-acting* (ParA) e 1 (um) elemento *cis-acting* (ParC). A proteína ParA se liga ao sítio ParC puxando o plasmídeo para os pólos opostos da célula (EBERSBACH & GERDES, 2005). O gene ParC desempenha um papel importante para o plasmídeo que é equivalente ao centrômero em uma célula eucariótica (GORDON, 1997) (Figura 3).



**Figura 3 Modelo de particionamento do plasmídeo R1 durante o ciclo celular.** Os plasmídeos (vermelha) são replicados pela maquinaria de replicação da célula hospedeira (amarelo), que está localizado no meio da célula (Lemon & Grossman, 1998; Koppes *et al.*, 1999). A região parC do plasmídeo está emparelhado através de interações com a proteína ParA (cinza), formando assim um complexo de particionamento. Fonte: Jan Löwe and Kenn Gerdes, 2002.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Quanto à característica de transferência, os plasmídeos pertencem a dois grupos, os plasmídeos conjugativos ou não conjugativos, dependendo se transporta ou não uma origem de transferência, *oriT* junto com um conjunto de elementos utilizados na transferência de genes que permitem sua propagação em diferentes hospedeiros (OLD & PRIMROSE, 1981).

Geralmente os plasmídeos conjugativos são de alta massa molecular e estão presentes de uma a três cópias por célula hospedeira o que assegura a estabilidade de um plasmídeo F, enquanto os plasmídeos não conjugativos são menores e têm normalmente um elevado número de cópias, o que assegura a permanência de pelo menos uma cópia persista na célula após a sua divisão celular (DALE, 1994).

Alguns plasmídeos podem ser incompatíveis entre eles, impedindo a coexistência de tipos diferentes num mesmo hospedeiro. Os plasmídeos que são incompatíveis pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc). Por exemplo, já se identificaram mais de 30 grupos de incompatibilidade em *Escherichia coli* e 13 em *Staphylococcus aureus* (COUTURIER *et al.*, 1988; PRIMROSE *et al.*, 2004). Os plasmídeos dizem-se incompatíveis quando partilham o mesmo mecanismo de replicação.

De acordo com sua função na célula hospedeira, os plasmídeos podem pertencer a mais de um grupo funcional sendo classificados em cinco grupos principais:

- Plasmídeos de fertilidade (plasmídeos F) - que carregam apenas genes *tra* que tem a capacidade de promover a transferência plasmidial conjugativa;
- Plasmídeos de resistência (plasmídeos R) - que contêm genes que conferem resistência a antibióticos;
- Plasmídeos *Col* - que contêm genes que codificam colicinas, proteínas que podem matar outras bactérias;
- Plasmídeos de degradação - que permitem a bactéria metabolizar substâncias pouco habituais, como, por exemplo, tolueno ou ácido salicílico;
- Plasmídeos de virulência - que conferem a patogenicidade bacteriana.

Os plasmídeos ocorrem naturalmente em quase todas as espécies bacterianas, tanto em Gram positivas como Gram negativas, (AMABILE-CUEVAS e CHICUREL, 1992).

Nos últimos anos, a descoberta destas moléculas extracromossomais em bactérias pouco conhecidas aumentou ainda mais o interesse nessas estruturas, principalmente pelo fato de que, através do perfil plasmidial é possível caracterizar estes isolados bacterianos,

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

assim como associar características fenotípicas de interesse com a informação genética contida nesses DNAs extracromossomais (ARAÚJO, 1996).

Plasmídeos crípticos, ou seja, cuja função na célula hospedeira não é conhecida, foram isolados de diferentes espécies bacterianas e tiveram suas sequências determinadas no sentido de servirem de vetores homólogos para suas respectivas hospedeiras, alguns exemplos são: o plasmídeo críptico pFW213 detectados em amostras de *Streptococcus parasanguinis* que possui número de cópia de 5-10 por célula (CHEN *et al.*, 2011), o plasmídeo críptico em *Serratia marcescens* com a origem de replicação homóloga a dos plasmídeos CoEI (IBRAIM *et al.*, 2009), o plasmídeo críptico, pSFKW33 em *Shewanella*, (HUBERT CIES'LIN' SKI *et. al.*, 2009), o plasmídeo críptico, pSM429 em *Pseudoalteromonas* sp. (DIAN-LI ZHAO *et al.*, 2011), entre outros.

Embora plasmídeos nativos não tivessem sido ainda identificados em *C. violaceum*, em um estudo desenvolvido no Laboratório de Tecnologias de DNA da Universidade Federal do Amazonas por DO VALE, R. (2005), foram identificados em 22 amostras a presença de moléculas de DNA extracromossomal de um total de 53 isolados bacterianos classificados como *C. violaceum*.

### **1.3. Vetores de clonagem molecular para *Escherichia coli***

Os plasmídeos são elementos de grande importância para a recombinação e, portanto na evolução bacteriana (CUEVAS & CHICUREL, 1992). No desenvolvimento da engenharia genética, os plasmídeos bacterianos receberam atenção para sua utilização como vetores moleculares. Pesquisadores desenvolveram moléculas químicas, chamadas de vetores de clonagem molecular que são utilizados como instrumentos biotecnológicos específicos e indispensáveis e, desta forma conseguiram desenvolver metodologia de recombinação genética entre bactérias que naturalmente não são capazes de realizá-la.

Pode-se definir um vetor de clonagem molecular como, molécula de DNA que facilita a introdução e manutenção de um material genético exógeno no interior de uma célula hospedeira. Eles são moléculas de DNA com características conhecidas e direcionadas para determinados usos, como isolamento e propagação de sequências de

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

interesse e produção de material genético para mapeamento, sequenciamento e mutagênese.

Um vetor de clonagem molecular normalmente além de possuírem a origem de replicação específica para a hospedeira, tem dois marcadores genéticos:

- um deles normalmente é um gene de resistência a antibiótico e seu papel é permitir, durante o processo de transformação genética, selecionar as células hospedeiras que receberam plasmídeos e,
- o outro marcador genético, contém o (s) sítio (s) de clonagem em seu interior e contém um gene cujo produto pode ser detectado facilmente, como, por exemplo,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase ou “*Green Fluorescent Protein - GFP*”. Caso uma mensagem genética seja inserida no interior do gene marcador genético ele é inativado e não expressa a proteína de fácil detecção.

O primeiro plasmídeo utilizado como vetor de clonagem molecular, ainda no início do desenvolvimento da TDR (Tecnologia do DNA Recombinante), foi o vetor pSC101 (9.263pb) derivado do plasmídeo natural RSF1010 da *E. coli* W1485 (COHEN *et al.*, 1973). O vetor pSC101 (**Figura 4**) contém apenas um marcador genético de seleção (gene de resistência à tetraciclina).

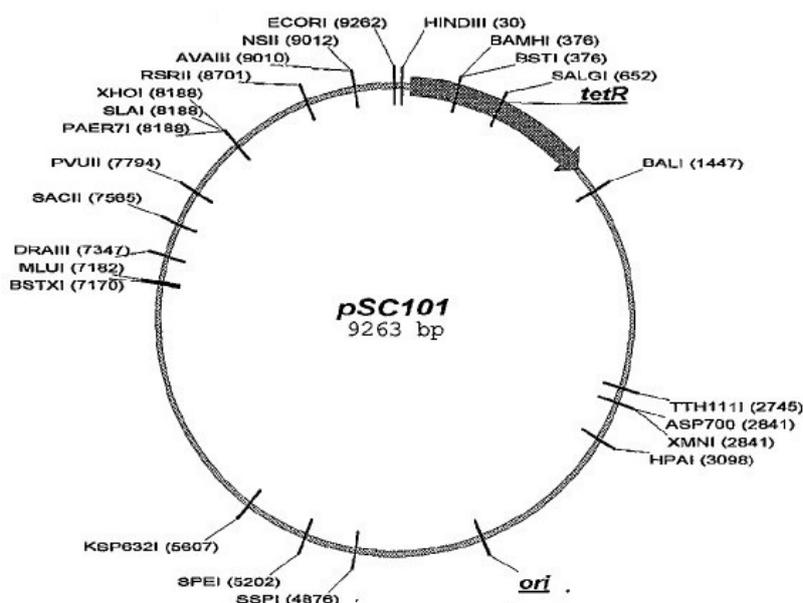
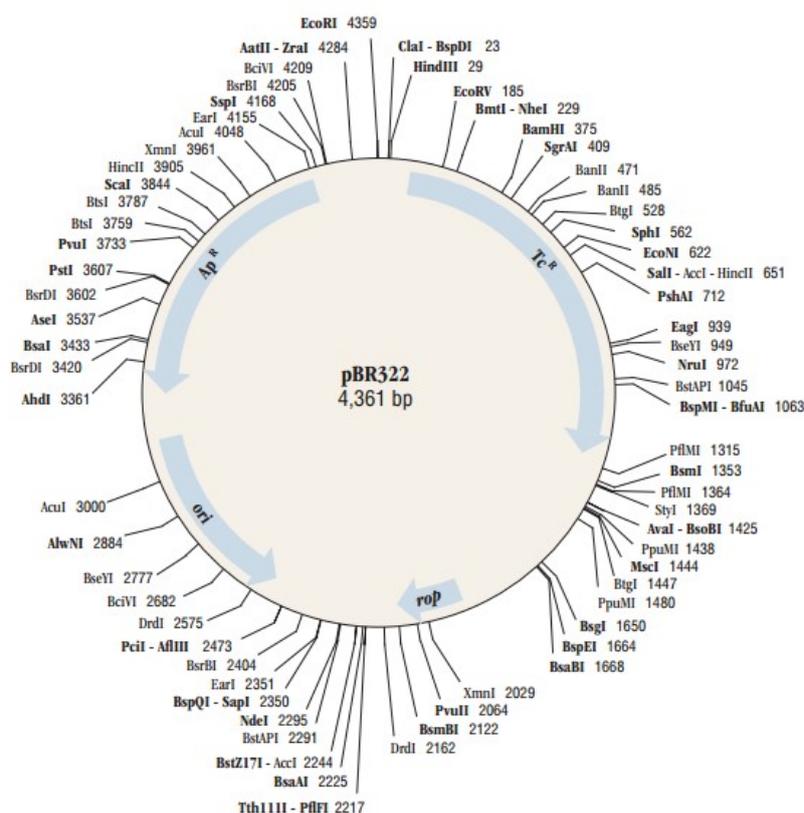


Figura 4 Mapa do plasmídeo de clonagem molecular pSC101. Fonte: Biogene®.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Depois foi desenvolvido o vetores pBR322 de 4.362 pares de bases (**Figura 5**), desenvolvido por Bolívar *et al.* (1977) a partir do plasmídeo natural de resistência a antibiótico pMB1 (CoEI) oriundo de *Escherichia coli*. Este vetor possui cerca de 15-20 cópias presentes em uma célula de *E. coli*, mas esse número pode ser aumentado, para até 1000 a 3000, pela amplificação do plasmídeo na presença de um inibidor da síntese proteica, tal como cloranfenicol (BROWN, 2003). Esse plasmídeo foi o mais importante vetor de clonagem molecular de genes desde a sua construção até o desenvolvimento dos plasmídeos de seleção direta pUCs.



**Figura 5** Mapa do vetor de clonagem molecular pBR322. Fonte: New England Biolabs®.

Em 1982 foi desenvolvido por Vieira e Messing a partir da estrutura molecular do vetor pBR322, vetores da série pUC. Estes vetores são de seleção direta, que apresentam um gene indicador (repórter), que codifica uma característica de fácil detecção (no caso a

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

$\beta$ -galactosidase) e que possui sítios múltiplos de clonagem nesse gene, permitindo discriminar os hospedeiros que receberam o plasmídeo contendo o gene funcional (VIEIRA & MESSING, 1982).

Os pUC18 e pUC19 são vetores de *E. coli* de pequeno tamanho, com 2.686 pares de bases, multicópia, 500 a 700 cópias por célula, dentro da hospedeira devido a uma simples mutação pontual no gene *Rep* (gene de origem de replicação) (**Figura 6**). Esses vetores são idênticos, com exceção do sítio múltiplo de clonagem (MCS) que está presente nos dois vetores, mas com a orientação oposta. Os plasmídeos pUC18 e 19 contém: origem de replicação *rep* do plasmídeo pMB1; gene *bla*, codificando para beta-lactamase que confere resistência a ampicilina do plasmídeo pBR322. Além disso, contém o gene *LacZa* do operon *lac*, este é uma mutação do gene *LacZ* de *Escherichia coli*, que codifica a beta-galactosidase (VIEIRA & MESSING, 1982).

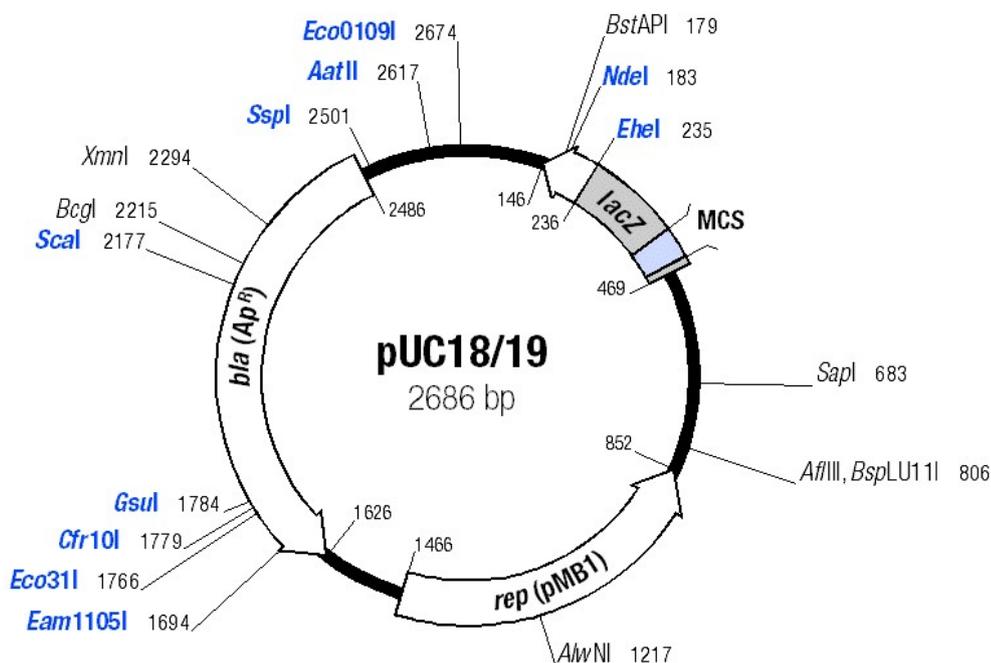


Figura 6 Mapa do vetor de clonagem molecular pUC18. Fonte: Fermentas®.

Inúmeros vetores foram construídos para uso em diferentes aspectos da biologia molecular, exercendo funções variadas. Dentre estes vetores podem-se citar vetores de seleção direta de clones recombinantes, de múltiplos sítios de clonagem, bifuncionais, de

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

seleção de promotores, de seleção de sinais de terminação de transcrição, seleção de origem de replicação, de expressão e de expressão e secreção (BALBÁS, 1986).

Dentre os vetores de seleção direta encontramos o plasmídeo pAC92 (**Figura 7**) que é um vetor também chamado de vetor suicida (efeito kamikaze), que permite a seleção positiva dos clones recombinantes. Este vetor contém um sítio múltiplo de clonagem, confere resistência a ampicilina e também permite um alto número de cópias. Esse plasmídeo transporta o gene alfa amilase de *Bacillus subtilis* como gene repórter. O pAC92 confere às células de *E. coli* transformantes um fenótipo amilolítico facilmente detectado por coloração com vapor de iodo. Os clones recombinantes são identificados pela inativação intencional do gene de  $\alpha$ -amilase, ou seja, não apresenta atividade amilolítica e, quando não ocorre clonagem do inserto há aumento na expressão da amilase na ausência de glicose causando morte nos clones não recombinantes (BARROS *et al.*, 1995).

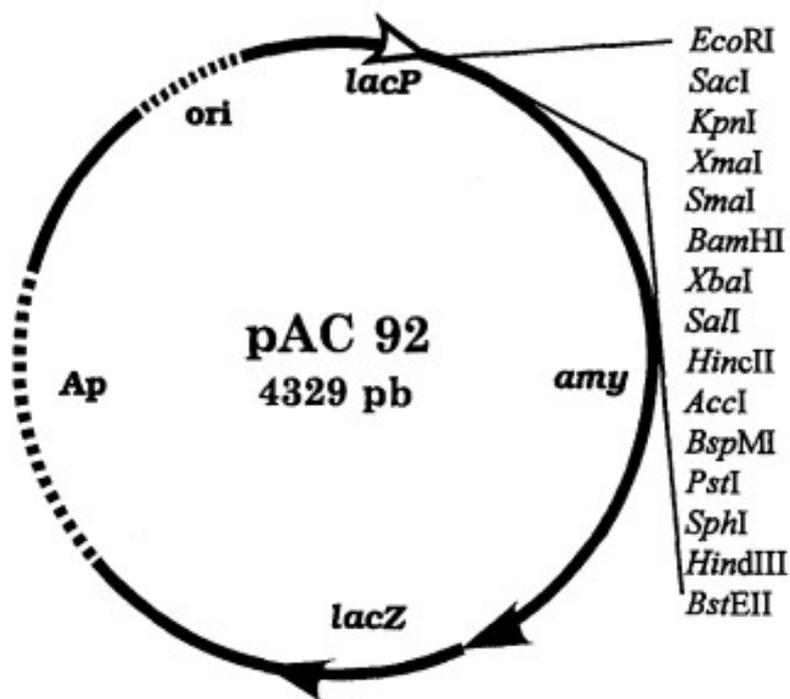


Figura 7 Mapa físico do vetor pAC92. Fonte: Barros, 1995.

#### 1.4. Transformação genética em bactérias

A transferência horizontal de genes é um mecanismo essencial na evolução dos procariotos (DAUBIN *et al.*, 2003). Um exemplo disso é a rápida disseminação da resistência aos antibióticos na população bacteriana (FUNNELL E PHILLIPS, 2004).

Existem três formas para que ocorra a transferência do material genético entre as bactérias: transdução, conjugação e transformação. Na transdução o processo envolve a transferência de DNA de uma célula para outra por um vírus. Já no processo de conjugação a célula doadora envia uma cadeia de DNA para outra bactéria que chamamos de receptora. Esta transferência é efetuada por contato célula-célula, diretamente ou através de uma ponte (píllus) entre as duas células bacterianas (AZEVEDO, 2008) (Figura 9).

A transformação genética (**Figura 8**) é um processo pelo qual uma bactéria receptora recebe um DNA exógeno livre podendo mantê-lo na forma extra-cromossomal (plasmidial) e intra-cromossomal (integrativo) como resultado de recombinação genética (AZEVEDO, 2008). Esse processo se dá quando o DNA que é liberado de células doadoras encontra receptores na superfície celular da receptora e depois é internalizado. Este efeito foi demonstrado primeiramente por Griffith quando conseguiu transformar uma cepa de *Streptococcus pneumoniae* atenuada e não encapsulada em uma cepa, agora virulenta e com capacidade de encapsulamento (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

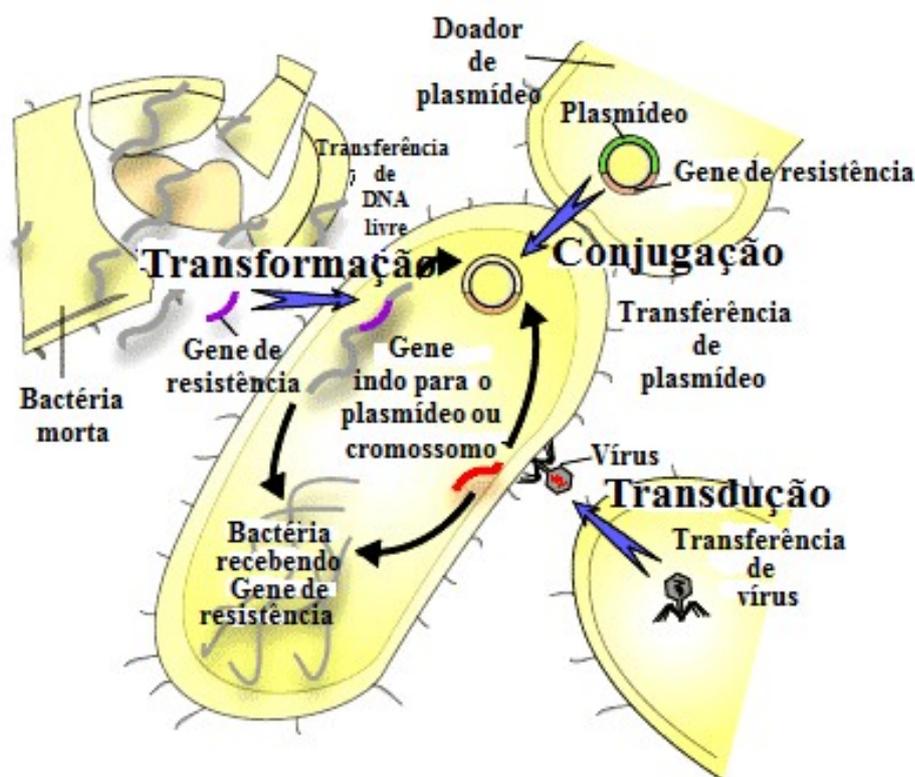


Figura 8 Esquema mostrando os mecanismos de transferência horizontal de bactérias. Fonte: Kenneth Todar, 2011.

A ocorrência de transformação foi posteriormente confirmada por outros pesquisadores o que possibilitou um entendimento sobre a transformação genética. Em uma delas, Oswald T. Avery, Collin M. MacLeod e Maclyn McCarthy demonstraram, em 1944, que o agente responsável pela transformação era o DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

A transformação genética é bem estudada em bactérias Gram positivas como é o caso da bactéria *Bacillus subtilis*. O DNA exógeno tem mais facilidade de penetrar nas Gram positivas pelo fato delas possuírem somente camada de peptidoglicanos na sua parede celular. No entanto, a ocorrência da competência natural tem sido descrita, em alguns casos, em bactérias Gram negativas, por exemplo, *Haemophilus influenzae* (VANWAGONER *et al.* 2004) e *Streptococcus pneumoniae* (BÄTTIG E MÜLEMANN, 2008). Contudo, algumas espécies de bactérias não demonstram uma habilidade natural (competência) para adquirir o material genético exógeno o que levou o desenvolvimento na busca de métodos para induzir competência artificial e com isso explorar a introdução de

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

DNA exógeno em bactérias que é de grande importância prática em engenharia genética e para biologia molecular (YOSHIDA & SATO, 2009).

A introdução de um DNA exógeno em *E. coli* foi demonstrado pela primeira vez por Mandel e Higa (1970), que observou que durante a incubação de uma suspensão de células de *E. coli* K12 e o DNA do bacteriófago  $\lambda$  (lambda) numa solução de cloreto de cálcio a 0°C resultava na transformação celular. Eles também mostraram que quando a mistura de células hospedeiras e DNA exógeno eram expostas ao choque térmico, calor de 42°C, numa breve incubação e, resfriada em gelo melhorou a frequência da transformação (MANDEL & HIGA, 1970).

Melhores métodos de transformação atualmente disponíveis resultaram de uma série de tentativas para atingir máxima eficiência de transformação (HANAHAN 1983, HUFF *et al.* 1990).

A aplicação de campo elétrico para fusão celular foi apresentado pela primeira vez por Zimmermann *et al.* (1980). Usando campos elétricos para a introdução de genes de células biológicas, Wong e Neumann (1982), demonstraram pela primeira vez que impulsos elétricos na intensidade gama de 5-10 kV/cm, com um duração de 5-10 ms, foram suficientes para aumentar a absorção do DNA em células de rato (NEUMANN *et al.* 1982). Esta técnica foi denominada de eletroporação.

A transformação de *E. coli* com DNA de plasmídeo por eletroporação foi primeiramente descrita por Fiedler e Wirth (1988) utilizando o plasmídeo pBR322. Eles demonstraram que quando células de *E. coli* quando cultivadas até a fase log em meio LB, lavadas uma vez com tampão de transformação ( 300 mM de sacarose , fosfato de sódio 7 mM, pH 7,4, e MgCl<sub>2</sub> 1 mM ), e ressuspendidas no mesmo tampão se tornavam competentes para a transformação genética. Sob estas condições, a *E. coli* foi transformada a uma taxa de  $1 \times 10^5$  transformantes por micrograma pBR322 DNA. Para melhorar a eficiência da transformação, Dower *et al.* (1988 ) desenvolveram um protocolo otimizado para a eletroporação de *E. coli*, obtendo uma eficiência de  $1 \times 10^8$  transformantes por micrograma. Eles transformaram várias estirpes de *E. coli* para uma eficiência de transformantes de forma consistente utilizando plasmídeos pBR e pUC sujeitando suspensões concentradas de células e DNA a campos elétricos de alta amplitude (12,5 kV / cm , com uma constante de 4,5 a 5,0 ms de tempo) (ANTONOV *et al.* 1993, SHENG *et al.*,1995, YOSHIDA *et al.*,2009).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Uma vez que já foi estabelecido o sistema de clonagem de gene em *Escherichia coli* (COHEN *et al.* 1972), vários estudos estão sendo realizados visando novos possíveis hospedeiros para moléculas homologas de DNA recombinante. Hoje, são centenas de espécies bacterianas que já foram submetidas à eletroporação (AZEVEDO, 2008).

A amostra de *C. violaceum*, objeto de nosso estudo, não mostra ser naturalmente transformável. Entretanto, BROETTO *et al.*, 2006 desenvolveram um sistema de transformação pelo método de eletroporação para *C. violaceum* utilizando o vetor bifuncional pPZP201BK de *E. coli* com marca genética canamicina. Neste estudo, a tecnologia possibilitou a eficiência de  $10^5$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. 2003. Citotoxicity and potencial antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98(6): 843–848.

AMABILE-CUEVAS C.F, CHICUREL M.E 1992. Bacterial plasmids and gene flux Cell **70** 189–199.

ANTÔNIO, R.V., 1994. Violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*: Synthesis and biological activities of a probable. Dissertation, Biology Institute, Universidade Estadual de Campinas, Brazil.

ANTONOV PA, MAXIMOVA VA, PANCHEVA RP. 1993. Heat shock and osmotically dependent steps by DNA uptake after *Escherichia coli* electroporation. Biochim Biophys Acta. 16;1216(2):286-8.

AZEVEDO, João Lucio de. Genética de Microrganismos. 2<sup>a</sup> ed. Goiânia: Editora UFG, 2008.

BALBÁS P, SOBERÓN X, MERINO E, ZURITA M, LOMELI H, VALLE F, FLORES N, BOLIVAR F. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. Gene; 50(1-3):3-40.

BARROS, E. V. S. A. 2005. Construção de um vetor de clonagem molecular em *Escherichia coli* com múltiplas funções utilizando o gene da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* como marcador genético. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

BÄTTIG P, MÜLEMANN K. 2008. Influence of the spxB gene on competence in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 190:1184–1189.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. 2001. In GARRITY, G. M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer, v. 1, p.721.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., BETLACH, M. C., BOYER, H. W. 1977<sup>a</sup>. Construction and characterization of new cloning vehicles I. Ampicilin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*, 2 (2); 75-93.

BROETTO, L; et al. 2006. Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host-range plasmid, applied genetics and molecular biotechnology. Porto Alegre, p.1-5.

CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M. 1978. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In: International Symposio on Current Topic in Radiology and Photobilogy. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Brasil, 121 p.

CHEN, Y. M.; SHIEH H.; LIN C. AND LIANG S., 2011. Properties and Construction of Plasmid pFW213, a Shuttle Vector with the Oral *Streptococcus* Origin of Replication. *Applied and Environmental Microbiology* v.77, p. 3967–3974.

COHEN, S. N.; CHANG, C. Y.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci*, v. 70 (11) p. 3240-3244.

CUEVA-MÉNDEZ G, PIMENTEL B. 2007. Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1. *EMBO Rep.*; 8(5):458-64.

M COUTURIER, F BEX, P L BERGQUIST, AND W K MAAS 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.*; 52(3): 375–395.

DALE, J. W. (1994). *Molecular Genetics of Bacteria*. Second Edition. John Wiley and Sons, Ltd.

DAUBIN V, MORAN NA, OCHMAN H. 2003. Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. *Science*. 8; 301(5634):829-32.

DEL SOLAR, G., GIRALDO, R., RUIZ-ECHEVARRIA, M. J., e al. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464.

DIAS, J. R. L. C.; MOTTA NETO, J. D. D. A.; RETTORI, D.; DURAN, N. 2002. Semiempirical INDOS/S study on the absorption apectrum of violaceína. *Jornal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 580, p. 85-90.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

DOWER, W. J., MILLER, J. F., AND RAGSDALE, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 11; 16(13): 6127–6145.

FIEDLER S, WIRTH R. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem.* 170(1):38-44.

FROST, L. S., LEPLAE, R., SUMMERS, A. O. & TOUSSAINT, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722 –732.

GARRITY, G. M.; WINTERS, M.; SEALES, D. B. 2001. Taxonomica outline of the genera prokaryotic. *Bergey's manual of syntematic bacteriology.* 2nd ed. New York: Sringer-verla. P. 1-39.

GITTE EBERSBACH AND KENN GERDES 2005. Plasmid Segregation Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* v. 39, p.453–79.

GONÇALVES, P. AND CASTRO, I. 2004. Efeito da Aplicação de Lamas Residuais Urbanas na Diversidade da População Rizobiana do Solo. *Silva Lusitana*, vol. 12, 95 - 104.

GORDON GS, SITNIKOV D, WEBB CD, TELEMAN A, STRAIGHT A. 1997. Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 90:1113–21.

GRIFFITHS R. C. L., ANTHONY J. F., CARROLL, S. B., WESSLER S. R. 2000. *Introdução à Genética - 10ª Ed.* Editora: GUANABARA KOOGAN.

HANAHAN D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 5;166(4):557-80.

HUNGRIA, M.; NICOLAS, M. F.; GUIMARAES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A.; VASCONCELOS, A. T. 2004. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. *Mutat. Res.*, v. 603, n. 1, p. 97-103.

HUBERT CIEŚLIŃSKI, KATARZYNA WERBOWY, JÓZEF KUR 2009. Characterization of a cryptic plasmid pSFKW33 from *Shewanella* sp. 33B. *Plasmid* Volume 62, Issue 1, Pages 44–49.

HUFF, J.P., GRANT, B.J., PENNING, C.A. AND SULLIVAN, K.F. 1990. Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Biotechniques* 9, 570–572, 574, 576–577.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

IBRAHIM S. K, BAKKIYARAJ D. 2009. Isolation and sequence analysis of a small cryptic plasmid pRK10 from a corrosion inhibitor degrading strain *Serratia marcescens* ACE2. *Plasmid* 62 (3): 183-90.

JAN LÖWE, KENN GERDES, JAKOB MÖLLER-JENSEN AND RASMUS BUGGE JENSEN. 2002. Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *The EMBO Journal*; 21, 3119 – 3127.

KOPPES LJ, WOLDRINGH CL AND NANNINGA N. 1999. *Escherichia coli* contains a DNA replication compartment in the cell center. *Biochimie*, 81, 803–810.

LEMON KP AND GROSSMAN AD. 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science*, 282, 1516–1519.

MANDEL, M., AND A. HIGA. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* v.5, p.154.

MESSING, J. VIEIRA, J. 1982 The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, v. 19 (3), p. 259-268.

NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER M., WANG Y., AND HOFSCHEIDER, P. H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982; 1(7): 841–845.

NOVICK, R. P. 1967. Penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. *Fed. Proc.* 26:29-38.

OLD, R. W.; PRIMROSE, S. B. 1981. Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering, Blackwell Science Inc.

PITLOVANCIU, Ana Kelly ET AL. Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. *Revista Biotemas*, 19(1), março de 2006.

POGLIANO, J., M. D. SHARP, AND K. POGLIANO 2002. Partitioning of chromosomal DNA during establishment of cellular asymmetry in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 184:1743-1749.

PRIMROSE, S., TWYMAN, R. AND OLD, R. 2004. Principes de Génie Génétique. De Boeck, 1ª edição.

SHENG Y., MANCINO V., AND BIRREN B. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 11; 23(11): 1990–1996.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

TODAR K. 2011. Bacterial Resistance to Antibiotics. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>

VALE, R. B. N. T., 2006. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum*. RELATÓRIO enviado ao CNPq. 20p.

VANWAGONER, T. M., WHITBY, P. W., MORTON, D. J., SEALE, T. W., AND STULL, T. L. 2004. Characterization of three new competence-regulated operons in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 186, 6409–6421.

VASCONCELOS, A. T. R., SIMPSON, J. G. e diversos colaboradores. , 2003. “The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability”. PNAS (USA) 100 (20): 116660-11665.

ZHAO DL, YU ZC, LI PY, WU ZY, CHEN XL, SHI M, YU Y, CHEN B, ZHOU BC, ZHANG YZ. 2011. Characterization of a cryptic plasmid pSM429 and its application for heterologous expression in psychrophilic *Pseudoalteromonas*. Microb Cell Fact. 5;10:30. doi: 10.1186/1475-2859-10-30.

YOSHIDA N, SATO M. 2009. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. Appl Microbiol Biotechnol. 83(5):791-8.

ZIMMERMANN B. R, U. 1980. Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. Biochim Biophys Acta. 24; 597(3):637–642.

## CAPÍTULO II

### ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DE PLASMÍDEOS NATURAIS DE *Chromobacterium violaceum* ISOLADAS NO RIO NEGRO- MANAUS, AM.

#### RESUMO

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Neisseriaceae, frequentemente encontrada no solo e na água, em regiões tropicais e subtropicais. O potencial biotecnológico da *C. violaceum*, devido suas características peculiares, levaram a sua escolha para ser a primeira bactéria a ter seu genoma sequenciado pelo Projeto Genoma Brasileiro (MCT/CNPq). Um estudo desenvolvido por do Vale, R. (2005) identificou moléculas de DNA extracromossomais na amostra CVT2 de *C. violaceum* isolada nas águas doces da região do Baixo Rio Negro que até então, não tinham sido identificadas nessa espécie bacteriana. Neste estudo foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos naturais de *C. violaceum* CVT2 bem como, a análise das sequências obtidas. A fração de DNA plasmidial de *C. violaceum* amostra CVT2 foi sequenciada por pirosequenciamento e a análise “*in silico*” revelou três *contigs* que poderiam corresponder a três plasmídeos naturais que foram denominados pCVT2.1, pCVT2.2 e pCVT2.3. O *contig* 1 (pCVT2.1) com o tamanho de 26.206pb e identidade de 84% ao plasmídeo pIJB1, o *contig* 2 (pCVT2.2) com o tamanho de 7.440pb e similaridade de 92% ao plasmídeo pRSB105 e o *contig* 4 (pCVT2.3) com o tamanho de 3062pb e similaridade de 82% ao plasmídeo pHLHK19. O resultado da anotação das sequências desses 3 *contigs* mostrou um total de 23 ORFs, sendo distribuídas da seguinte maneira: 18 ORFs localizadas no plasmídeo pCVT2.1, 7 ORFs no pCVT2.2 e, 1 ORF no plasmídeo pCVT2.3. A investigação sugere que a replicação dos plasmídeos pCVT2.2 e pCVT2.3 requerem uma proteína Rep e suas prováveis origens de replicação, com sequências de 511pb e 383, respectivamente, localizadas a montante do gene da proteína Rep.

## ABSTRAT

*Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacteria belonging to the Neisseriaceae family often found in soil and water in tropical and subtropical regions. The biotechnological potential of *C. violaceum*, due to its peculiar characteristics, led to his choice to be the first bacteria to have its genome sequenced by Brazilian Genome Consortium (MCT / CNPq). A previous study (Vale, R., 2005) identified extra chromosomal DNA molecules in *C. violaceum* CVT2 samples isolated in fresh waters from Negro in which so far had not been identified *C. violaceum* bacterial species in this region. Plasmids from *C. violaceum* CVT2 sample was sequenced by pyrosequencing and analysis " in silico " revealed sequences (*contig*) that could correspond to three natural plasmids pCVT2.1 , pCVT2.2 and pCVT2.3 so called . The contig 1 (pCVT2.1) with the size of 26.206pb and 84% similarity to plasmid pIJB1 the contig 2 (pCVT2.2) with the size of 7.440pb and 92% similarity to plasmid pRSB105 and contig 4 (pCVT2.3) size of 3062pb and 82% similarity to plasmid pHLHK19. The result of the sequences annotation of these three contigs showed a total of 23 ORFs, being distributed as follows: 18 ORFs located in the plasmid pCVT2.1 7 pCVT2.2 the ORFs, and ORF in plasmid pCVT2.3 1. Research suggests that replication of plasmids and pCVT2.2 pCVT2.3 require a Rep protein and its possible origins of replication with sequences 511and 383pb, respectively, located upstream from the gene Rep.

## INTRODUÇÃO

O genoma completo da *C. violaceum* foi sequenciado e os resultados mostraram um genoma de 4.751.080 pb, com 64,83% de conteúdo GC. Foram identificadas 4.431 ORFs, que correspondem a cerca de 89% do genoma, e 40% de suas ORFs com função desconhecida, ou seja, codificadoras de proteínas hipotéticas (HUNGRIA *et al.*, 2004), o que indica ser um patrimônio genético que ainda precisa ser desvendado.

A partir desse sequenciamento, alguns genes de interesse biotecnológico vêm sendo caracterizados, podendo-se destacar genes responsáveis pela detoxificação ambiental (CAREPO *et al.*, 2004), pelo menos 40 genes envolvidos com sistemas de resistência a múltiplas drogas (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004), grupos gênicos responsáveis pela biossíntese de agentes antitumorais (CHENG *et al.*, 2007), genes envolvidos na formação de biofilme (formação de celulose, flagelo e fímbrias) que, por sua vez, são regulados por moléculas mensageiras que atuam na patogênese bacteriana e desenvolvimento celular (RECOUVREUX *et al.*, 2008); e mais especificamente, genes de reparo de DNA que atuam nessa resposta (DUARTE *et al.*, 2004).

No sequenciamento do genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 e em outras amostras dessa bactéria não foi descrita a presença de plasmídeos (BNGPC, 2003), entretanto, estudos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologias de DNA da Universidade Federal do Amazonas mostrou presença destes DNAs extracromossômicos em amostras Amazônicas, especificamente nas isoladas nas proximidades do Tropical Hotel, Manaus-AM (Do VALE, 2006).

O objetivo deste estudo foi isolar e determinar as sequências dos plasmídeos naturais da amostra CVT2 da *Chromobacterium violaceum* e caracterizá-los utilizando procedimentos de bioinformática.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

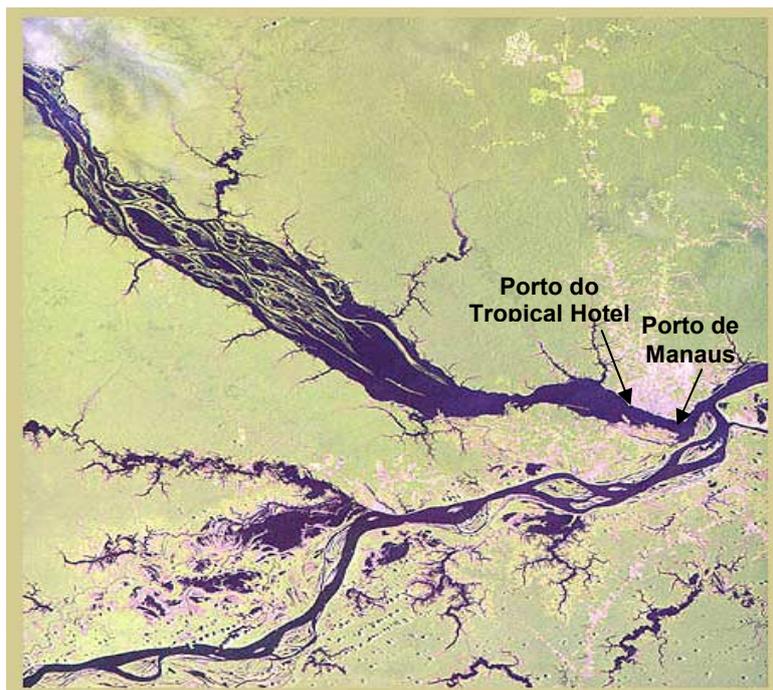
## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. MATERIAL

#### 1.1.1. Linhagens celulares

Para a realização deste trabalho foi utilizada uma amostra de *C. violaceum* denominada CVT2 isolada das águas escuras do Rio Negro (**Figura 9**).

A amostra encontra-se estocada em meio *Soft-agar* e a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Tecnologias de DNA da Universidade Federal do Amazonas.



**Figura 9** Foto de satélite da Região do Baixo Rio Negro com os dois pontos de coleta identificados.  
Fonte: INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### **1.1.2. Condições de cultivo da amostra *C. violaceum* CVT2**

A amostra de *C. violaceum* CVT2 foi reativada através do plaqueamento por estrias cruzadas em meio LB-sólido (Lúrina Bertani) e mantida a 30°C durante 16 horas. Posteriormente, colônias isoladas foram crescidas em 3 mL de meio LB-líquido, a 30°C, por 16h e então as células foram coletadas por centrifugação a 12000rpm para o isolamento do DNA plasmidial.

## **1.2. MÉTODOS**

### **1.2.1. Extração de DNA dos plasmídeos**

As moléculas plasmidiais de *C. violaceum* CVT2 foram purificadas de acordo com protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook, *et al.* (1989) com algumas modificações (ANEXO B-1).

#### **1.2.1.1. Quantificação de DNA**

As concentrações dos DNAs plasmidiais foram determinadas por espectrofotometria em 260/280nm de acordo como descrito por Sambrook, *et al.* (1989).

### **1.2.2. Sequenciamento da amostra plasmidial**

A fração do DNA plasmidial do isolado *C. violaceum* CVT2 foi submetida a sequenciamento de alta performance (pirosequenciamento) utilizando o equipamento GS FLX Titanium System (454 Life Sciences/Roche) (RONAGHI, 1998) no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, <http://www.labinfo.Incc.br/>) com a supervisão do Dr. Luiz Gonzaga Paula de Almeida e da Dra. Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos. O protocolo de sequenciamento se encontra no anexo B-3.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### 1.2.2.1. Análise e anotação das sequências

As sequências dos plasmídeos de *C. violaceum* CVT2 obtidas no sequenciador 454 *Life sciences/Roche* foram submetidas ao programa *Newbler* que faz parte do pacote “*GS De Novo Assembler*” desenvolvido pela própria Roche para a montagem dos *contigs*.

As anotações do *contigs* gerados foram realizada através da plataforma SABIA (*System for Automated Bacterial (genome) Integrated Annotation*) (ALMEIDA *et al.*, 2004), desenvolvida no Laboratório de Bioinformática do LNCC. Para pesquisa de similaridade das sequências de DNAs ou de proteínas foram utilizadas as ferramentas de bioinformática *Blastn*, *Blastp* e *Blastx* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) em bases públicas de dados tais como *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Kegg, Swiss Prot, TCDB e InterPro.

As sequências nucleotídicas dos plasmídeos foram submetidas à análise de restrição através do programa *NEBCutter2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) para verificação dos possíveis sítios de reconhecimento pelas endonucleases de restrição.

Posteriormente, foram feitos mapas físicos a partir das sequências nucleotídicas com suas ORFs e ORIs através do programa *pDRAW32* (<http://www.acaclone.com/>), que possibilitou verificar também a localização dos sítios de restrição do plasmídeo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do Vale (2006) isolou 53 amostras de *C. violaceum* a partir da água coletadas na região do Baixo Rio Negro- Manaus sendo que destas, 23 amostras apresentaram plasmídeos. Uma amostra isolada denominada de *C. violaceum* CVT2 contendo pelo menos três tipos de DNA extracromossomais, foi escolhida para que seus plasmídeos fossem caracterizados.

### 2.1. Extração da amostra plasmidial

O produto da extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina foi analisado por eletroforese em gel de agarose e o resultado está mostrado na figura 10 a seguir. O perfil eletroforético mostra três bandas do tamanho de cerca de 3kb, 7kb e maior que 20kb de forte fluorescência indicando a possibilidade de existirem três plasmídeos nessa amostra bacteriana.

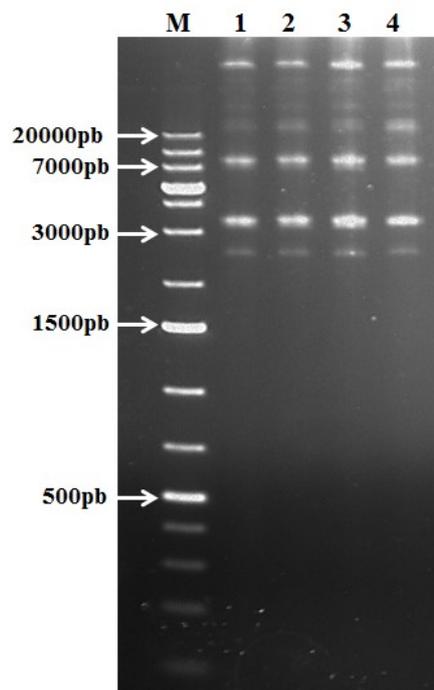


Figura 10 Perfil eletroforético dos plasmídeos naturais da amostra CVT2 de *C. violaceum* isolada nas águas do Rio Negro, Manaus-AM. M: Marcador DNA Gene Ruler™ 1kb Plus Fermanta. No poço 1 a 4 correspondem às amostras de DNA plasmidial purificadas.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

## 2.2. Sequenciamento e análise “*in silico*” do DNA plasmidial da amostra *C. violaceum* CVT2

Aproximadamente 400 ng/μL das amostras plasmidiais de *C. violaceum* CVT2 foram utilizados para a reação de sequenciamento, o que resultou em sequências com tamanho médio de 400pb totalizando 11.678.699pb. Estas sequências plasmidiais foram submetidas ao programa de montagem *Newbler*, o que resultou em 15 (quinze) *contigs*, compreendendo o total de 113.197pb. O resultado da análise quanto a similaridade dos *contigs* gerados mostraram que eles apresentam similaridade com sequências de outros plasmídeos depositados no *GenBank* do NCBI com *e-values* próximos de zero (tabela 2).

**Tabela 1: Mostra o nível de similaridade dos *contigs* com sequências de outros plasmídeos depositadas no *GenBank*.**

Blastn NCBI				
Contig	Tamanho	Similaridade	%	e-value
1	26206 bp	Plasmídeo pIJB1- <i>Burkholderia cepacia</i>	80%	8e-114
2	7440bp	Plasmídeo pRSB105- <i>Uncultured bacterium</i>	82%	0,0
3	7059 bp	Plasmídeo pKLC102- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tronsposon	83%	2e-13
4	3062 bp	Plasmídeo pHLHK19 replication inato <i>Volvo carteri f. nagariensis</i>	82%	1e-42
5	2324 bp	Plasmídeo NPL-1M Tn1-like transposon- <i>Pseudomonas putida</i>	86%	0,01
6	1830 bp	Plasmídeo pTHA01- <i>Thauera</i>	76%	1e-74
7	1387 bp	Plasmídeo pB8-IncP-1beta multiresistence	77%	0,0
8	1370 bp	Plasmídeo pSWIT02- <i>Sphingopyxis wittichi</i> RWI	68%	6e-95
9	1048 bp	Plasmídeo pMKMS02- <i>Mycobacterium sp.KMS</i>	77%	0,012
10	980 bp	Plasmídeo pKLH203- <i>acinetobacter junii</i>	91%	0,003
11	863 bp	Plasmídeo pVEIS01- <i>Verminephrobacter ciseniae</i> EF01-2	71%	2e-29
12	811 bp	Plasmídeo pVEIS01- <i>Verminephrobacter ciseniae</i> EF01-2	75%	5e-37
13	691 bp	Plasmídeo pDK1 – <i>Pseudomonas putida</i>	84%	2e-136
14	631 bp	Plasmídeo pEMT8	72%	2e-47
15	436 bp	Plasmídeo pRHL1 – <i>Rhodococcus fostii</i> RHA1	86%	5e-14

De acordo com os resultados das análises geradas no pirosequenciamento foram obtidas as sequências que podem corresponder aos três plasmídeos da amostra CVT 2 de *C. violaceum*, o *contig* 1 (pCVT2.1) com tamanho de 26.206pb e com 68% de bases GC e similaridade de 80% com o plasmídeo pIJB1, o *contig* 4 (pCVT2.2) com tamanho de 7.440pb com 61% de bases GC e similaridade de 92% com o plasmídeo pRSB105 e o

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

*contig* 14 (pCVT2.3) com 3062pb, com 57% de bases GC e similaridade de 82% com o plasmídeo pHLHK19.

### 2.2.1. Anotação das sequências dos plasmídeos naturais de *C. violaceum* CVT2

A anotação dos *contigs* pela plataforma SABIA mostrou um total de 26 ORFs, sendo distribuídos em: 18 ORFs codificadoras de prováveis genes do plasmídeo pCVT2.1, 7 ORFs do plasmídeo pCVT2.2 e 1 ORF do plasmídeo pCVT2.3.

#### 2.2.1.1. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.1

A sequência nucleotídica do *contig* correspondente ao pCVT2.1 possui cerca de 26kb, por isso esse plasmídeo pode ser considerado como um plasmídeo grande. Plasmídeos considerados grandes, descritos em proteobacteria, por exemplo, em *Burkholderia cepacia* (LIN,Q.Y. e BRUCE,I.J., 2012), *Pseudomonas putida* ND6 (ZHAO *et al.*,2012), *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( COPELAND *et al.*, 2006) normalmente apresentam resistência a antibióticos e/ou contêm genes que conferem virulência à bactéria (GUERRA *et al.*,2001).

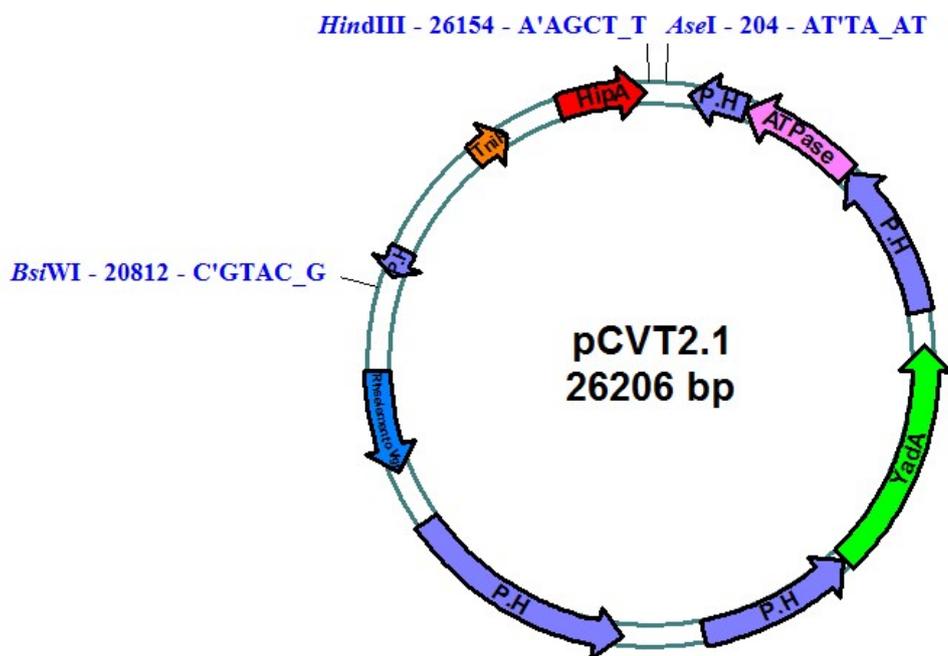
**Tabela 2:** Apresenta percentual de similaridade do plasmídeo pCVT2.1, com outras sequências depositadas no GenBank.

Similaridade	%	e-value
Plasmídeo pIJB1- <i>Burkholderia cepacia</i>	78%	1e-140
Plasmídeo pAKD4 - Uncultured bacterium pAKD4	78%	1e-140
Plasmídeo pAKD16 - Uncultured bacterium	77%	5e-132

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### 2.2.1.2. Representação esquemática do pCVT2.1

Na figura 11 está representado o mapa parcial do pCVT2.1, que apresenta os genes codificantes da enzima AAAATPase, YadA domain-containig, Rhs element Vgr, TniR protein, HipA N-terminal e os sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição identificados pelo *NebCutter*, os quais, alguns estão inseridos dentro dos genes condificantes para proteínas do pCVT2.1.



**Figura 11** Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.1. Rosa- ATPase na posição 1465-3318pb; (Verde) YadA na posição 6246-9854pb; Azul- Rhs elemento Vgr na posição 17980-19572pb; laranja- TniR na posição 23261-23884pb e; vermelho- HipA N-terminal na posição 24759-26108pb. As posições 582-1472pb, 9867-12308pb, 13551-17120pb, 21030-21476pb e 3311-5725 destacadas em lilás são algumas sequências codificadoras encontradas de proteínas hipotéticas (proteínas com funções desconhecidas).

#### 2.2.1.2.1. Análise das ORFs do pCVT2.1

O resultado da análise da sequência parcial do plasmídeo pCVT2.1 utilizando a plataforma SABIÁ (Sistema de Anotação Automático de Genomas de Bactérias)

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

(ALMEIDA *et al.*, 2004), mostrou a presença de dezoito ORFs (quadros abertos de leitura) que representa possíveis genes presentes nesta sequência.

Os resultados quanto à identidade dessas sequências codificadoras para proteínas mostraram que: a sequência da ORF 2 se mostrou similar a sequência gênica relacionada à replicação do DNA, divisão celular, transporte e degradação de proteínas (LEONHARD *et al.*, 1996) e a ORF 11 se mostrou similar ao gene relacionado com o sistema de secreção tipo VI bacteriana (BRÖMS *et al.*, 2012). As sequências gênicas das ORFs 5, 16 e 18 mostraram similaridades com genes relacionados à virulência bacteriana (TAHIR & SKURNIK, 2001), resistência ao mercúrio (SHNEIKER *et al.*, 2001) e a tolerância a antibiótico (MOYED & BERTRAND, 1983), respectivamente. As ORFs 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15 e 17 apresentaram homologia com genes de proteínas hipotéticas. A ORF 10 não apresentou similaridade com sequências depositadas no banco de dados. Os resultados obtidos apresentando as identidades das prováveis sequências de aminoácidos estão mostrados na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Apresenta a caracterização das ORFs do plasmídeo pCVT2.1, percentual de similaridade com as proteínas depositadas no *GenBank*.

Plasmídeo	ORF	Tamanho da proteína	Proteína	Similaridade	E-Value
pCVT2.1	2	629aa	AAATPase	69%	1e-12
pCVT2.1	5	265aa	YadA domain-containig	71%	4e-30
pCVT2.1	11	530aa	Rhs element Vgr	64%	3e-27
pCVT2.1	16	259aa	TniR protein	62%	3e-91
pCVT2.1	18	475aa	HipA N-terminal	63%	2e-26

Apesar da montagem das sequências ter gerado um *contig* de 26.206pb sendo assim considerado como correspondente ao plasmídeo pCVT2.1 e nessa sequência existirem dezoito prováveis genes, sendo que, treze correspondentes a genes codificadores de proteínas hipotéticas, não foi encontrada a sua origem de replicação.

Alguns dos plasmídeos maiores possuem genes que codificam enzimas especiais, específicas para sua replicação (BROWN, 1999), como a AAATPase, presente nesse plasmídeo. Contudo, não foi possível determinar com segurança se a molécula plasmidial está circularizada, pois não foi possível seu fechamento com os outros pequenos *contigs*

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

gerados no sequenciamento. O fato do *contig* estar incompleto justifica não ter sido possível encontrar sua origem de replicação.

### 2.2.1.3. Análise dos sítios de restrição do pCVT2.1

O resultado da análise “*in silico*” da sequência nucleotídica do plasmídeo pCVT2.1 mostrou a existência de 268 sítios de enzimas de restrição, desses 12 são sítios únicos de restrição, sendo que, 3 (**Figura 11**) desses não estão localizados dentro de sequências codificadoras para proteínas. Alguns dos sítios únicos de restrição encontrados, com as sequências e a posições de corte nos genes do plasmídeo pCVT2.1 encontra-se mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Mostra os sítios únicos de restrição do pCVT2.1.

Enzimas de Restrição	Sequências que cortam	Posição da base que cortam
<i>AcII</i>	(AA'GGTT)	15611
<i>AseI</i>	ATTA AT	204
<i>BspHI</i>	(T'CATGA)	9851
<i>BsiWI</i>	C'GTACG	20812
<i>HindIII</i>	A'AGCTT	26154
<i>NdeI</i>	(CA'TATG)	19292
<i>PsiI</i>	TTA'TAA	23225
<i>SmaI</i>	CCC'GGG	13752
<i>SspI</i>	AAT'ATT	22704
<i>SbjI</i>	(CCTGCA'GG)	9496
<i>SgrDI</i>	(CG'TCGACG)	16075
<i>XmaI</i>	(C'CCGGG)	13750

\*As endonucleases destacadas em azul são enzimas de sítios únicos e que não cortam no interior de nenhuma sequência gênica do plasmídeo pCVT2.1.

### 2.2.2. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.2

A sequência nucleotídica correspondente ao plasmídeo pCVT2.2 possui 7.440, razão pela qual é considerado o plasmídeo de tamanho médio. Plasmídeos considerados médios, descritos em proteobacteria, por exemplo, em *Serratia marcescens* (BONNIN *et al.*, 2012), normalmente apresentam resistência a antibióticos e sistema de partição para se manter estável na célula hospedeira (BONNIN *et al.*, 2012).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

O resultado da análise quanto a similaridade do plasmídeo pCVT2.2 mostrou que ele apresenta similaridade com outras sequências de plasmídeos depositados no *GenBank* do NCBI com *e-values* de zero (Tabela 5).

Tabela 5: Apresenta percentual de similaridade do plasmídeo pCVT2.2, com outras sequências depositadas no GenBank.

Similaridade	%	e-value
Plasmídeo pRSB105- Uncultured bacterium	82%	0,0
Plasmídeo pRIO-5 - <i>Serratia marcescens</i>	82%	0,0
Plasmídeo Rms149- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81%	0,0
Plasmídeo pMOL30 - <i>Cupriavidus metallidurans</i>	71%	0,0

### 2.2.2.1. Representação esquemática do pCVT2.2

A Figura 12 mostra a distribuição dos possíveis genes no pCVT2.2. Além do posicionamento também são mostradas as orientações dos genes, local da possível origem de replicação e a localização dos sítios únicos de enzimas de restrição encontrados.

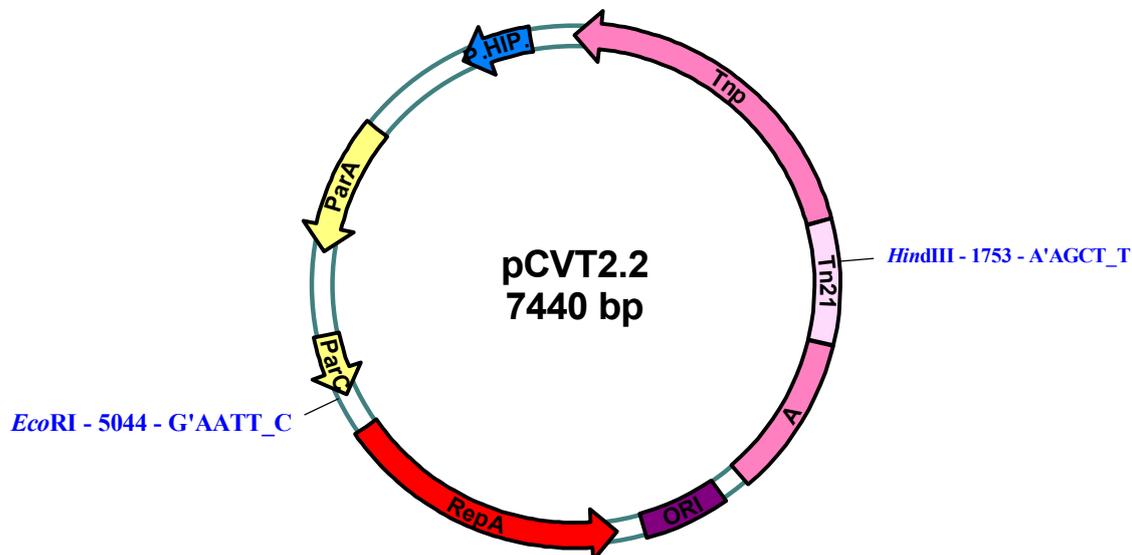


Figura 12 Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.2. Em vermelho encontra-se um gene codificador para a enzima replicase (Rep); Amarelo, três genes codificadores das proteínas do sistema de partição (ParA e ParC); rosa, um gene transposase (*TnpA*), um elemento móvel (Tn21) e, lilás, provável origem de replicação (Ori).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Na figura 12 está representado o mapa físico do pCVT2.2, o qual apresenta um gene codificante da proteína replicase RepA, dois genes codificantes de proteínas para o sistema de partição (ParA e ParC), um gene codificante para transposase com seu elemento móvel Tn21. Da primeira base do plasmídeo até a posição de 1774 pb (genes codificantes para replicases e OriV), há 52,8% de G+C e os 1891 pb finais (genes de mobilização) possuem 47,2% de G+C; estes dados são similares ao descrito por Guerry, Van Embden e Faldow, (1974), quando descreveram que o plasmídeo S-SuSm presente em *Salmonella* sp.

#### 2.2.2.2. Análise das ORFs do pCVT2.2

A ORF 1 apresentou similaridade de 74% com uma transposase (TnpA) do plasmídeo pRSB105 (GI: 19352380). A transposase TnpA é codificada pelo elemento móvel Tn21 e está relacionada a resistência ao antibiótico estreptomicina (CHIOU & JONES, 1993; SCHÜTER *et al.*, 2007). Foi possível identificar o gene de resistência a estreptomicina no plasmídeo pCVT2.2 em experimento de transformação genética de *C. violaceum* com o plasmídeo derivado pCVK2 (CAPÍTULO 3).

As ORFs 2, 3 e 4 apresentaram similaridade com elementos gênicos de um plasmídeo típico. A ORF 2 apresentou similaridade com o gene da proteína Rep do plasmídeo pRSB105 (GI:112553491) que está envolvida na replicação do plasmídeo (Del SOLAR *et al.*, 1998). As ORFs 3 e 4 apresentaram similaridade com o gene ParA do plasmídeo pHLHK26 (GI:85372712 e o gene ParC do plasmídeo IncP-6 (GI: 66968608), respectivamente, que estão relacionadas ao sistema de partição de alguns plasmídeos (GERDES, 2000; BOUET, 2007). As ORFs do plasmídeo pCVT2.2 estão apresentadas na **Tabela 7**.

**Tabela 6:** Apresenta a caracterização das ORFs do plasmídeo pCVT2.2, percentual de similaridade com as proteínas depositadas no *GenBank*.

Plasmídeo	ORF	Tamanho da proteína	Proteína	Similaridade	E-Value
pCVT2.2	1	945aa	Transposase (Tn21)	74%	0,0
pCVT2.2	2	449aa	RepA	84%	1e-20
pCVT2.2	3	213aa	ParA	62%	1e-23
pCVT2.2	4	267pb	ParC	77%	2e-10

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### 2.2.2.3 Sítios únicos de restrição do pCVT2.2

O programa NEBcutter V2.0 foi utilizado com o objetivo de identificar sítios de restrição presentes na molécula do pCVT2.2. A partir da sequência total de 7440 pb obtida. O software identificou 59 sítios de reconhecimento para endonucleases e desses, 16 são sítios únicos de restrição no plasmídeo em questão, sendo que, só os sítios *EcoRI* e *BsiWI* não estão situado em genes codificadores de proteínas. Os sítios únicos de clivagem presentes nesta molécula de DNA, as posições em que estão presentes, bem como as principais enzimas de restrição que podem atuar sobre cada uma dessas regiões de clivagem estão descritas na **Tabela 06** e na **Figura 12**.

**Tabela 7: Mostra os sítios de restrição no pCVT2.2.**

<b>Enzimas de Restrição</b>	<b>Sequências que cortam</b>	<b>Posição que cortam</b>
<i>AatII</i>	GACGT'C	2352
<i>BbeI</i>	GGCGC'C	2023
<i>BsrGI</i>	T'GTACA	3890
<i>BstBI</i>	TT'CGAA	111
<i>EcoRI</i>	G'AATTC	5044
<i>EcoRV</i>	GAT'ATC	1411
<i>BsiWI</i>	C'GTACG	
<i>HindIII</i>	A'AGCTT	1753
<i>HpaI</i>	GTT'AAC	5754
<i>NsiI</i>	ATGCA'T	1569
<i>SacII</i>	CCGC'GG	4547

\*As endonucleases destacadas em azul são enzimas de sítios únicos e que não cortam no interior de nenhuma sequência gênica do plasmídeo pCVT2.2.

### 2.2.2.4. Origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2

A provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2 foi identificada no trecho de 511pb (**Figura 13**) e possui 58% de bases GC na sua sequência, posição 2.882 até 3.393pb.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

A provável origem de replicação possui duas sequências repetidas, CCCACGTG e TTTTCA que ocorrem em duas cópias dentro da origem de replicação, um domínio que se liga a proteína DnaA (ATTATTCAA) e uma sequência rica em A+T adjacente, situada próximo ao gene RepA, O arranjo dessa sequência sugere que o plasmídeo pCVT2.2 tem a replicação do tipo theta igual ao plasmídeo R1 (Del SOLAR *et al.*, 1998).

A origem de replicação do pCVT2.2, quando analisada, apresentou similaridade com origens de outros plasmídeos depositados no banco de dados do *GenBank*, como, o pRSB105, o pRSB101 e o PA7 com 75%, 77% e 77% de similaridade, respectivamente.

```
GGCGCTAGAATGTGAGCTAAGAATCTGGTGTGTTACCCACGTGCCACGTGCTAGCCCCCT
TCGGGTCCAAACAGTGCCACCTGTACGGTCCCACCTCTTGCCAAGCCTCGCTGCCA
CGCGGGGCTTTGCTTTTCAATCTGTGCAATCCGCTCCTTTGCCGTCAAGGTTCCGG
GAACCCACCCTGTGCGGTCTGCCGTCCATTGAAGGACTCCATGCTGTGCGGAGCACGGC
GGCTGCGCCGTGCAACGACCGGAAGAACCGCACACCGCCCCGGTACTGCCCGAGGAT
GCGCCGCTCGTTTCCGATGTGCAGCACGATACCAGCCCTTGCTCCGTGTTTCTGATC
GCTGCCCTGGGGAGTTGCGTTCGCAAATCCTTGAACACCGCAGGCGGCAGCACCTG
TAACTTCAACGGTTCAGAATCGACCATCGCTTTATACCCACATCCCGTTTTTCAGCAA
CATTATTCAATTCGCACGTCTCAAAAAGTATGGAACAGAGTCCAT
```

**Figura 13** Sequência da provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2. Em verde- as sequências repetidas, azul- sequência do domínio que se liga a DnaA; vermelho- região rica em A+T.

O plasmídeo pCVT2.2 possui em sua sequência genes estruturais que garantem que pelo menos uma cópia do plasmídeo perpetue na hospedeira, como, genes ParA e ParC, o gene RepA e sua origem de replicação próxima ao gene RepA e, uma transposase. Contudo, não foi possível determinar com segurança se a molécula plasmidial está fechada, pois não foi possível circularizar essa sequência, nem com o auxílio de outras sequências geradas no sequenciamento, o que subentende-se a presença de *gaps* nas sequências *contigs*. Para reforçar a afirmativa, a sequência do plasmídeo pCVT2.2 de alta similaridade com outros plasmídeos com aproximadamente o mesmo tamanho e estrutura, como, o plasmídeo pRIO-5 de *Serratia marcescens* (BONNIN, *et al.*, 2012), uma proteobacteria, com 12,957bp e o fosmídeo pCC1FOS da empresa Epicentre com 8kb.

### 2.2.3. Anotação da sequência do plasmídeo pCVT2.3

A sequência nucleotídica do contig correspondente ao plasmídeo pCVT2.3 possui 3062pb e é considerado como um plasmídeo pequeno.

O resultado da análise quanto a similaridade do plasmídeo pCVT2.3 mostrou que ele apresenta similaridade com a sequência do plasmídeo pHLHK19 de *Laribacter hongkongensis* depositado no *GenBank* do NCBI com *e-values* próximos de zero.

O resultado da análise de restrição “in silico” da sequência do plasmídeo pCVT2.3 mostrou a existência de 85 sítios de enzimas de restrição, desses 13 são sítios únicos de restrição, sendo que, 3 sítios de restrição não estão presentes dentro do gene codificador da proteína Rep, como mostra a **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Mostra os sítios únicos de restrição importantes no pCVT2.3.

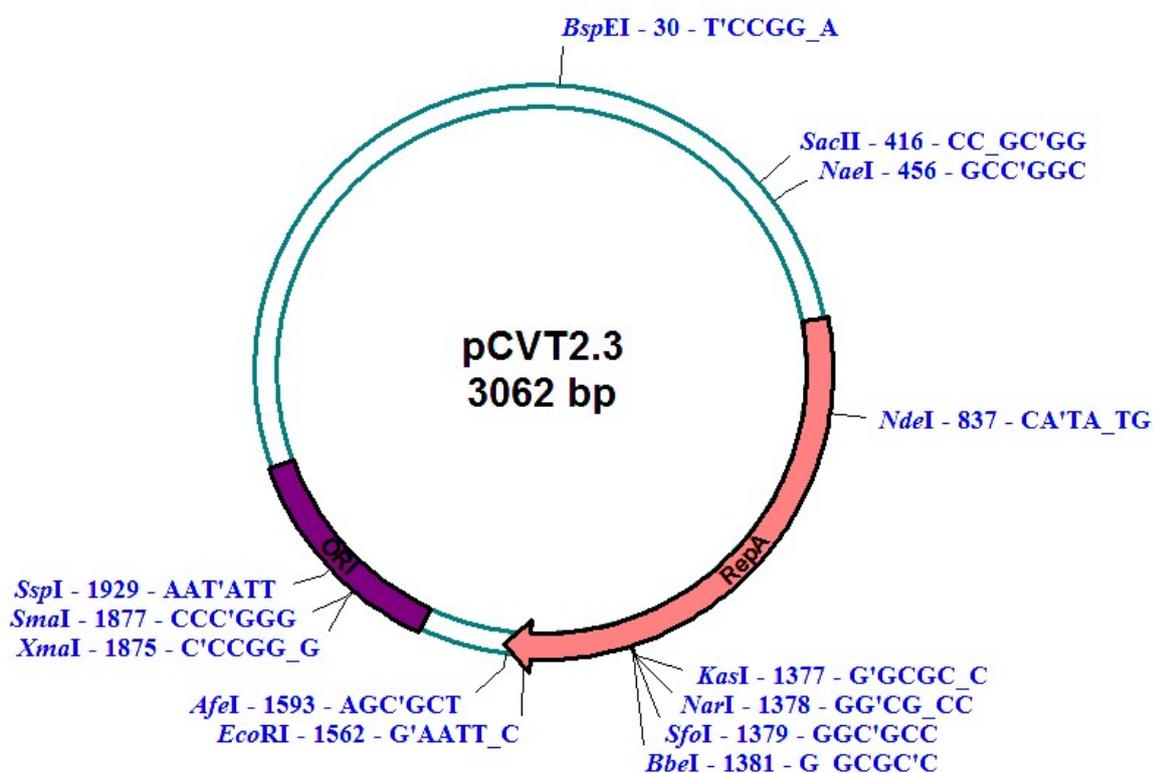
Enzimas de Restrição	Sequências que cortam	Posição de corte
<i>AfeI</i>	AGC'GCT	1593
<i>BbeI</i>	G GCGC'C	1381
<i>BclI</i>	T'GATC A	1888
<i>BspEI</i>	T'CCGG A	30
<i>EcoRI</i>	G'AATT C	1562
<i>NaeI</i>	GCC'GGC	456
<i>NarI</i>	GG'CG CC	1378
<i>NdeI</i>	CA'TA TG	837
<i>SacII</i>	CC GC'GG	416
<i>SfoI</i>	GGC'GCC	1379
<i>SmaI</i>	CCC'GGG	1877
<i>SspI</i>	AAT'ATT	1929
<i>XmaI</i>	C'CCGG G	1875

\*As endonucleases destacadas em azul são enzimas de sítios únicos e que não cortam dentro da sequência do gene Rep do plasmídeo pCVT2.3.

#### 2.2.3.1. Representação esquemática do pCVT2.3

A localização do possível gene com seu posicionamento, orientação e também a localização dos sítios de restrição do pCVT2.3 está mostrada na **Figura 14**.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 14** Representação esquemática do provável plasmídeo pCVT2.3. Em rosa apresenta o gene codificador para a proteína Rep; Em lilás, apresenta a provável origem de replicação do plasmídeo.

### 2.2.3.2. Análise da ORF do pCVT2.3

A sequência do pCVT2.3 apresentou uma única ORF e esse se mostrou similar em 69% com o gene codificador da proteína Rep do plasmídeos pHLHK19 (GI:85372710).

### 2.2.3.3. Origem de replicação (ORI) do plasmídeo pCVT2.3

A sequência da provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.3 foi identificada no trecho de 383pb (**Figura 15**) e 44% de bases GC na sua sequência, posição 1.744 até 2.127pb.

A sequência da provável origem de replicação possui uma sequência repetida (CATATCT) e uma sequência inversa complementar interrompida por três bases

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

(CCAAATGATTTGG) que ocorrem em duas cópias dentro da origem de replicação, um domínio que se liga a DnaA (AAATACACA) e uma região rica em A+T adjacente, situado próximo ao gene Rep. Esse arranjo também sugere que esse plasmídeo possui uma replicação do tipo theta igual a do plasmídeo R1 (Del SOLAR *et al.*, 1998).

A origem de replicação do pCVT2.3, quando analisada, também apresentou similaridade de 62% com a origem de replicação do plasmídeo pHLHK19 depositado no banco de dados do *GenBank*.

```
CATATCTGCTGTAAGTGATGCCTTCCCATCGATTAGCCTACTGATTGCTGACGT
GAAAAACCTAAACGTTTCAGCCAGGCTCTTCTGGGTCATACCGGCAGGTTTCGAC
ATAAGCGAGTTGCAGGTACTCCCCGGGTGCATTGTGATCATATCTAGTCCTTT
TTGCGCGTTGCGCAACGCGCAATATTCACCTTAAAAAAAAGCTATTGACAGCTA
TCACCAATTGTGATAGCTTCCAAATGATTTGGCGCATCAATGGCATGATTACTT
TTAACGTGCAAAGTGAAGTGAACGTGTCGTTTCTCTTTCGTCGTCAAATAAAACGT
TAAATACACAGGAGAAATTGCATGATTAGTGAAAACGATATTGTCCACAAAGGG
CTAA
```

**Figura 15** Sequência da provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.3. Em verde- as sequências repetida, azul- sequencia do domínio que se liga a DnaA; vermelho- região rica em A+T.

A montagem das sequências gerou um *contig* com 3.062pb, sendo assim, considerado o provável plasmídeo pCVT2.3 de pequeno peso molecular. Em geral, plasmídeos pequenos estão presentes em várias cópias por célula (plasmídeos multicópia) (SOLAR e ESPINHOSA, 2000). Na sua sequências está presente somente o gene RepA que garante sua replicação dentro da célula hospedeira. Além disso, foi encontrada sua origem de replicação próximo ao gene RepA que determina o tipo de replicação plasmidial, tipo theta. Para reforçar a afirmativa, a sequência do plasmídeo pCVT2.3 foi similar a sequência e estrutura do plasmídeo pHLHK19 que possui aproximadamente o mesmo tamanho e somente a estrutura que garante sua permanência nas células de *Laribacter hongkongensis* (WOO *et al.*, 2007). Contudo, não foi possível determinar com segurança se a molécula plasmidial está fechada, pois não foi possível circularizar essa sequência, nem com o auxílio de outras sequências geradas no sequenciamento, o que subtende-se a presença de *gaps* nas sequências *Contigs*.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram concluir que:

- De acordo com os resultados das análises das sequências geradas no pirosequenciamento foram obtidas sequências parciais que devem corresponder aos plasmídeos pCVT2.1 com cerca de 26kb, pCVT2.2 com cerca de 7.5kb e do plasmídeo pCVT2.3 com 3kb .
- Foi possível identificar a provável origem de replicação do plasmídeo pCVT2.2 e do pCVT2.3 no trecho de 511pb possuindo duas sequências repetidas, um domínio de ligação a proteína DnaA e uma região rica em A+T adjacente, situado próximo ao gene RepA, típico de replicação do tipo theta do plasmídeo R1.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. G., PAIXÃO, R., SOUZA, R. C., COSTA, G. C., BARRIENTOS, F. J., SANTOS, M. T., ALMEIDA, D. F. & VASCONCELOS, A. T. 2004. O System for Automated Bacterial (genome) Integrated – SABIA. *Bioinformatics* 20:2832-3.

ALTSCHUL, S.F., Madden, T.L.; Shaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped Blast and PST-Blast: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* v. 25, p. 3389-3402.

BONNIN, R.A., POIREL, L., NAAS, T., PIRS, M., SEME, K., SCHRENZEL, J., NORDMANN, P. 2012. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* V18: e362-5.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM 2003. "The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability". *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (20): 11660–5.

BOUET JY, NORDSTRÖM K, LANE D. 2007. Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts. *Mol Microbiol*;65(6):1405-1414.

BRÖMS, J.E., MEYER, L., SUN, K., LAVANDER, M., SJÖSTED, A. 2012. Unique substrates Secreted by the Type VI Secretion System of *Francisella tularensis* during Intramacrophage Infection. *PloS One.* v. 7, n. 11, p. e50473, 2012.

CAREPO MS, AZEVEDO J.S, PORTO J.I, BENTES-SOUSA A.R, BATISTA JDA S, SILVA A.L, SCHNEIDER M.P. 2004. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. *Genetics and molecular research*, 3, 181-194.

CHENG Y., YANG M. AND MATTER AM. 2007. Characterization of a Gene Cluster Responsible for the Biosynthesis of Anticancer Agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Applied and Environmental Microbiology.* 11(73): 3460-3469.

CHIOU, C-S, JONES, A.L. 1993 Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *J Bacteriol* v. 175, p.732–740.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

COPELAND D.M., SOARES A. S., WEST A.H. AND RICHTER-ADDO G.B. 2006. Crystal structures of the nitrite and nitric oxide complexes of horse heart myoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(8):1413-1425.

DEL SOLAR, G., GIRALDO, R., RUIZ-ECHEVARRIA, M. J., e al. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–464.

DUARTE F. T., CARVALHO F. M. BEZERRA E SILVA U. SCORTECCI K. C., BLAHA C.A.G., AGNEZ-LIMA L.F., MEDEIROS S.R.B. 2004. DNA repair in *Chromobacterium violaceum*. *Gen Mol Res.* 3(1): 167-180.

FANTINATTI-GARBOGGINI F, ALMEIDA R, PORTILLO VA, BARBOSA TAP, TREVILATO PB, NETO CER, COÊLHO RD, SILVA DW, BARTOLETI LA, HANNA ES, BROCCHI M, MANFIO GP 2004. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res* 3: 134-147.

GERDES K, MOLLER-JENSEN J, JENSEN RB. 2000. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol*; 37(3):455-466.

GUERRY P, VAN EMBDEN J, FALKOW S. 1974. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J Bacteriol.* v.117(2):619–630.

HUNGRIA, M.; NICOLAS, M. F.; GUIMARAES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A.; VASCONCELOS, A. T. 2004. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. *Mutat. Res.*, v. 603, n. 1, p. 97-103.

LEONHARD, K., HERRMANM, J. M., STUART, R. A., MANNHAUPT G., NEUPERT, W., LANGER, T. 1996. AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *Embo Journal*, v. 15, n. 16, p. 4218-4229.

MOYED, H.S., NGUYEN, T.T. AND BERTRAND, K.P. 1983. Multicopy *TnlO tet* plasmids confer sensitivity to induction of *tet* gene expression. *J. Bacteriol.* v. 155, p. 549-556.

RECOUVREUX D.O.S., CAMINATTI C.A., PITLOVANCIV N.A., RAMBO C.R., PORTO L.M. AND ANTÔNIO R.V. 2008. Cellulose Biosynthesis by the Beta-Proteobacteium, *Chromobacterium violaceum*. *Current Microbiology*, 57(5): 469-476.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T., 1989. .Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Section XII. Second edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

SHNEIKER, S., KELLER, M., DRÖGE, M., LANKA, E., PÜHLER, A., SELBITSCHKA, W. 2001. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, n.24, p. 5169–5181.

SOLAR G. AND ESPINOSA M., 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol.* v37(3):492-500.

VALE, R. B. N. T., 2006. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum*. RELATÓRIO enviado ao CNPq. 20p.

VASCONCELOS, A. T. R., SIMPSON, J. G. e diversos colaboradores. , 2003. “The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability”. *PNAS (USA)* 100 (20): 116660-116665.

WOO P.C., MA S.S., TENG J.L., LI M.W., LAU S.K. 2007. Plasmid profile and construction of a small shuttle vector in *Laribacter hongkongensis*. *Biotechnol Lett* 29: 1575–1582.

ZHAO H, LI S. 2012. Complete genome sequence of the naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* strain ND6. *J. Bacteriol.* 194 (18): 5154-5.

## CAPÍTULO III

# CONSTRUÇÃO DE UM VETOR PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum*

### RESUMO

Bactérias e plasmídeos, para a Engenharia genética, são importantes ferramentas, tendo as bactérias como receptores usuais do material genético transferido, podendo crescer em meio simples e, assim, produzir grandes quantidades do produto do gene e os plasmídeos como vetores de transporte dos genes de interesse porque são facilmente isolados e manipulados. O novo plasmídeo descrito neste trabalho, denominado pCVK2, foi construído para a transformação genética de *Chromobacterium violaceum* P1C3. O pCVK2, é um vetor derivado de um plasmídeo de ocorrência natural, pCVT2.2, detectado a partir da amostra selvagem CVT2 de *Chromobacterium violaceum* CVT2, amostra isolada das águas da região do baixo Rio Negro, Manaus-AM. Na construção do plasmídeo pCVK2 foi realizada inserção do marcador seletivo, o gene de resistência a canamicina no plasmídeo pCVT2.2. A *C. violaceum* P1C3 foi transformada geneticamente para resistência a canamicina pelo plasmídeo pCVK2 por eletroporação com eficiência da ordem de  $10^5$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial. Considera-se que esse plasmídeo recombinante possa ser a base para o desenvolvimento de diferentes vetores de clonagem molecular para essa espécie bacteriana.

## ABSTRAT

Bacteria and plasmids are important tools for genetic engineering, with bacteria as usual hosts and in transferring genetic material in the way that it can grow indefinitely in a simple and economic producing large amounts of interest gene. Plasmids as shuttle vectors of genes of interest can easily isolated and manipulated. The new plasmid described in this paper, called pCVK2, was built for genetic transformation of *Chromobacterium violaceum* P1C3. The pCVK2, is a vector derived from a naturally occurring plasmid pCVT2.2, discovered in a sample *Chromobacterium violaceum* CVT2, isolated sample of waters of the downstream Rio Negro, Manaus -AM region. In the plasmid pCVK2 construction there was placed selective marker kanamycin from plasmid pCVT2.2. The *C. violaceum* P1C3 was genetically transformed to kanamycin resistance by plasmid pCVK2 by electroporation with efficiency ranging at  $10^5$  transformantes/ $\mu\text{g}$  of plasmid DNA. It is considered that this recombinant plasmid can be the basis for the development of different molecular cloning vectors using *C. violaceum* as host specie.

## INTRODUÇÃO

A *Chromobacterium violaceum* tipo ATCC 12472 teve seu genoma completo sequenciado pelo Consórcio Brasileiro Projeto Genoma Nacional ([www.brgene.lncc.br](http://www.brgene.lncc.br)) (VASCONCELOS *et al.*, 2003). No entanto, aproximadamente 40% das ORFs encontradas em *C. violaceum* ainda encontram-se classificadas como proteínas hipotéticas, ou seja, as funções bioquímicas e funções biológicas de 40% do patrimônio genético desta espécie ainda permanecem desconhecidas (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Manipulações genéticas são úteis para vários tipos de estudos e aplicações (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Entretanto, as metodologias para a troca de material genético em *C. violaceum* têm sido limitadas a conjugação (DITTA *et al.*, 1980; ALVAREZ-MORALES *et al.*, 1986; OLIVEIRA, 2005). Foi relatado na literatura apenas um trabalho de transformação genética de *C. violaceum* utilizando um plasmídeo com alta gama de hospedeiros (BROETTO *et al.*, 2006).

Plasmídeos bacterianos têm um importante papel na tecnologia DNA recombinante. Segmentos de DNA de diversas origens podem ser retirados com uma endonuclease de restrição apropriada e adicionado a um plasmídeo (HERSHFIELD *et al.*, 1974). Se estas novas moléculas contêm um *replicon* intacto, elas podem ser propagadas num determinado hospedeiro, com a capacidade de produzir quantidades do DNA recombinante e, em alguns casos, produtos de genes específicos (HERSHFIELD *et al.*, 1974).

Plasmídeos que transportam origens de replicação funcionais na *C. violaceum* são essenciais para o desenvolvimento de vetores moleculares para estudos funcionais desta espécie bacteriana. No entanto, a presença de plasmídeos em *C. violaceum*, incluindo a amostra ATCC12472 quando teve seu genoma sequenciado nunca havia sido mostrada, mas estudos desenvolvidos no DNA Laboratório de Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas mostrou presença destes DNAs extracromossômicos em amostras de isolados Amazônicos.

Neste estudo, foi construído um vetor para transformação genética, a partir de um plasmídeo de ocorrência natural em *C. violaceum* isolada nas águas do Rio Negro-Manaus, AM. A partir do plasmídeo pCVK2 poderão ser construídos diversos tipos de vetores para manipulação genética de *C. violaceum* como: Vetores de clonagem, expressão e expressão/secreção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. MATERIAL

#### 1.1.1. Linhagens celulares

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as amostras CVT2 e CVP1C3 de *C. violaceum*, isoladas nas águas do Rio Negro-Manaus em um porto próximo do Tropical Hotel Manaus e próximo à ponte Rio Negro, respectivamente.

As amostras encontravam-se preservadas em meio LB- *Soft* no Laboratório de Tecnologia do DNA da Universidade Federal do Amazonas. A amostra *C. violaceum* CVT2 foi utilizada para isolamento de plasmídeos naturais, enquanto que a amostra *C. violaceum* CVP1C3, que não possui plasmídeos, foi utilizada como hospedeira para procedimento de transformação genética.

A amostra DH10B de *E. coli* (F<sup>-</sup> endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL  $\Delta$ lacX74  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 araD139  $\Delta$ (ara,leu)7697 mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\lambda$ <sup>-</sup> - resistente a estreptomicina, foi escolhida para o experimento, pois é uma célula tradicionalmente usada em estudos de eletroporação.

#### 1.1.2. Plasmídeos

Para a construção do vetor de transformação genética foram utilizados o plasmídeo natural pCVT2.2, isolado da amostra *C. violaceum* CVT2 e o plasmídeo pLK<sub>n</sub>, gentilmente decido pelo professor Fernando Araripe Gonçalves Torres do Laboratório de Biotecnologia de leveduras/UNB, como doador do marcador seletivo, o gene canamicina, já que, a bactéria hospedeira possui sensibilidade a este antibiótico.

O plasmídeo pLK<sub>n</sub> é derivado do plasmídeo pblunt zero da Invitrogen<sup>TM</sup> com o gene de resistência a canamicina acompanhado pelos sítios de loxP em suas extremidades (comunicação pessoal-prof. Fernando Araripe).

## 1.2. MÉTODOS

### 1.2.1. Antibiógrama das amostras *C. violaceum*

Para a construção do vetor de clonagem molecular a partir do plasmídeo natural pCVT2.2 foi realizada inicialmente uma seleção quanto à resistência/sensibilidade a antibióticos da amostra *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3 com o uso do kit Multidiscos de Antibióticos (LABORCLIN) para bactérias Gram negativas, conforme a técnica de Kirby & Bauer (BAUER *et al.*, 1966) para a determinação do antibiótico a ser utilizado como marcador seletivo.

Paralelamente, foram testados os antibióticos canamicina e estreptomicina, os quais não estão disponíveis no kit Multidiscos de Antibióticos (LABORCLIN).

A resistência/sensibilidade aos antibióticos canamicina e estreptomicina foi determinada através da técnica de esgotamento de cultura em placa de Petri contendo os respectivos antibióticos. Para os experimentos com o antibiótico canamicina foram utilizados três concentrações (10-25-50µg/mL) e os experimentos com estreptomicina as concentrações 10, 25 e 50 µg/mL Após 16 horas de incubação à 30°C, a resistência/sensibilidade foi definida com a menor concentração da droga que inibe totalmente o crescimento de clones.

### 1.2.2. Construção de um vetor para transformação genética

Utilizando a sequência do plasmídeo natural de *C. violaceum* CVT2 denominado de pCVT2.2 foi construído um vetor capaz de se replicar de forma eficiente na *C. violaceum*. Primeiramente, foi realizada a escolha da marca de seleção, gene canamicina, de acordo com a sensibilidade a esse antibiótico pelas amostras de *C. violaceum*. O procedimento para a seleção se encontra descrito no item 1.2.1. Posteriormente, o gene codificador da marca de seleção canamicina foi obtido do plasmídeo pLKn. A **Figura 16** mostra o esquema de como foi feita a construção do vetor de clonagem molecular pCVK2.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

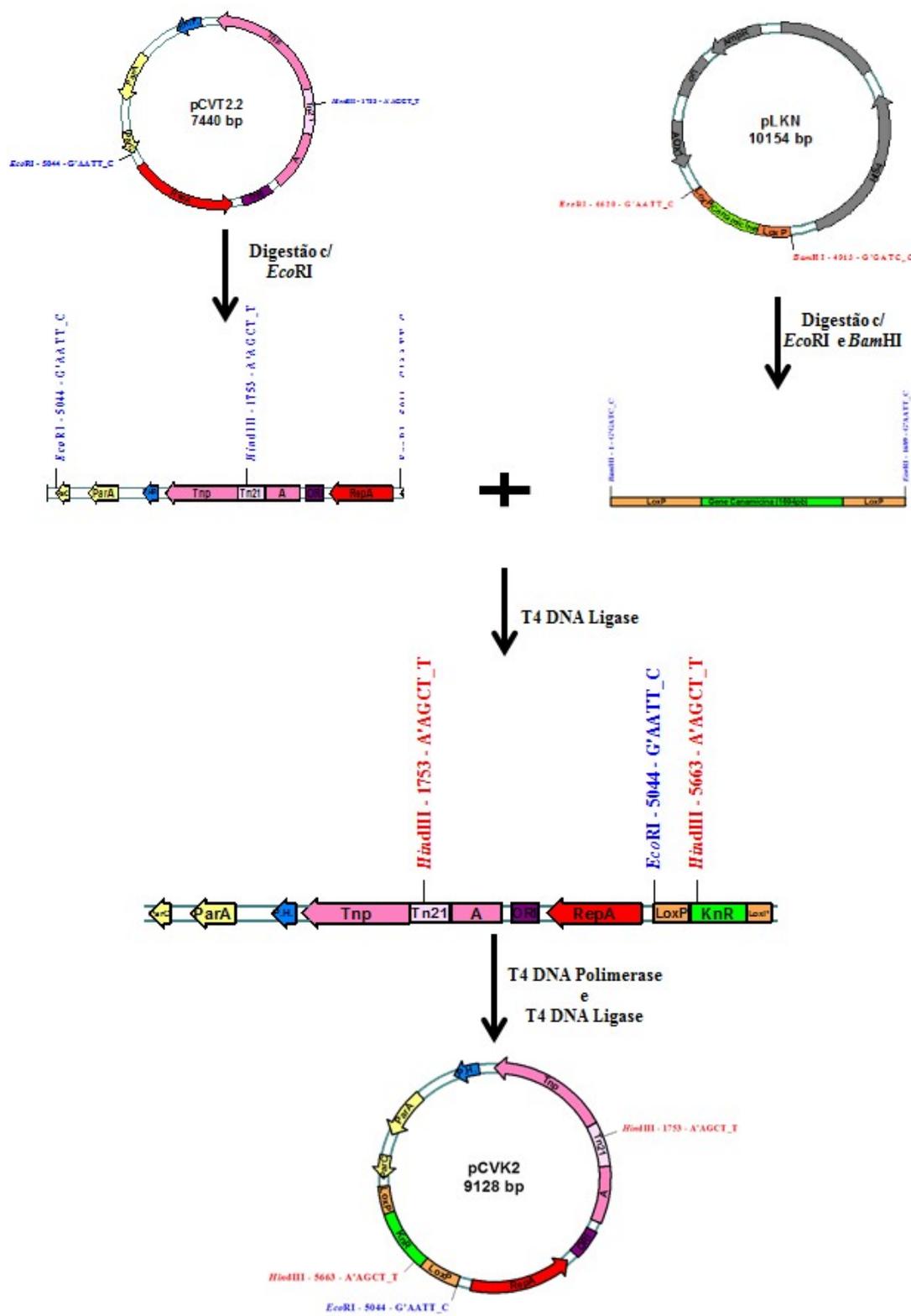


Figura 16 Esquema da construção do pCVK2.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

### **1.2.2.1. Extração do DNA plasmidial**

O DNA plasmidial pCVT2.2 da amostra *C. violaceum* CVT2 foi purificado de acordo com protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook, *et al.* (1989) com algumas modificações (ANEXO B-1).

Para a purificação do pLKn a partir de *E. coli* foi utilizado o protocolo em pequena escala (Mini-Prep) com o kit “ilustra plasmidPrep™ Mini Spin Kit” (GE Healthcare) que tem como base o protocolo de lise alcalina (ANEXO B-2).

#### **1.2.2.1.1. Quantificação de DNA**

A concentração do DNA plasmidial extraído foi quantificado por espectrofotometria em 260/280nm considerando que 1Uabs 260/mL corresponde a 50µg/mL de DNA.

#### **1.2.2.2. Isolamento do gene de resistência a canamicina e do plasmídeo pCVT2.2**

Para o isolamento do gene canamicina, foi realizada clivagem da sequência do vetor pLKn com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI*, que estrategicamente, estão localizados nas extremidades do gene canamicina. Após a liberação do gene canamicina, foi realizada uma corrida eletroforética, em gel de agarose 0,8%, para a separação do fragmento. Em seguida, a região do gel contendo o fragmento alvo foi cortada e utilizou-se o marcador da Invitrogen de massa molecular de 1 kb como parâmetro de comparação do tamanho do gene. O fragmento referente ao gene de resistência foi então submetido à eluição do gel de agarose conforme orientações do fabricante para protocolo de extração de DNA em gel de agarose (Qiagen – QIAquick Gel Extraction Kit Protocol).

O plasmídeo pCVT2.2 separado dos outros plasmídeos naturais de *C. violaceum* CVT2 por eletroforese em gel de agarose e isolado através da purificação de acordo com o protocolo de extração de DNA de gel (Qiagen – QIAquick Gel Extraction Kit Protocol). Posteriormente, foi utilizada a endonuclease *EcoRI* para clivar a sequência do plasmídeo

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

pCVT2.2 linearizando-o e assim, permitir sua ligação ao marcador seletivo, o gene de resistência a canamicina.

### **1.2.2.3. Ligação do gene Canamicina no plasmídeo pCVT2.2**

A extremidade do gene de resistência a canamicina, formada pelo corte com a endonuclease *EcoRI* foi ligada à extremidade do plasmídeo pCVT2.2 através da enzima T4 DNA ligase. Após a ligação no sítio de *EcoRI*, o sistema de ligação foi tratado com a enzima T4 DNA Polimerase para tornar a sequência das extremidades livres do gene e do plasmídeo *blunt end* possibilitando a ligação delas pela ação da DNA ligase, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Essa ação resultou no novo plasmídeo denominado pCVK2. A funcionalidade do vetor de clonagem molecular, pCVK2, foi testado inicialmente em *E. coli*.

### **1.2.3. Transformação genética de *C. violaceum***

A transformação genética de *C. violaceum* P1C3 com o vetor pCVK2 foi realizada pelo método de eletroporação, de acordo protocolo estabelecido por Broetto *et al.*, 2006, com algumas modificações.

Para realizar a transformação das bactérias por eletroporação, estas precisam ser submetidas a um processo que as torne competentes para receber as moléculas de DNA.

No dia anterior ao experimento de eletroporação, uma colônia de *C. violaceum* foi colocada em meio LB sem antibiótico, para crescer durante a noite, a 30 °C, com agitação a 180 rpm.

As células foram cultivadas inoculando-se 0,2 ml do pré inóculo em 50 ml de meio LB, e cultivadas a 30 °C com agitação por, aproximadamente, 3 horas até que a cultura atingisse a densidade óptica em 600nm (DO 600nm) de 0,4. Essa etapa é importante para que todos os experimentos sejam realizados a partir da mesma concentração de bactérias. Em seguida, a cultura de bactérias foi transferida para um tubo tipo Falcon e esfriada até 0 °C, colocando o tubo no gelo por 15 minutos. Após essa etapa, as células foram centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em glicerol 15%, estéril e gelado. As células foram centrifugadas sucessivamente até que fossem realizadas 3

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

lavagens, e o sedimento celular final foi ressuspensão em 1mL de glicerol 10% gelado. Essa suspensão foi distribuída em alíquotas de 100 µL, as quais foram utilizadas para os experimentos de eletroporação no mesmo dia.

Para os experimentos de eletroporação, foi utilizado um pulso único de 1900V. Para realizar a eletroporação utilizando o campo descrito acima, foram utilizadas amostras contendo 100µL de células *C. violaceum* competentes e várias concentrações do DNA plasmidial (10-200 ng/µL). Para os controles negativos foram utilizados: células de *C. violaceum* eletroporadas sem DNA plasmidial e células de *C. violaceum* não eletroporadas e sem plasmídeo, com e sem canamicina.

Após a aplicação dos pulsos elétricos, as amostras dos experimentos foram imediatamente transferidas para tubos estéreis contendo 300µL de LB e incubadas a 30 °C com agitação durante 2 horas. Após esta etapa de recuperação celular, as bactérias foram cultivadas em placas com meio LB seletivo (contendo canamicina a 10µg/ mL) a 30 °C durante 16 h para selecionar as células que foram transformadas geneticamente.

Os experimentos de eletroporação (Figura 26) foram acompanhados dos seguintes controles:

1. Viabilidade celular após a eletroporação, e
2. Funcionalidade do antibiótico.

A eficiência da eletroporação foi determinada pelo número de colônias transformantes por sistema de transformação por µg de DNA, ou seja, colônias formadas por bactérias que receberam os plasmídeos e, portanto cresceram formando colônias em placas com canamicina. O mesmo procedimento foi certificado quando procedeu-se a transformação genética de *C. violaceum* P1C3 para resistência a estreptomicina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do Vale (2006) isolou uma amostra de *C. violaceum* denominada CVT2 a partir das águas coletadas na região do Baixo Rio Negro - Manaus sendo que nesta, foram observados perfis de três plasmídeos distintos. Estes plasmídeos denominados de pCVT2.1 com cerca de 26kb, pCVT2.2 com cerca de 7.5kb e pCVT2.3 com cerca de 3kb foram sequenciados e suas sequências parcialmente caracterizadas (CAPÍTULO II). No presente trabalho, a sequência do plasmídeo pCVT2.2 serviu de base para a construção do primeiro vetor de clonagem molecular para transformação genética de *C. violaceum* derivado de um plasmídeo natural dessa espécie bacteriana.

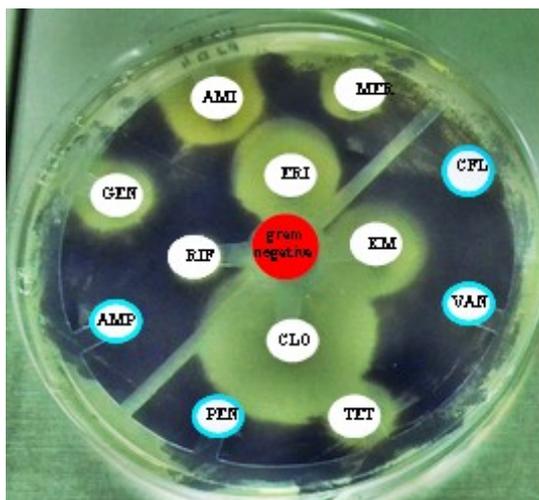
### 2.1. Seleção do marcador genético

Uma marca seletiva em um vetor de clonagem molecular é necessária para identificar os clones transformados, permitindo a manutenção estável do plasmídeo dentro da célula hospedeira se uma pressão de seleção for imposta. Genes que conferem resistência a antibióticos são marcadores comumente usados. Tais genes são inseridos nos plasmídeos e os vetores resultantes são usados para transformação genética. Meios de cultura seletivos contendo antibióticos são usados para eliminar células livres de plasmídeos enquanto mantém as células transformadas (JIMINEZ & DAVIES, 1980).

Uma vez que o marcador seletivo é de grande importância para um vetor de clonagem molecular, as amostras de *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3 foram primeiramente submetidas ao teste de sensibilidade/resistência a antibióticos.

As amostras CVT2 e CVP1C3 de *C. violaceum* mostraram-se ser resistentes aos antibióticos: amoxicilina+clavulanato, meropenem, ceftazidima, cefoxitina, cefalotina, ampicilina, cefepime, cefuroxima, clindamicina, oxacilina, penicilina G, e vancomicina, e mostraram sensibilidade aos antibióticos, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, amicacina, sulfazotrin, ciprofloxacina e tetraciclina. Esses resultados estão mostrados na tabela 9 e figura 17. Os resultados obtidos neste antibiograma são comparáveis aos recentemente descritos por Mendes, 2010.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 17** Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade aos antibióticos em *C. violaceum* CVP1C3. Placa de Petri contendo meio LB, *Chromobacterium violaceum* e os discos contendo os antibióticos, respectivamente. Os perfis destacados em azul são de resistência: a ampicilina (AMP), clindamicina (CFL), penicilina G (PEN) e vancomicina (VAN) e, os destacados de branco são sensíveis aos antibióticos, gentamicina (GEN), canamicina (KM), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), amicacina (AMI), sulfazotrin (SUT) e tetraciclina (TET).

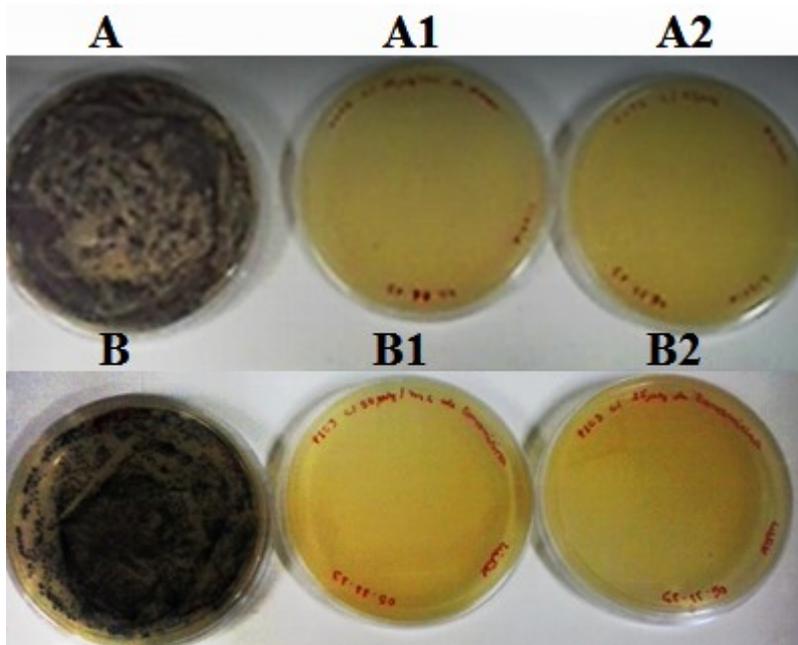
**Tabela 9:** Perfil de resistência/sensibilidade das amostras CVT2 e CVP1C3 de *C. violaceum* coletadas no Rio Negro próximo a ponte Rio Negro.

Antibiótico	CVT2	P1C3
TET	-	-
CLO	-	-
ERI	-	-
PEN	+	+
VAN	+	+
GEN10	-	-
AMI30	-	-
CFL30	+	+
AMP10	+	+
MER10	-	-
KM	-	-

\*(+) resistência ao antibiótico; (-) sensibilidade ao antibiótico.

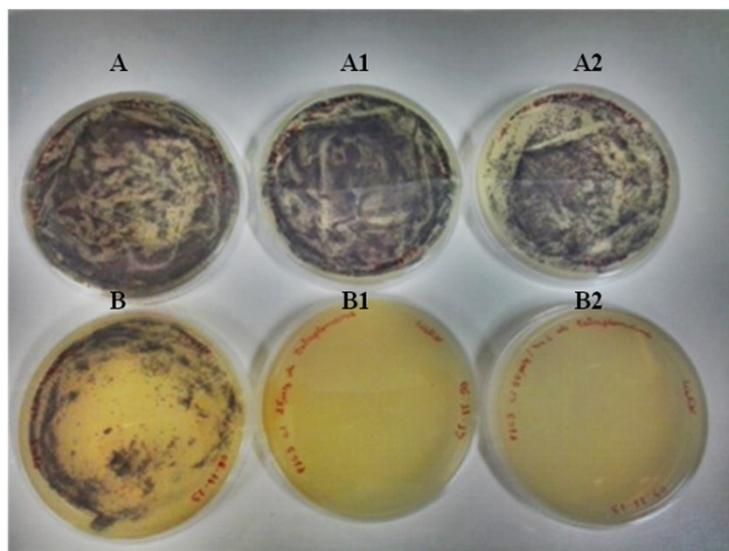
Testes realizados com as amostras de *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3, resistentes a penicilina-G, ampicilina, oxacilina, gentamicina e a vancomicina, mostraram sensibilidade ao antibiótico canamicina em todas as concentrações analisadas neste estudo (**Figura 18**).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 18** Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade ao antibiótico canamicina em *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3. Placa de Petri contendo meio LB + canamicina e *C. violaceum*. A - amostra CVT2, sem antibiótico; A1 - CVT2, com 10 $\mu$ g/ mL de canamicina; A2 - CVT2, com 25 $\mu$ g/ mL de canamicina. B - amostra CVP1C3, sem antibiótico; B1 - CVP1C3, com 10 $\mu$ g/ mL de canamicina; B2 - CVP1C3, com 25 $\mu$ g/ mL de canamicina.

O antibiótico estreptomicina mostrou ação inibitória na amostra *C. violaceum* CVP1C3. Entretanto, o resultado não foi o mesmo quando testado na amostra *C. violaceum* CVT2 que se mostrou resistente ao antibiótico (**Figura 19**). O resultado obtido na análise de resistência/sensibilidade de *C. violaceum* CVP1C3 ao antibiótico estreptomicina corresponde ao resultado descrito por Oliveira, 2009, utilizando a amostra de *C. violaceum* ATCC 12472.



**Figura 19** Fotografia do perfil de resistência/sensibilidade ao antibiótico estreptomicina em *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3. Placa de Petri contendo meio LB + estreptomicina e *C. violaceum*. A- amostra CVT2, sem antibiótico; A1- CVT2, com 25 $\mu$ g/ mL de estreptomicina; A2- CVT2, com 50 $\mu$ g/ mL de estreptomicina. B- amostra CVP1C3, sem antibiótico; B1- CVP1C3, com 25 $\mu$ g/ mL de estreptomicina; B2- CVP1C3, com 50 $\mu$ g/ mL de estreptomicina.

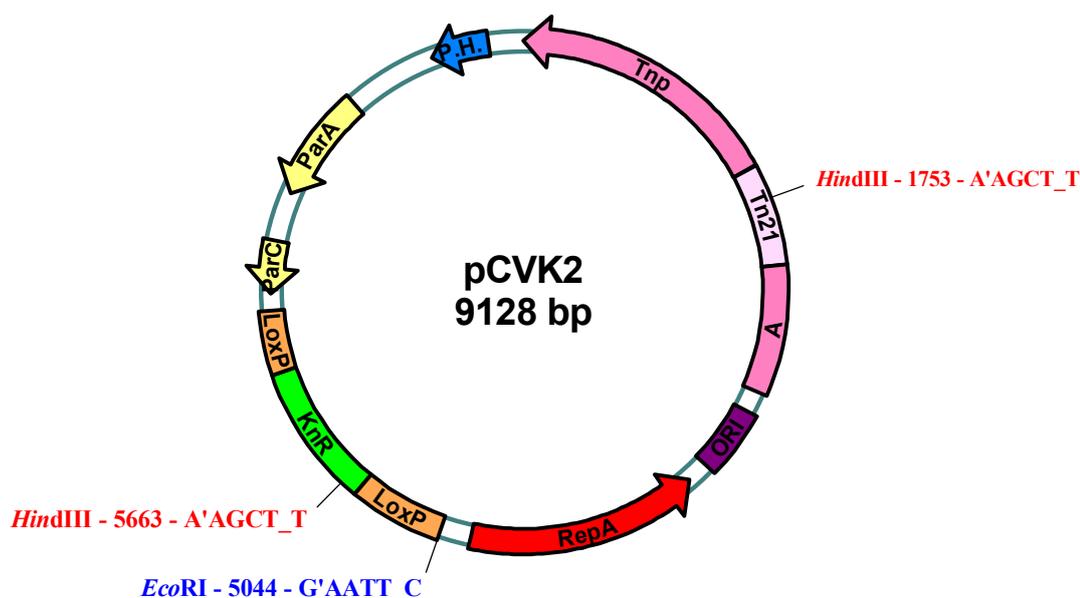
LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

A capacidade dos isolados de *C. violaceum* crescerem na presença de alguns antibióticos aqui analisados pode estar associada a presença de pelo menos 40 genes encontrados no seu genoma e que estão envolvidos com sistemas de resistência a múltiplas drogas (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004). Contudo, o resultado de resistência a estreptomicina pela amostra CVT2 é devido a presença do elemento móvel, similar ao Tn21 de *E. coli* que contém o gene de resistência a estreptomicina, na sequência do plasmídeo pCVT2.2 desta bactéria (resultado apresentado no capítulo II).

Diante desses resultados, o gene de resistência a canamicina foi escolhido como marcador seletivo para o novo vetor de clonagem molecular, uma vez que, as células de *C. violaceum* são sensíveis a canamicina.

## 2.2. Construção do vetor de clonagem molecular pCVK2 a partir de um plasmídeo natural de *C. violaceum*

A clonagem, no plasmídeo pCVT2.2, do fragmento de cerca de 1,6kb contendo o gene de resistência a canamicina, possibilitou a construção do vetor pCVK2, conforme mostrado na figura 20.



**Figura 20** Mapa físico do plasmídeo pCVK2. Em vermelho encontra-se um gene codificador para a enzima replicase (Rep); Amarelo, três genes codificadores das proteínas do sistema de partição (ParA e ParC); rosa, um gene transposase (*TnpA*), elemento móvel (Tn21) e, lilás, provável origem de replicação (Ori); Em verde, o gene Canamicina (KanR).

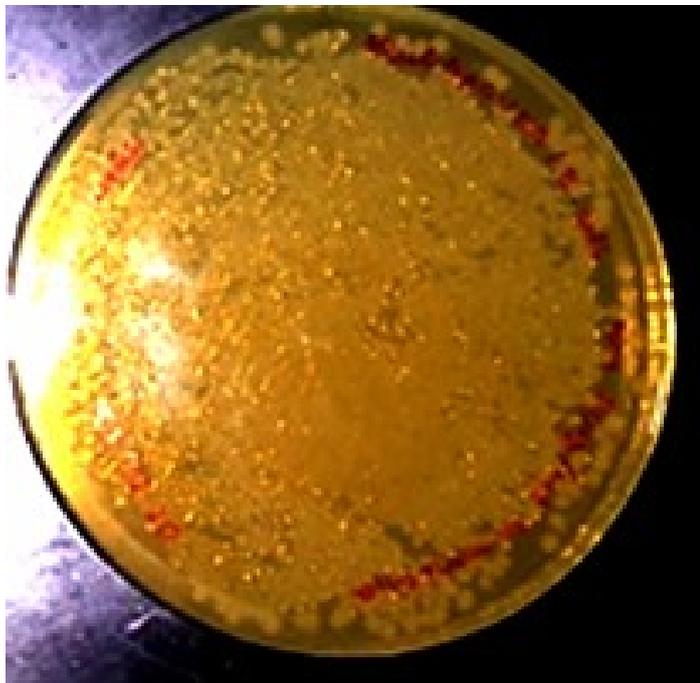
LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

O fato do plasmídeo conter o sistema de partição ParA/ParC indica que ele pode ter considerável estabilidade em *C. violaceum* e em *E. coli*.

Por outro lado, a presença da origem de replicação tipo  $\theta$  similar ao plasmídeo R1 onde em sua sequência possui vários sítios de metilação Dam, e que estão presentes também na origem de replicação do cromossomo de *Escherichia coli*, oriC conforme descrito por Del Solar 1988 pode explicar a capacidade de replicação em *E. coli*.

### 2.2.1. Transformação genética de *Escherichia coli* com o plasmídeo pCVK2

A transformação genética de *E. coli* DH10B com o plasmídeo pCVK2, utilizando a metodologia de eletroporação, seguida da inoculação dessas células transformadas em meio de cultura sólido contendo 10 $\mu$ g/mL de canamicina, permitiu observar o aparecimento de colônias canamicina resistentes (**Figura 21**).



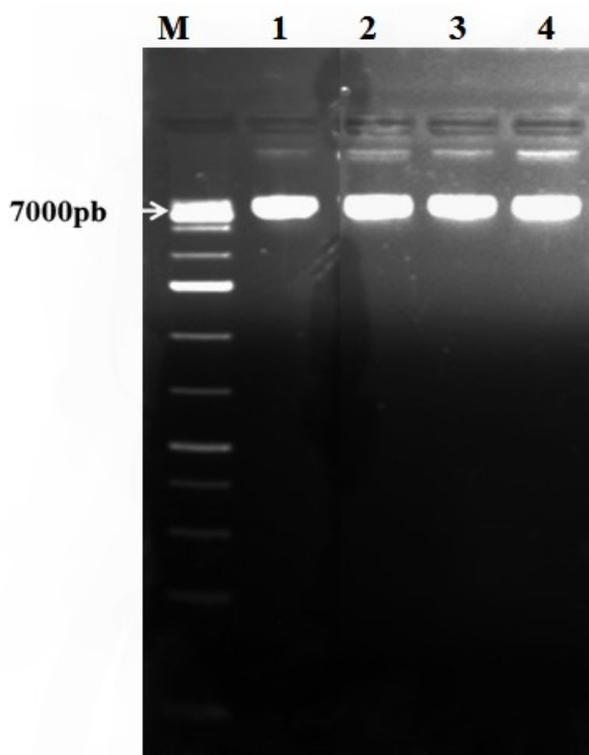
**Figura 21** Fotografia mostrando os clones transformantes de *E. coli* cultivados na presença de canamicina. Placa contendo clones de *E. coli* transformados com o plasmídeo pCVK2 na presença do antibiótico canamicina 10 $\mu$ g/mL.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

Nas placas contendo meio de cultura acrescido de canamicina plaqueadas com célula de *C. violaceum* inoculadas, não foi observado o crescimento de nenhuma colônia.

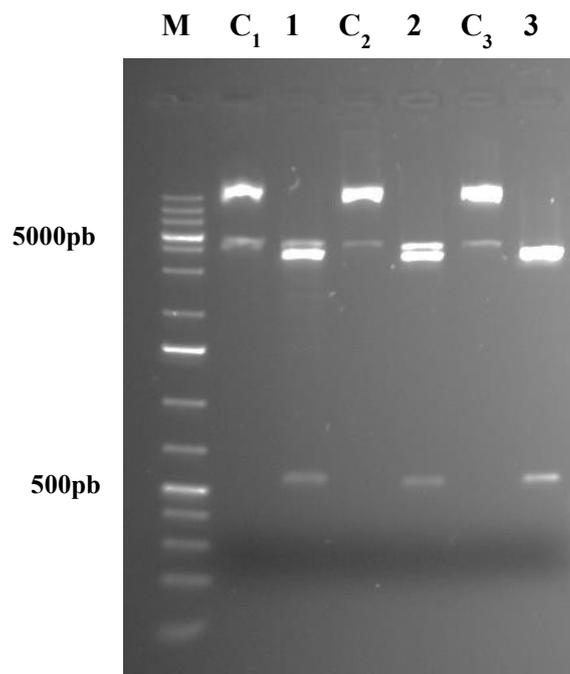
Para confirmar a clonagem molecular, foram selecionados 4 clones para que seus plasmídeos fossem extraídos (**Figura 22**) e clivados com as endonucleases *EcoRI* e *HindIII*. Como esperado, o resultado foi à liberação três fragmentos com os tamanhos de 4,5kb, 4,3kb e 600pb (**Figura 23**).

A julgar pela forte fluorescência das amostras extraídas podemos inferir que o plasmídeo pCVK2 deve está na forma multicópias na hospedeira *E. coli*.



**Figura 22** Fotografia do DNA plasmidial, pCVK2, extraídos de *E. coli*. M: Marcador DNA do fago  $\lambda$  1kb ladder da Invitrogen. No poço 1 a 4 correspondem às amostras de DNA plasmidial purificadas de quatro diferentes clones transformantes.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 23** Perfil de restrição do plasmídeo pCVK2 com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. M - marcador de peso molecular 1kb da Invitrogen, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>- controles negativos da clivagem molecular, 1 a 3 - plasmídeos digeridos com as endonucleases *EcoRI* e *HindIII*.

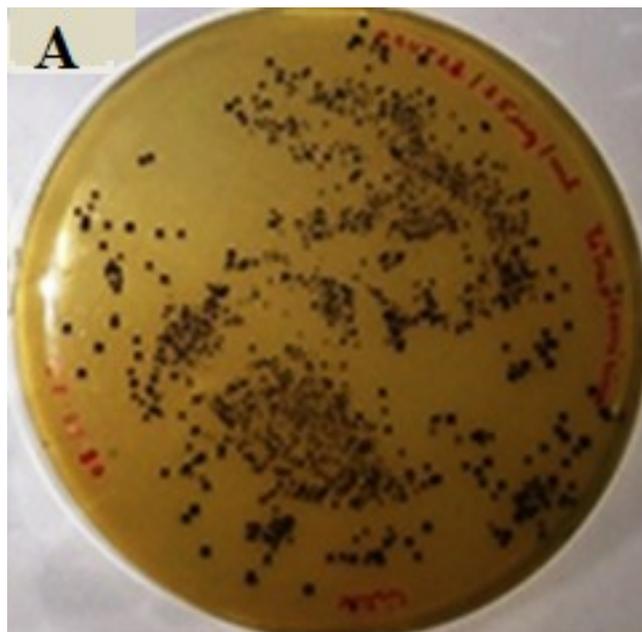
### 2.3. Transformação genética de *C. violaceum* CVP1C3

Como se identificou o gene da estreptomicina no plasmídeo pCVT2.2, decidiu-se verificar se esse plasmídeo seria capaz de por si só transformar geneticamente *C. violaceum* para resistência a estreptomicina.

#### 2.3.1. Transformação genética com o plasmídeo pCVT2.2 para resistência a estreptomicina

A *C. violaceum* foi submetida a transformação genética com o Plasmídeo pCVT2.2 afim de comprovar a presença do gene de resistência a estreptomicina na sequencia desse plasmídeo. A transformação genética de P1C3 foi realizada utilizando a metodologia de eletroporação, seguida da seleção através do plaqueamento em meio sólido contendo 25 µg/mL de estreptomicina, permitiu observar, a partir de 18 horas de incubação, o aparecimento de colônias resistentes a estreptomicina (**Figura 24**).

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

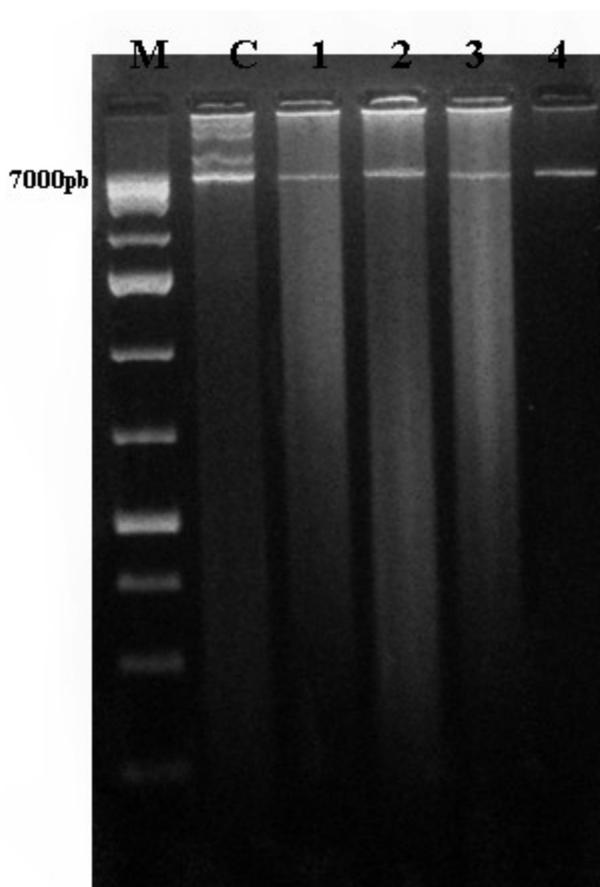


**Figura 24** Fotografia mostrando os clones transformantes de *C. violaceum* P1C3 crescidos na presença de estreptomicina. A - placa de controle 1 (sem a presença do plasmídeo pCVT2.2 e da estreptomicina), A - placa contendo clones de *C. violaceum* transformadas com os plasmídeos pCVT2.2 na presença do antibiótico estreptomicina 25µg/mL.

Em todos os experimentos realizados, os controles da viabilidade e de funcionalidade do antibiótico após a transformação genética funcionaram conforme o esperado. Nas placas correspondentes aos controles da eletroporação, sem estreptomicina e ausência de plasmídeos, cresceram bactérias por toda a extensão das placas sem que houvesse formação definida de colônias. Nas placas correspondentes aos controles da efetividade do antibiótico, com estreptomicina e ausência de plasmídeos, não foi observado o crescimento de colônias.

Para o plasmídeo pCVT2.2 isolado de CVT2, o rendimento foi de  $4 \times 10^5$  transformantes/µg de DNA plasmidial. Assim, foi possível comprovar a existência do gene de resistência a estreptomicina, no elemento móvel contido na sequência do plasmídeo pCVT2.2 (Figura 25). No contexto de caracterização dos plasmídeos naturais de *C. violaceum* (CAPÍTULO 2) esse resultado demonstra que o contig 2 corresponde realmente ao plasmídeo pCVT2.2.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 25** Perfil eletroforético do DNA plasmidial, pCVT2.2, extraídos de *C. violaceum*. M: Marcador DNA do fago  $\lambda$  1kb ladder da Invitrogen. Os poços 1 e 4 correspondem ao plasmídeo pCVT2.2 extraído de *C. violaceum* CVT2.

### 2.3.2. Transformação genética de *C. violaceum* com o plasmídeo pCVK2 para resistência a canamicina

Nos experimentos de eletroporação, as bactérias *C. violaceum* foram eficientemente transformadas geneticamente por eletroporação. Foi observado, o aparecimento de colônias recombinantes  $\text{Kn}^{\text{R}}$  e a produção de violaceína com 48h a 30°C (**Figura 26**).

Em todos os experimentos realizados, os controles funcionaram conforme o esperado. Nas placas correspondentes aos controles da eletroporação, sem canamicina e ausência de plasmídeos, cresceram bactérias por toda a extensão das placas sem que houvesse formação de colônias. Nas placas correspondentes aos controles da

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

eletroporação, com canamicina e ausência de plasmídeos, não foi observado o crescimento de colônia.

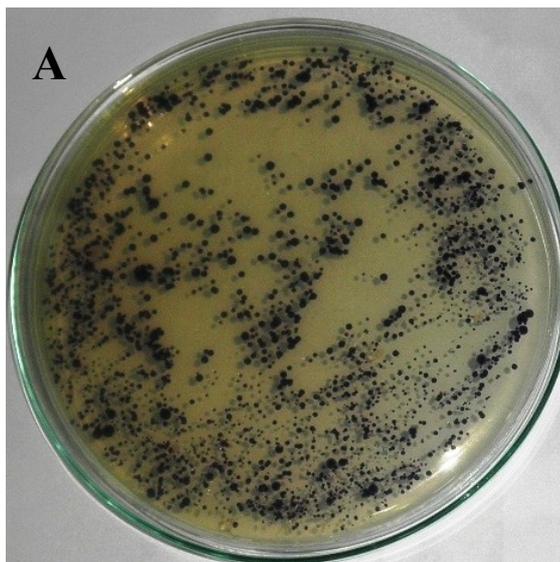
O rendimento da transformação genética em função de diferentes concentrações do plasmídeo mostrou que, a concentração de 1ng/ $\mu$ L do DNA plasmidial foi que obteve o melhor resultado, com a eficiência de  $1,7 \times 10^5$  transformantes/ $\mu$ g de DNA plasmidial. O resultado da eficiência de transformação em diferentes concentrações de plasmídeos pode ser observado na Tabela 10.

A transformação genética, no sistema definido nesse trabalho, mantém a eficiência da ordem de  $10^5$  transformantes/ $\mu$ g DNA nas quantidades de DNA plasmidial variando de 0,1ng a 10ng, enquanto que, quantidades superiores a 10ng a eficiência cai indicando que ocorre saturação do sistema.

**Tabela 10: Resultado da clonagem, mostrando números de colônias de *C. violaceum* P1C3 transformadas por sistema de transformação.**

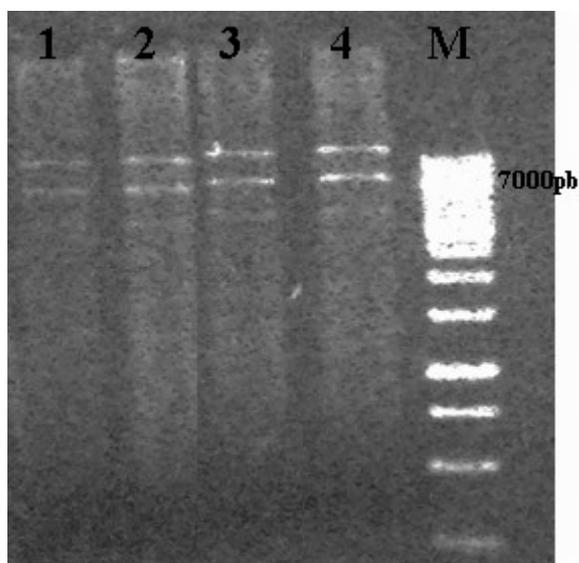
Plasmídeo recombinante	Quantidade de DNA plasmidial (ng)	Número de transformantes T/ $\mu$ g de DNA
pCVK2	0,1	$4,1 \times 10^6$
	1	$2,1 \times 10^6$
	5	$2,3 \times 10^6$
	10	$2,1 \times 10^6$
	50	$1,5 \times 10^5$
	200	$1,8 \times 10^4$

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.



**Figura 26** Fotografia mostrando os clones transformantes de *C. violaceum* crescidos na presença de canamicina. A - placa contendo clones de *C. violaceum* transformadas com o plasmídeo pCVK2 na presença do antibiótico canamicina 10 $\mu$ g/mL.

Para confirmar a transformação genética, foram selecionados 6 clones para que seus plasmídeos fossem extraídos (**Figura 27**).



**Figura 27** Fotografia do DNA plasmidial, pCVK2, extraído de *C. violaceum* P1C3. M: Marcador DNA do fago  $\lambda$  1kb ladder da Invitrogen. No poço 1 a 4 correspondem às amostras de DNA plasmidial purificadas de quatro diferentes clones transformantes.

A julgar pela fluorescência das amostras extraídas a partir de *C. violaceum* e *E. coli* (Figuras 22 e 27) pode-se inferir que o plasmídeo pCVK2 se mantém com número bem menor de cópias por célula em *C. violaceum* do que em *E. coli* DH10b. Essa é uma boa característica de um vetor bifuncional (Shuttle vector) onde se pode produzir grande quantidade de DNA em uma hospedeira (*E. coli*) e realizar as construções genéticas e então transformar geneticamente a outra hospedeira (*C. violaceum*) visando por exemplo a expressão de um gene heterólogo.

A eficiência de transformação genética obtida nesse trabalho com plasmídeo derivado de um plasmídeo natural de *C. violaceum* é equivalente a descrita por Broetto e colaboradores (2006) quando transformaram geneticamente *C. violaceum* ATCC por eletroporação utilizando o plasmídeo binário pPZP201BK e que possui uma origem de replicação para *E. coli* e outra para *Agrobacterium tumefaciens*, com a eficiência de  $10^5$  transformantes / ug de DNA plasmidial.

Pelo exposto considera-se que o pCVK2 sirva de base para o desenvolvimento de diferentes tipos de vetores para *C. violaceum*, como: de clonagem, caça promotores, de expressão e expressão/secreção.

Tendo sido concluído o projeto genoma da *C. violaceum* e estando sua sequência disponível, uma das limitações atuais para estudos genéticos funcionais é a falta de procedimentos eficazes para transformação genética dessa espécie bacteriana. Nesse trabalho foi possível mostrar que o pCVK2 derivado de um plasmídeo natural de *C. violaceum* CVT2 foi capaz de transformar geneticamente com eficiência essa espécie bacteriana, isso nos permitirá realizar análises funcionais mais detalhadas de seus genes e visualizar as propriedades biotecnológicas desta versátil bactéria.

## CONCLUSÕES

- As amostras *C. violaceum* CVT2 e CVP1C3 isoladas do Rio Negro se mostraram resistentes aos antibióticos clindamicina, oxacilina, penicilina G, e vancomicina e, mostraram sensibilidades aos antibióticos, gentamicina, canamicina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, amicacina, sulfazotrin, ciprofloxacina e tetraciclina;
- O plasmídeo pCVK2, construído, transformou eficientemente células de *E. coli* DH10b.
- Foi possível desenvolver um sistema de transformação genética para *C. violaceum* CVP1C3 com o plasmídeo pCVK2 com eficiência de transformação genética da ordem de  $10^5$ /  $\mu\text{g}$  de DNA para resistência a canamicina.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-MORALES A, BETANCOURT-ALVAREZ M, KALUZA K, HENNECKE H., 1986. Activation of the *Bradyrhizobium japonicum* nifH and nifDK operons is dependent on promoter-upstream DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:4207–4227.
- ALTSCHUL,S.F., Madden, T.L.; Shaffer, A.A.;Zhang, J.;Zhang, Z.;Miller, W.& Lipman,D.J. (1997) “Gapped Blast and PST-Blast: a new generation of protein database search programs”. *Nucleic Acids Res.* v. 25, p. 3389-3402.
- BAUER, A. W., KIRBY, M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology.* V. 45, n.4, p. 493-496.
- BROETTO, L; et al. 2006. Stable transformation of *Chromobacterium violaceum* with a broad-host-range plasmid, applied genetics and molecular biotechnology. Porto Alegre, p.1-5.
- DITTA G, STANFIELD S, CORBIN D, HELINSKI D.R., 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7347–7351.
- FANTINATTI-GARBOGGINI F, ALMEIDA R, PORTILLO VA, BARBOSA TAP, TREVILATO PB, NETO CER, COELHO RD, SILVA DW, BARTOLETI LA, HANNA ES, BROCCHI M, MANFIO GP 2004. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res* 3: 134-147.
- GRANGEIRO, T.B., JORGE, D.M.M., BEZERRA, W.M., VASCONCELOS, A.T.R. E SIMPSON, A.J.G. 2004. Transport genes of *Chromobacterium violaceum*:na overview. *Genet. Mol. Res.* v.3(1): 117-133.
- HERSHFIELD, V., BOYER, H.W., YANOFSKY, C., LOVETT, M.A., AND HELINSKI, D.R. 1974. Plasmid ColE1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 71: 3455-3459.
- JIMENEZ A, DAVIES J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature.* v.30;287(5785):869–871.

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

MENDES, R.C. 2010. Caracterização Fenotípica e Genotípica de cepas de *Chromobacterium violaceum* isolados no Estado do Ceará. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, 69p.

OLIVEIRA, C.G., ANTÔNIO, R.V., PORTO, L.M., 2009. *Chromobacterium violaceum* ATCC12472: Multi-drug and ethidium bromide resistant. Nature Precedings 3366.1.

OLIVEIRA, C.G. 2005 Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia química da Universidade Federal de Santa Catarina, 159p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T., 1989. .Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Section XII. Second edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

SAMBROOK J, RUSSEL D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. v.74(12):5463-7.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. v.15;25(24):4876-82.

VALE, R. B. N. T., 2006. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Chromobacterium violaceum*. RELATÓRIO enviado ao CNPq. 20p.

VASCONCELOS, A. T. R., SIMPSON, J. G. e diversos colaboradores. , 2003. “The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability”. PNAS (USA) 100 (20): 116660-11665.

## **ANEXOS**

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

## **ANEXO A: Materiais utilizados**

### **Anexo A. 1: Composição do meio para cultivo de bactérias**

- **Meio LB (Luria-Bertani) Líquido:** peptona bacteriológica 10g; extrato de levedura 5g; NaCl 10g; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1L, pH 7.5 (ajustado com NaOH).

### **Anexo A. 2: Lista das endonucleases de restrição**

-HindIII  
-BamHI  
-EcoRI

- **T4 DNA ligase (NEB# M0202S):** enzima de ligação de cadeias nucleotídicas

- **RNaseOUT (Invitrogen):** enzima inibidora de RNase.

### **Anexo A. 3: Marcador padrão de peso e tamanho molecular**

- **DNA Marker 1Kb (GeneRuler™):** marcador de tamanho molecular de DNA

### **Anexo A. 4: Kits comerciais**

- **ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®):** kit para extração de DNA plasmidial em pequena (miniprep) escala de *E. coli*.

- **ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).**

### **Anexo A. 5: Soluções de uso geral**

- **Tampão TE:** Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH8,0.

- **SDS 10%:** SDS 10% (v/v).

- **Tampão R:** Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 7,5.

### **Anexo A. 6: Composição do gel de agarose**

- **Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TBE) 5X:** Tris-Base 0.089 M; Ácido Bórico 0.089 M; EDTA 0,02 M, pH 8,0.

- **Tampão de Carreamento da Amostra para Gel de Agarose:** Azul de Bromofenol 0,25% (p/v); Xileno Cianol 0,25% (p/v); Glicerol em H<sub>2</sub>O 30%.

## **ANEXO B: Protocolos**

### **Anexo B. 1: Protocolo de extração plasmidial por lise alcalina**

1. Inocular colônias da bactéria 3mL de meio LB-líquido e deixar crescer durante cerca de 16 horas a 37°C para procedimento da extração plasmidial;
2. Centrifugar a cultura bacteriana crescida por 2 minuto a 12.000rpm descartando o sobrenadante;
3. Adicionar a cada pellet 200µL de solução I ressuspensão-a vigorosamente e depois incubar por 5 minutos;
4. Adicionar 360 µL de solução II (preparada na hora) e gentilmente inverter o tubo e deixar incubado por 5 minutos;
5. Colocar em seguida 300 µL de solução III e novamente inverte gentilmente os tubos e deixar incubando no gelo por 5 minutos e depois centrifugar por 5 minutos a 12000rpm.  
  
PS: Ser for necessário repetir o passo da centrifugação, os sobrenadantes serão transferidos novamente para novos microtubos.
6. Adicionar em 750 µL de isopropanol e incubando por 10 minutos mexendo em vez em quando;
7. Centrifugar por 10 minutos descartando o sobrenadante posteriormente.
8. Adicionar 1mL de Etanol 70% e centrifugar por 5 minutos posteriormente descartando o sobrenadante e deixando por um tempo secando para tirar todo o álcool.
9. Ressuspender em 50 µL de Tampão R e depois aplicará 5 µL no gel de agarose 0,8% e fotodocumeta-lo.

## **Anexo B. 2 Preparação de gel de Agarose para análise de DNA**

### **- Preparo da placa de gel.**

- a) Montar uma placa de eletroforese, limitando-a em toda sua extensão com fita crepe. Certifique-se de que houve uma boa vedação.
- b) Colocar agarose e TBE 1X, de acordo com volume e concentração do gel desejado.
- c) Fundir a solução em forno de microondas.
- d) Deixar a temperatura abaixar até cerca de 50°C e adicionar o volume apropriado de brometo de etídeo, para se obter uma concentração final de 0,5 µg/ml
- e) Verter o conteúdo do erlenmeyer no molde de gel.
- f) Colocar rapidamente o pente sobre a placa, centrando-o suspenso.
- g) Deixar gelificar à temperatura ambiente por 30-45 minutos, retirar o pente.

### **- Eletroforese**

- a) Transferir o gel para a cuba de eletroforese, verter a quantidade de TBE 1X necessária para cobrir completamente o gel.
- b) Conectar os cabos entre a fonte de tensão e a cuba, de maneira, que a corrida ocorra do pólo negativo para o positivo (testar para ver se está passando corrente). observar a formação de bolhas de ar que são geradas no ânodo e cátodo, devido à eletrólise.
- c) Aplicar as preparações de DNA, previamente misturadas ao tampão de amostra (TBE 5X), com auxílio de uma micropipeta automática.
- d) Aplicar voltagem de 1-5 V / cm (distância medida entre os eletrodos).
- e) Acompanhar a corrida usando como referência o corante azul do tampão de amostra (TBE 5X).
- f) Desligar a fonte de tensão e remover o gel da cuba.
- g) Analisar o resultado da corrida através da exposição do gel à luz UV e fotografar para documentação.

### **Anexo B. 3. Protocolo de pirosequenciamento**

ETAPA 1: Construção da biblioteca de ssDNA.

A amostra de DNA genômico será transformada em biblioteca de fragmentos de DNA fita simples (ssDNA) pela técnica *Shotgun*. Os fragmentos obtidos serão ligados a adaptadores que ira possibilitar a imobilização dos fragmentos em microesferas (*beads*).

ETAPA 2: Amplificação clonal baseada na PCR em emulsão (emPCR)

Moléculas de DNA fita simples obtidas da biblioteca de fragmentos serão imobilizadas em microesferas (*beads*). As *beads* contendo moléculas de DNA serão emulsificadas com os reagentes para amplificação do DNA por PCR em uma mistura de água e óleo, de modo que cada *bead* com única molécula de DNA ligado seja capturada em uma micro-gota suspensa no óleo, constituindo assim um microreator de amplificação.

ETAPA 3: Sequenciamento no 454 Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences/Roche)

Após a amplificação, as *beads* recoberta com fragmentos de DNA serão depositadas na placa de sequenciamento (Pico TiterPlate) que contém 1,6 milhões de poços; cada poço tem a dimensão exata para comportar uma única microesfera. A placa será então inserida no equipamento, e os reagentes do pirosequenciamento serão sucessivamente adicionados aos poços da placa. O sequenciador FLX executa automaticamente e monitora a sequência de reações em todos os poços da placa simultaneamente.

ETAPA 4: Processamento e análise de dados

Após 10 a 12 horas de corrida, serão obtidos os dados brutos das imagens dos sinais luminosos gerados a partir do PicoTiterPlate e detectados por uma câmera CCD. Após 8 horas adicionais de análise computacional, as imagens serão convertidas em sequências, cada uma derivada das imagens de um poço da placa.

## **APÊNDICE**

**>1-26206 (contig 1 Size: 26206 bp)**

GCGCCTCTCGCCACCTCCACGCACGAATACAATCTACTCTACTGTCTGGCATGGCCCGAGTACC  
ACTGCCAAACCCCGACCACGCACATGACCCGCTCCACTTCCCTCGGGACTTATGCCACCCAGTTG  
ACTGTGGCGGGCGGGTTTCGATTGTAAAAAACTGCCGGTGATAAACTCCCCCTGACTTGGACCCAC  
AGCGGGTGTATTATAATCCGTTTTACGATCCCCGCATTGTTTCGGTCTGCTGACCTAGGTCTCGGCT  
CCCGGCTCCCGGCATAATCTCAGCTATTTCAACATCAACTCCTTCTGGCTTCGAGGCTGAGGCCG  
CGGCAGCATCGGCGCCGAGCTTCACTGCCCTTATGGGAGCCATGAGCTGAATGGACCCGCACGC  
TACCTCTAGGCTTCCGCCGACACAGTGCCTCGGCAGGGCATCCACCGCCATTTCCGCTTTCCAC  
ATCATCTTCATGCACCAGCCCACCGCATTGCGTGAGTACAAGTCAATCACCTCCGCCACGGGTC  
GTGGGTTGGGCTGAATGAAATTCAGTCCCCCGTTTACCACGATCCCCTTGCCCAATCCGGCAC  
CGCTACTTGTAAACCATATCCAAATCCCCGGCTCTCCATCACCCACCCCACTACCCCCcACCA  
CCGCTTACCTCGGCCGACTCCGTCCGGCGTTAGCCGGATCATGTAGTCGTCGTCGGCAGCCCA  
GACACCGTGAAATGCCCGTCCGCCGACGGGCGGATCCAGGCGCTGCGGGTGC CGGTTTCCATGC  
CGCGAACTGCAGCTGCAGCTGGTCCGGCGGGAAGGGGGCGGTGACGGTGC CGCTGATTTGCG  
GTTTGAACGCCCGCGGGGCGGGGgCCGCCGGTCCCAGCTCGGGTGGGCGTCGTAGCCGATTTG  
GGTGACCAGGTCCACCGCCGACGGGCTGCCCTCGGGTATCGGGATCAGCGCGGTGAGCTCCAG  
CAGCGGGCGCGCGGGGTGCCAGCGCCTGCCAGTAGTCGCCGCTGCGGATGCCGCCGTGCGG  
CTCGTGCAGCATGTCCAGCTGCACCGGGTAGCCGTTTGTATCCAGCTGGACGGCCTGGGCCAGT  
TCCGGCGGCAGGTCCGGGAATGCCGTATGCCGGCCAGCGCGCGGTAGAGCAGGTCTTGCTCC  
ACCAGCGCGTGGTCCGGCGCCGGCGCGGCTCCAGGCGGTGAGCATGTAGCTCAGCGCCATGATG  
CGGGGgTAGGGgTCCGGCGTGCCGCTTTGGTTGTCCGGCGCTGCGCTGGATCTGGCCGGGGTCGCT  
CATGCGGCGGCTGAGGTCTGGCGCACGCCGGTGGAGGTAGAGGTTGAGCACCGGGTCGTTGCC  
CAGCTTCTGGCGAAGTCCCGTCCGGCACCTCGGTGCTGATCTGCACCTGGGGCAGGCTGGCG  
AAAATGCGTTCGCGCAGCAGCCGGGTGAGCGCCTGGGTGAGCAGGGCGAAGTTGCTGTTATAC  
ATGCTGGGCTCCTTGCAGCCAGTTTTCTATCCTTTCGCCATCCGGTAGCGCTGGTTGGTCTTGT  
CGAACTCACGCGTAAGCGCGTGGGCCAGCCGCTGCGCCGGGCTGGACTGCGGCCGGGCCAGGC  
CGGCCAGGCGCGCGCCAGCGCGATGTTGGCGATTTGCGCCGGGCTCAGCTCGAAACTGTCCGC  
CAATGCCGCCAGCGCGGCGGCGGGCAGCGCCAGGCTAGGCGCGTGGCGGCCACAGGCTGAG  
CGGCGCAAGGCGTCCGGGGCGCTGAATTCCACGGTGAGGGCGAAACGGCGCAAAAAGGCCGGT  
CCAGGTTCTGCTTGAAGTTGCTGGCCAGCACCGCCAGCGCGCTGCTGTCGTCCAGCCTTTGCAG  
CAGATAGCTGACCGACAGGTTGGCGTTGCGGTGCTGGCTGTCCTTACCTCGCTGCGCTTGCCG  
AACACCGCGTCGGCCTCGTCGAAAAACAGCAGGCAAGGCTGGCGCTCGGCCGGCTCGAACAAG  
GTGGCCAGGTGTTTTTCGGTTTTGCCTATCCACTTGTGCTGAGCTGGGCCAGGTTGACCTGGTA  
CAAGGGCAGCGCCAGCTCCGCCCGCAGCGGTGGGCGGCCAGGTTTCCGGTGGCGGGCGG  
GCCCCAGAACAGCGCGGTGAGGCCGCTGCCGTGGGCCAGGCCTTCGGCGCGCAGCAGGTGGCG  
GCTTTGGTAGCGCAGGCTCAGCTCCGCCAGCGCCTCGCGCTCGGCCTCGGCCAGTTCCATGTCG  
GCCAGGCGCGCGCGGCTCCACCCGCCGCGCCAGCGCGCCAGGCTGGCCGGCTGGTGGGCC  
AGGCAGGCGCGGACCAGGGCGGCGGCGTCCGGCGTGGCCTTGTCCGCCAGCGCGGCGGACGCG  
ACGCGGCGCATGTCGCCGGGCAAGAGCGGAACTGCCGCGCCAGCGCGGCCAGATCCGCCCGG  
GCGATGCCGTCCGCCGCGCAGCATGGCGCGCCACAGCCGCGCCGCTTCCCTGCTCGGTGGCAGGC  
CCAGCGCGCAGTTGACGGCCAGCGCCGGCGGCGCCTGCTCCGGCGTTTCCGCCAGCCGCACCAG  
CGCGCGGCCGGGTGGCCCCGCCAGCCAGGCTTCCAGCAGCGGCAGCAGGCTGCTTTGCCGCGC  
CAGCTTGTCTCGTCCGGCCAGACCAGCCAGCCGTGGTTGAGATCGACGAAGCTGAGCAGGTGCG  
GCCAGCAGCTCTTCCGGCGCGTTCGAACTGGTAAAGCGCTCGCTGTTTAGCAGGTAGACCGGGG  
TGTTCCGGCGGCGGCCAGCAGCGCGCTTTCGGGCCGCTGCCCGGCGCGCCGGTGGAGCTGCCA  
GCCGCCGCTTGGGGGAAATCGCCGCGCGGCAGCGGCGCGGCCGGGGCGGCCAGCCTTTGCAG  
CAGGCGGTTGAGGTGCTGCGCCTGGCCGGCGCCGGCGGCCAGCTGCTGCAGCAGTTGCGGGCT  
GAGGCGCAGCCGCGCCAGTCTGACCAGAGCCGGCCAGCAGCAGGCGGCGGCGCAGCAAGA  
CGCCGTCCGGCCAGACCCGCCAGCGCGGATGGATAGGCGGCGGCGTCCGGGCTGAGGAGCTGGG

CCAACACCGGCAGGCCAGGCCGCGCTCGCCGCACAGCGTCTCTGCCGCCGGGTGGCCGGCTTC  
CAGCGTCAGGGCCAGCGCCAGCGCGGGCGGTCCAGCGGGCGGCAGGCTCAGCCGGGCCTGGGC  
CGGCGGGCGGATGGACGTTCAGGGCGGCGGGCAGGCGGGCCAGCTGTCTTCGTCCGCC  
GTGTTTCGATCATTGCCAGCGCGGCGTCCAGCAGCGCGGGGGgAGAAGCCCCAGTCCAGTTCA  
TGCATCGCTCGGCTCCTGGTCCGGGTGGGCGGGTTCGGCATCTTCTGGCGGGGGCTGGGATG  
GCCGGGCGCGGCCAGTTGACGGTGATCAGACCGTCCAGCCAGGGCAGCATCACCACGCCTAGC  
GACCACGGCAGCCGCGCCAGCAGCACGTCCTGGGCGGGCTTTCGCGCCGTACAGTCCAGCCG  
GCCTGGCTCAGCCGCCAGATGCCAGCGCGGGCAGGAACAGCGGGCCGATGCCGTCCGCGCAGC  
GGCATCGCCGGCAGCGCGGGCCAGGCCTGCTCGATGGCGGCGACGGCTTCGTCCAGGTGG  
CCGCGCTCGGCGTCGGACAGCTCCGGCGCGTCGGCCAGCGGCTCGTCTATCTCCAGGCCAGCA  
GCACGCGGGCGGTGTAGCCCTGCTCCTGGTCTCGTCGCGGCCAGGAGGCCGGCCAGCGCGC  
GCCAGGCCTTGCCTGGCTGCGCTCGTCGCGCCAGCGCTGGCCGTAGTCCAGCCAGCCGCAGCG  
GCGGAACAGCTCGGGCAGGAAGGGCCACAGCAGGGCCAGGCCGGCGTTCGTCCAGGTTG  
GGCTGTCTTCGTCCAGGCTTTGGCCGTCCAGCAGCTGCTGCAAGCTGGCGGCGGCCTGTTGCCA  
CTGGCGGCGCTCTTCGCCGCGCAGCGGCCGGCGCGGGCGCGGGCGGCCTGCCACAGCCGCAG  
CAGGGCCGGgTCGCGTGTGGCGCAGCCGGTTTCCAGCTCGTCTTCCGGCAAGGCCAGCGCG  
TCCGGCCACAGGCCGGGAATGCCTTCGGTGTGGCGCTTTGCGCGGCCAGGGTGTCCGGCCAGCG  
GCTGCCAGGCGGCCACGCCGCCGCGCCACAGCTTGAGGCGGGCGGGCGGCAGCTGGGCCGCCA  
GGTGGCGGCGAGGCCGGCAGCTGCGGGTGGGCGTCCAGCAGCGCCGGCAGCAGTTTTTCCAGGG  
CGTACAGCGCGGGCGGCCAGCCCTTTGCGGTTCGGCCGCCGGCGCGCACTGGGCGAGGGCGGCGT  
CGCGGATGGGCGACGGCGGCAGCGCTTGCAGCCGGGGCGCCAGCCGGCGAGGAAGTCGCGG  
CAGTCGTGTTCCAGGCGTAGTCCGCCGCCACGCTCTTGCCCTCGTCCACAGCCGCAGCTGGC  
GGCCGAGCTTGCGCCGCCAGGCCAGATTGGGCGCGGGCGGGCGGAGGAAGCGCTCGATCTGGT  
CGGCCAAGCGCGCCGGCAGCGCCGGCTGGCGAGAAAGCGCGGCAGCGCCGCCAGATCGCAC  
AGCGCGCGGGTCCAGCTGGCCTTGGGCGGCCTGTTCCAGCCGCTGGCGCAAGGCGTGGCCC  
AGCGGGGCGGGCGGCGTTCGCCGGCAGCTCGCGCAACGCCAGGCGCAGCCTGTGGATGGCGTCC  
CCGCTGCGCTGCGGCCAGCCCGCGCTTTGCGGGCGGAGCAGCCGTTGCGCGTCCGGCCAGCCAGA  
GCAGCAGGGCGGGTCCAGCGCCGCCGGTCCAGCGTCTGTTCCGGCCTCGCGCAGCTGGCGCA  
GCCAGGCGGCCAGCCCGGCCAGTGGGACAGCGCCTGGGCGAGCCTTTGCGCCAGCTGCCCGG  
GCGCTTCCAGTCTTCGCCGGCGCGCAAGGCCCGCACCGCTTCTCGCGCGCGGGGCTGTCCGG  
CTGCAAGGGCAGCCGGTTCGCGCGCGGCAGCTGGCTGAGCAACTGGCCAGGCCCGGGCGCGC  
GCCGTTTTGCGCCAGCGCGGGCGCCGAGCTGGTCCAGCCAGCCGTCGTCCGGCCTCGCTTTGCGCC  
AGGCCTTGCTCGATCAGCGCCAGCAGCGCGGCCAGTGGCCGCGTTCGCCGCCGCTGCGCGGCA  
GCGCGTCTCCAGGCGTCCAGCAGCCGGGACAGCCGCTGGGCCGGTCCGCCGCTTCGCGCGC  
GGCGCATCCGGCTGGGCGTCTTCCAGCCAGTCCAGAATCGCGTCCCGCAGCGGGgCGGgCAGCC  
GCAGCAGGCGCGCGCGCGGCCTGGCGCGCCAGCAGCGGGCTGAGCCAGGCCGCGCCGTCGC  
GGCGGCGCAGCTCGCTGTACAGCAGCGCGCCAGCGCGGTGGCGCTCAGGGTGGGCTGGGTCC  
ACAGCGGCGCGCCGTGGCGCAGCCAGCGCGCCAGCTCTTCGCGGGCGGCTGCCTTGCTCTGGCGG  
CGGCAATTGGCGCGCCAGCGCGTCCGCCAGCGCCCTATCCAGCCCGGGCCCCAGCTCGTCCAGC  
AGCCGGTCTTCGTCCAGCCGGGCCAGGTCCAGCGTCAACGAGGGCAGCACGCGGGCGACCAGA  
TTGTCTCGCGCCAGCCGGCTGGCGTTCAGCGTGCAGGGCGCGTGCAGCCGGTTCGA  
TGAGGGCGTTCGCGCGCGGGCAGGCGCGGTCCACGGTTCATCCTGTTCGACGATCAGTGTGTG  
CATGGGTTTACAGGCCGTGTTTCGCGCTTACAGGTGGACAGGGTCTGCAGATAGGCCTGGTAGCG  
CGGCGACGACGGTGGCTAAGGCCGATGGCGACGAAGGCGGCTTCGCTGCCCTCGGGCTGGCT  
CATGCACATTGCGCCAGCCGCGCGCATCAGGGTGTCTGGTCCAGGCGGTCCAGCTGCTTG  
AGCTGCGGCGCGGCGCTGTCCGGCCTGGTGTGGAAGCTGCCCTGGCGGGCGGAGGCCACCGGG  
CGGGTGTCCGTGTCGGCGAAGGCCGGCAGCGGAGCGAAGGCCACCACGTCGGTGGGATGGCGG  
CGCTGCCAGTCGCCGCCGCCCTGGGCGTTGGGTTCCACCGCCACCCAGAACAGATTGGGCTGGA  
TCAGGTCCCGGGCGTCCGGGTACAGGGTGTTCGTCGATTACCAGGCCGTTGAGGCGCGAGCATT  
GATGTAGCTGGTTCATGGAGAGGCTCCGAAGAGGAAAAGGCGGGTTCGGGGCGGCCGGGAGCGG  
GCCCGCGGAAAGGGATTACAGGTTCGTGGCAATGCCAGCCCGGCTGGATGCGGCGTTCGATGA  
AATCGCCGCGCCACAGGCTCCACTGGCGGTTGCCGGTGTAGGCGGGCGATGTTGCGGTTGCTGAA

TTGCGAGCTGTAGTTGCCGGTCCAGTAGCCGCTGGCGGTGAGGTCGTTGCAGCCGTAAGCGCCG  
CCGCCCTGGTAGTGGGCGGTGCAGTAGCGCGCGGTGAGCGTCAGCCGCTCGCAGCTGTAGGCC  
GCGCCGCCGTACAGCGCCTGGCAGCCTTGCGC GCGGACGCGGCTGTCCGGGCACTGGGCCACC  
GCGCCGCCGACGTCGGCGTAGCAGCGGCTGGCGGCGATGTCGCTGTCGGAGAGTCCATAGGCG  
GCGCCGCCGTAGCTCAGGCGCTGGCGCGGCGAATCGCTGCTGGCGAAGCAGGCGTGGATGTTG  
TCGGCCTGCACGCGGCGGCTGTCCTGGCCGAACAGCGCGCCGCGTTGCCGCGGCCACGTGGC  
CGATCAGGCGGGCGTGGATCTGGATGTCGCGGGCATGGTTGAGCGAGACGGCGCCGCGCTGGC  
CGTTGAAGGGCAGGCCGCCGCGCTCGAAGGTGAAGCCCTGCAGCAGGATCTGGCTGGCCGGTC  
GGCGCGGGCTGCCCTCGATCAGCAAGCGGCAGCCGCGCTCGGCCTTGACCACCCGCACCGCGT  
CCTCGTTGAAGCCGACGATGCTGACGCCGCTGCCAGGCGCACCGGATTGCGCAGCACATAGCT  
GGCGATGGCCTGCCATTCTTCGCCGCGGCGCTCGATGCGGCTGCCGTCCAGACGGGTGTAGGGG  
TGGCTGTGGCCGTGTTGCGCGGCGGCGCAGCAGGATGATGGTGCTGTTTTCGGCGATGCGGGCCT  
CGCCGCTGCCGTCGCCGAACACGCGGTGCAACTCTTCTGGGTGCGGATGCTCCAGCTGCGGCC  
GCCGCGGCCGAACGGCGAGGCGTAGGTGTCGACATAGGCCTTGACC GCGCGCTGGGTGGCCAG  
CGTCTTGTGCTTGGCGCTCTCCTCGCCAGATAGGGATCGGCGGAGATGGTGTGCACCATTTTCG  
CCGTGGGCCAGCGCGACGCCGCCCTTCAGATCGGCCAAGCCGAAAGCGGTGACGCCGCCGCGCC  
AGCTCGCTGCGGTGCGCCACTTTCAGCGATTTCTTCACTTCAGCGCGCCCTGGACGCGGCCATC  
CTTGGCCACTTCCAGCGCGTCTCAGCTGCGCCGCGCCGTCCACCGCCAGGCCGCCGCGCACG  
CGCAGGGCCTTTTTGACATCGACATCGCCTTGCAGCGCGGCCGCTCCGGCCACGCTCAGGCTGC  
TTTTCAGGTCGGCTTCGTTGTGGAAGGTGGCCGGGCGCTGGGTGGTCTGGCCGTTGCCGAACAA  
GGCCGCGCCGTCCACCGCCAGCTGGCCCTTGAGCGCGCTGTCGCCGGCCACCGCCAGGGTGT  
TCGACGCGGGCGTCGGCCAATACCGCCTGGCCGTCCACGTCCAGGTCCTGGGTGGTCTTCAGAT  
GGCCGTGATGATGGCGTCGCCCGTCACGTCCAGCGCCGCGGGCGCTGTCGCGGCCGACGG  
CCAGCTGGCCCTGGGCGTTGACGGTGACGGCGGCCAGCAGCGCGCCGTCGTCCTGCTGGCGCAT  
CAGGCGCAGCGCCTCGCGCTGCGGGCGGGCCACCACGTGCAGCTGGGCGGCGGGGGCGGCGGT  
GTTGACGCCGACATTGCCGCTGGCGCTGACCAGCAACGGGGTGTGTTTTGATGGGGGTGATG  
ATTTCCAACGGCGCGTCTCCTGATTGCGCTGGCTGATCTTGAGGCCGCCTTCCAGCGAGGCGTC  
GCCGGCGACGGCCAGGGTGTGTTGAGGCGGGCCGGGCCAGGTCGAGGAAGCCGCCAG  
GGTGGCGTCGCCGCCGATCTGGACGGTCTCGGCCACCTGCATGCCGCGGGCCAGGTGCAGGCTG  
TCGCCGACAAaGTCGCCGATCACCGCCGCGCCGCGTTCAGCCGCGCCGGGCCGGCGACGTGCA  
TGAAGCCGCCAGGGTGAAGTTCGCCGCGATCTGCGCGGTCTCGGCCACTTGCATGCCGCGGGC  
CAGGTGCAGGCTgTCGCCGACAAaGTCGCCGCTCACACC GCGCCGCGCTCAAGCGCGCCGGG  
CCGGCCAGCGCCAGCGCGCCGCGATTGTCAGGCGCCGTACAGCGTGGCGTCGCCGTCGCCGT  
CCACCTTGAACGCGGGCGCCGCCTGCGGCGCGCCGTCGTCGATGTTGAGCATGCGCGACAGGAT  
CAGCACGTCTGGCCGTCCGGCGCGCTGGCGGTGACGCCGTTTTTCGATATTGACGCCGCCGTTG  
AGGCGGGCCGGGCCGGCGACGTTGAGGAAGCCGCCAGAGTGGCGTCGCCGGCTATCTGCACG  
GTGTCGCCACCTGCATGCCGCCGGCCACGTGCAGGCTGTCGCCAGCGCGGGCGGAACCGGCC  
ACGCTCAACTGGCGGTCCAGTTGCAGATTGCCCTGCAGATGGCTGTCGCCAGCACTTGCAGCG  
CGTCGGCGGCGAGGCCGGCCTTACC GCCGCGCCGCGTGAAGCTGGCTAGGCCGCCGGCGCT  
GAGCGTCTGGCCGATGGCGGCGCTCTGCGCCACGCTCAGGCTCTGCGCCAGACTGGCCGGGCCT  
TGAAGCTGGCTGGCGCCGCGATCAGCAGGCCGCGTCAACTTGGCGTCGCTTCCAGCCTGG  
CGTCGCCGTGCAGATGCAGGCTGTGGCCGGTGATCTTGTGCGCCACGCTCAGATTGGCCTTGAG  
ATTGGCGTCGCCGGCCACGCCAGGGTGTGAGCTGGCTGTCCTGGCGCACTTCCAGGCCTTGC  
GGGGCCAGGATGGTGGCCTTGGCGCGCGCTGTGCAATTCCGCCAGGCCGGCGCGGCCAGG  
CCGCTCTGGAAGTTGGCGACGCCGCCGACGTCCAGGTTCTTGGCGATGGCTGCGCCGCCGCCGA  
TCCGGGCATCCTGGGCCAGGGTCAAGTCTTGTGGATGGCGGCCGGGCCCTGGAACACGGCGG  
GgCCGGCCACGCTCAGCGCGCCGCCAGCGCGGCGTCGCCGGCGATCGCGGCATTGGCGCCAC  
TCGAGGTCCTGCAGCGCGGACAGGGTGTGCGCGGTGAGGCCGTTCTCGATGGTTGCGCCGCCA  
TGCAGACGGGCCGGGCCGGCGACGTCGAGAAAGCCGCCAGGGTCAAGTTCGCCGCCGATCTGC  
GCGGCATCGCCACCTGCAGGCCCTGGGCGATGTGCAGATTGTCGCTAACCAGGTTGTTCTGGA  
TGGCCAGGCCGCCGGCGAAGCGCGCCGGGCCGGCCACGTCCAGCGAGCTGTTCAAGCGGGCCG  
CGCCCTGCAAGGCGAGCTTTCCGCTCAGCGCGGCATCGCCGGCGACGTTTCCAGCGCTTTGTCAA

CTGGGCGGCGGCCTGCGCATGCAGCGGCGCGGAGATTTGCAGCTGCTGGCTCAGCGGGTCGAA  
GCGCAGGCCGTCATCGTTGCCGATCACCGCGCGTCGATCAACTGGGCGAAGTCGCAGCCGGT  
GGGAATCTGGTTGTCGGCGAACTTTTTCTTCAGCTCCGCGCGATTGGGATTGGGGGTCATGAAA  
AATCCTTGTAGTCATTCAGGGGAAGAGCCGGGGTGAAGGCCACGACGTAAGGCTGGGTGCGA  
TCGCCGATGCGGCGGCCGAAGGCGACGGTGCGCCGCTGCGGAACCAGCGGATAACCGACGGTG  
AAATTGGCGTCGAGCTGGCTGACCGCGATATGGCTTTGCCAGGCGGCGGCATCGCTAGCGGGA  
AGGCCGCTTGCAGCAAGGCCCGCTGCAGCGCGGCGGAGCAGTCCTGCAGACGCCGGCGGCGCG  
ACCAGGCGCCCGGCACGGAAAGATCGACACCCGACGACGGCGTATCGGGGCTGGTTTGTCCG  
GGCTGGGCGCGGCCGGGCCCGCCATTTCGCGCCACTTGGCGCGCAATGGCGGTGCAGCGTCTC  
CATCCGGTTCAGATCGTCCGCGCCAGCCAGCACACCCAGGGCGTCAGGTGCAGCGGGGTTTCC  
TCGCAGATCACCTGCTCGACCAGGCGGCGGAAGCTGGGATCGCCGAGGCGGCTGCCATCGACC  
GGCAGGATCCAGAACACGCAGTTCGCCAGCGATGCCGTGGGTTCGAATCGGGACCCGCCGCC  
AGCAGAACGCCCTCCACCAGATAACAATCCTTCGCGGTTGCCAGCGACAGGCTGCCATCGTCCA  
GCGCGATGCCAGCCTGGCGGCCACGCGCAATTCCAAGCCGCTGCGGCTATGCAGCGAGGCCG  
CCAGATCCGCACCCTGGCCGCGCCCGCCGACAGGCGCGAAACGCCAGCAGGAAGCCGGCCA  
GGTCCAGCACCTGCTTCAGGCTGGCCAAACGTCCGGTTCAGCGTGGCGGCATCCAGTTTGGGCGC  
GTGGCGGCTGGCCAATAGCCGGGCGCTGTAGTGGCCGAACACGCCGCGGTAGCGCAGCATCGC  
TGCGTCCGGCAGCGCTTCGCCGAAACGCGCCGCCAGGTGCTGCAGCCGGCGCAGGCTGCGATC  
CAGCCAGCGCTCGTCAAACGTCTCCAGCACCGGCTCTCCACCGGCTTGCCGGTAGGCCGGC  
AGATCCGCCGGCGTCAGCAATTTTTCGGCCAGCGGCAGCGGTTGCGCGCCCTGGCGCAGGATGC  
TGGCGGGCAGGCCGCGAACGGTGTCCCAGAACCGGTCCGCGTCGGCGTCGGACAGCGCCTCGC  
TGGCCAGCATGCGGACGAACAGCGCCTGCAATCGGCCGAGCCAGTCGCCAGCTGGCAGCTCCA  
GCAGGCGGCGGACATTCTCAGCTGCGCGGCTGGTTCGGCCTGCTGCTTCCAGCAGCAGCAG  
ATAGGCCTGCAGTTGCAGCGGCGGGCCTGTTCCGTTCGGCGTCGCCGCGGATTTCAGGCCGCTG  
GCGCTGATGCCGAACTGCGACGGCAGGCCTTGCGAAAACGCCGAAAGTCGGACAGCCGGCGA  
TAACGGCCGAACGGCGCCGGCAGCGAGGCCTGGCTGACCGGGGCGACGACGGGCGCGGCCAG  
CAAGGCCTTTAATTCGTCCAGATTGACGCGCAGGCGCTGGCCCTTGCATGCAACGGGTCTGAG  
CTTTGCTTGGGACAGCTGGCTTGCCTCCCGCCACCATGCCAGCAATCCCTCGATATCCAGGTTGAG  
GAAGCCGCGTCCGGCAAGGTCCACGACCAGGCGCTGTGCAGCGGCGACCGTCTGCTGTGCC  
CAGCAGCAGGCTGCTGACCTGGGCGATGCCGGGAATGCCAGCGCCAGATCGATCAGCTGACT  
GGACAGGACCTGGGTGCGCGCCGGCGGCTGACTTTGCCGCACCCCCTGTGCAGCAGGGGGCC  
ATCGAACACGGTATCACCGCTTTGTCCGGCGGCGAGGCAATCGGCGGCGCCACGGTACACAGG  
CGGTGCCGTCAAGGCCTGTGCCAGCTGCGCACACAGCGCCGCAACGTAGTTTCGACGACGGCG  
CCGTCCGGCCAGCTCCAGCTCCGATACAGCTTGGCTTCGCTCAAGAACGCAATCGTGT  
CCAACAGCATGCCAGCGGCCGCGCCGCTTGAAGCGGCGCCAGACGTCTGCTTACCTGCGC  
CTGCTCGGCGCCGGACAAAGCGCGGATCGGCGTCAGCCGACGCTGGTAATGGCCAGCCGCCCG  
GCCACCGGCAGCAGGCTGGCGGCGTTGAGCAAGGGATGGTTCGGCCAGCGTTTTTTGCAAATCGT  
CCAGGCTCACCGGCTGAGTGGGACAGCGCCTGGTTCGATCGGCGGCGAGCGGCTGCCAATCGGCTT  
CGCGCCGGCCGGGGCCAGCAGGTCGCGACCTCATGGTCCAAGCGGTAGCCAAATCGGTCAG  
GCCGGCCAGCGCGCCCTCCAGCAAGGCGACGCCGGGCTCGGACGGGTTGACGTCGGTCCAGGC  
GTTGCCGGGCTGGGCGGTGATGAAGGCGATGGCCTCGGCGCTCAGGGCGGCGAAGTCTGATG  
CGGCGGCAAGACCAGATTGGGATCGATGCTGGCCGCCATCACTGGCCTCTCAGGGTGTGGAAC  
AGGCGGCGCAGCGCGGAGGCCGGCTTCCGGGCTCATCTGAGCGGCGGCGGATCGGCGTCCG  
GCCGGCGGACGGTAGACTCGGCGGCGGCCTGGGTGGGGTCGATCGCGGCGGCCGATGGTTCCG  
GATGCTTGGATGGCCTCCTCCGCGATCGGCGCGGATGCGGCGGCGACAGGCGGCGTAGGCTCC  
GAATCGTTTTTCAGTCGCGCGAGCCTCGGCGGCTGGGGCAGGAACCGAATCTTCGCGCGCTTCCG  
CCGGCATGGCGGCGGCTGCACGGAGGGCTCCTCATCTCTGCCTCCGTTTCCGGCAGACTCGG  
CGCGGCAACCTCCGCTCCTCGGTTCCGATGCGCCGCCCGGTCCGCAGCGGAAGCCGCGGCGATG  
GACGGCTCGCTCTCCGGCAGGCTTGCTTCGGCCTGGGCCGCCGGCTCCGCGAGCGTCTCCGCCG  
AAGCGGCGTCGGCGGGCTCCGTTTTCGTTTTCTCTCCTGAGCCGCAAGGTCCGGCTCGGCCG  
ATCGGCGCTCGGCTCAACGGCGAGCGGCGGTTCCATCACGGCCTCTGCCGCTCCTCGCGCCGG  
GAGACCTCGGCGTCCGCTCGTCAGACGCCGGCTCGGAGGCTGGCGGGCTGGACTCGGCAGGC

GCGACAGCTTCATCCACTGCCGGCGGGACGGCCTCGACTGCCGCTTCCCCGGCGGCCGCTTCTT  
CTTGCTGTGGCGCGGCCATTTGCGCTTCGCCCGGCGCGCCGGCCGGGGTCAATTCAACGCCGAC  
AACCTGGGCGTGCACCACCGCGCCTTGCTATCGTTTCCATTTGCCCGGCGGCAGGCGTTTCCA  
CCTCGGGTGTGGCCGCGCTCGGCGCCTGCGCCTCCGCGCAAGAGGCCGCGAGGCATGGTTTCCGC  
CGCCGGCGCGGTGGCCGGAACCCGCTGATCCAGGCTATCCAGCTTCGTCTGCAGCGACTGCAGG  
CGCTGTTGACCTCCTCGTCCGCTGCTCCAGCGCCAGGAACAAGGGATCGTCCGGCGCTCACCC  
TAAGCGTCTGCGGCGGCGCGGGACGCGCCTGCAGCGACTGCGCGACCAGCACGCGAGTCGCACA  
ACAGGTTGATCAACAGGTAATAGTCTTCCCTGGGTCGGCAACGCGCCATGCTGGAAGTGCAGCTT  
GAGCCGGGTGCGCAGCGCTTCCAGGCGGGTCTGTTCCGAGGGGAAGGCGAAGAGGGTTCATGGG  
AATCCTGTCAGAGGGGAATGGCATGGTCGATGCCAACGCGGCCGGTGGCGATTGGCGCGGAGA  
GGGACGCGGGGGCGGGAAGGCCACATCGAAATCGAATTCGATTTCCATCACGCCTATGCCTTC  
GAACAGCTGGCGGCTGTCGGCGATCTGCACGAACAGATGCTGCTCCGCCGGCACCCAGCACATC  
GGCTTGCGCCAGGCTGCCCGGATCGCCACGGTGTCCAGCCAGGGCTGGTAGTTGGTGATCCAG  
CCGCCCTGGCCGTCCTGATAGGCGCTGCGCAGCGCCACCCTTCGCTCACTTCCGGCTGCCGGC  
TGAGGAAATGGCTGATGTCGCTGAGGAACACCGTCTGGCCAGGCCGTGGCTGCCTTGCCATGG  
CGACAGATAGTCCACCAGCCGCTGGTTGAGGCTTTCGAGCGCGACGCCGGCGTCGTAGTCGGG  
GTCCAGCACCCAGGACGTTGGTGCTGCGAAACACGCGGTAGCGCGGGCGGGCTGACGGCCAGCGT  
CACCGCCGGCGGCAGGCGCCCGGCCAGATCGGCGGCGATGGCGGCCTGCAGCTTGGCGGCTGGG  
TTGCGGCTGCAGCAGGCCGGGGCGGTCCGGCTGCGGCGCCACCACCAGCCGCACCCGGCCCGG  
CCCCGCCGATCGCGCTCGGCGCGCGCCAGCGCCAGCTTGGGGAAGCCGTCCAGCGCCAGCCG  
CTCGTAGTCGCGCGCGGCCAGCGCCCGGTTCTTGTGGCTGAGGCGCTCGGCGGCGCGGATGGCG  
AATTGGCCGTCGTCTCCTCGCCGGGATGGCCGTCCTGCGATTGCGCCGGCTGCAGCACGCTGGCCA  
CCTCCGGCTGCGGCGGCAGCAGGCCGACGATGCTCTGCGCCGGCAAGGGCGCGGCCAGATGGG  
CATCATCCAGCCCCTGGTAGCGCACCCGCACCGCGTGCAGGTCCAGCCGCTGCAGGCGGGAGA  
ACGCCGGCGGCGCGGCTTGCGAATCGCTGTCGGCCGGCTGCTCGATGGCGATCCAGCTCAGGCC  
CTGCGCGTCTGCCACAACCTGGGGCAAGCGCAGCCGCGCGATGCCGCTGTTGCACAGGCCGTTG  
CTCTGGTTCGCTCAACACCGCGGCCAGGTCGCCGGCCTGGCCTTGTTCGCTTTCGAGCCGCA  
GCCAGCCCGTCCGGCTCAAGACTTTCCACTGCAGCGGCATGGCCGGCGGCGGCGACGTTCTGGCC  
GATGACGTCCGGCCGCGAGCGTCAGCACGCAAGGCGTGGCCAGCCGCGAGATGCCAGGTACAG  
GCCGCTGCCGGCGCCATCTCGTTGGCCACCGCGTGTACGGCCGCGAGCGGGCTGGTATTGGCC  
TGCAGCGCCGACGGCAGCAAGCCGATCGGATGGTATTGCAGCAGCGTCAGGTTCTGTGCCACG  
GCCGCTCGCTGGCGTAGCCGACGCTGGCCGAAGCCAGCCGCGGGGTGTAGGGCGGCGGCAGG  
AATACCGGTTGCGGGGGCGAGGCCCTGCAAGGAAATCGACGTCAGGTCGATGGACTGGCCGGGC  
GTCGCATCCGCCGATATTGGTAAAAACGATAACGGTCTGGCCCGGCAAGGTATAAACACG  
CGGCCATTGACTAGGACTGCCGAATCCAGACTCAACAATGGCACCCAACTGGTCCCATCATTGC  
AGGCCATAAATTGTGGGTTATTTCCAGCGCGCTTACGTCTATTCGACCGAGATCCAGCACAA  
ACCGGAGGCGTAAAAATCACGGTTGTAGCTCAGCGTCAATGTCTTCTGGCCCGCCGCGTCTTG  
CTCGTCCAGGAGCAACTGGTGCCGTCGATGCTTACTATTGGCCCGTTGGTAGCATCACTGGCGG  
TGGCGTGGAGAATCATTTCCCGCCTGATCGCACGCTCCATTGCAGCATTGCGGCGGTATAGCG  
CCCGGCCAGCACGCTGGCGGCCTGGGTCTCTTCGGCGTGGCCGAAGCTGCGGCCTTTGAACTCC  
AGCGCGAACCCAGTTGGGCCATTGCTGCGGATCGGAAGGCAGGGTATCCGGCAGCGGGGCCAGG  
GCCGCCGATCGTCATGCTTACAGCGAAAAGCATAACGTTTCCGCGTTATTGTCCAGAATTTTTTG  
CGGGCCATCGGCAATGACATATTTGCTGGTGGGGTTGGCCACCAAGCCGACGGCTGCGGTGGGC  
GTCAGCATGCCACCAGCGTCCAGGTAGGGCTTGAATAGCCAGCCAGATCGGAGGGGGCGTCCCT  
CCCAGTTGAGATTGACCTTCAATTTGGTCAGCGCTTGTTCACCACTCGGCCTGGGCCAGCCA  
AGGCGCTGGCCGTTGCTGACCGGTCCGGGAAAGGCGTCGAAAGCGGCGCTGACGTCCGCCACG  
CCCAGGCTGTTGCGCGCCGCTTGCAGCGGCAGGCCGTCGCATTCGGTGCAGGGTGAGGCTGG  
CCCATTGCAAGCCTTGCCAGATGTCCAGGCCGGTCAGATTGCCGCCGGCATCGGCGCGCAGGGT  
CAGATCCAGCCACGGCGGCGCGCCGTCGGCGCCGCTGATCGCTGGCAGCGTCGACGCCAACGT  
CCAGCTGATCGTCAATTGCTGCGCGTCCATGCCAGCTGGGCGTCCGCCAGCGCCAGGCTGCCG  
TCGGCCAAGGAGGCTTGCCTGCCAGTATTGGTTGAAGCATTGGTGAGTGCGGGCGAGGCTGT  
TGTCGGCGATCCCGCCGACCTGCCGCAAGGCTGCGCCAGGCCAGGCTTTCGCCCGCGCCAAA

CACGAGCTTGATCGTGCGCTCACCGGCCGCCAGCGCCAACAGCGGCGATTGCAGCCGGATGCC  
CAGCGTTTGC GGCTGCTCGCGCTCGGGTCCAGCGTCGGGCGCGGGCGTTTCGCCGACCACCTGG  
TTGCCCGCGGCCCGCCAGTCCAGGCCGCCGGCCACGTCCAGGCAGCGGGCGGCGCAGCAGTTGC  
GCCTGAGCCAGGCCGGATGCCGACAGCGCGCGGCTCTGTCCCAGGCTGATCGCCTGTTGCAGCG  
CGGCATGGGTGAGCGGCAACGCGTCCAGGCTGTGGTACACCCTTTGAACGCCGTTGGCGTCCAG  
GCCGGCGTCAATCCGCTGCCGGCAGGCAGGGTGAAGGCGGTGAAATCGTCGTTACAGCGTCAG  
CAGCGCGTCGGCCTCATCCGGCTGGCCGGGCTTGGGCGACAGCGACAGCCGGCGGGCGGTAATA  
GTCCTGGCGGTGGCGCTCGGTACGCGCGGGAACGCGTCCC GCGGATGGCGCTGCAAGCGCAG  
GAAAGCCAGCAGCAGCGCCATGTCCGGGCTGGGCGGCGCGGGCTTGAAGGCCGGCGGCAGCGG  
CGCGCCCTGGTGCATCCAGGCTGCCAGCGCCGGCCAGCTGTCCGGCGGCGGCAGCAAATCGCTC  
CAGCGGCCGGCCTCCTGGCCGTCCAATCCATAAAAAGCGCAGCTTGCCGGCCAGCGCTTGCCACA  
CCGCCAGCCAATCCAGGCTGCCGCGTTCTTCCACGCTGAAGGTGGCCGGGTCTTGCGCCGCCAG  
CGCGCGCTGCGTTTGAGGCTGCCGCTGGACGGAGAAACATTCCGAATATCGGAAAGCATGGC  
GGACTCGGGAAAAGAGAAAAGAAAGGGCGTCAGGCGGTTTTTCAGCTTGCCGGCGGGGCGACGG  
GCGTGCCGCTTTTCGGCGCCTGGTATTGCTGTTGCTGTCCGGTTGCGGCGGCGCCGGCGGGCGG  
GTTGGGCTTTCATCGCCGGCGCGACGCGCTTGCCCTTGATCGGCGCGGCTCCTTGAGCAGAACC  
TTCTTGCCCTTACCTTACGCTTGGTGCTGAGTTGGCCGCTTTTTCTTCTGTCTGCCTGCAGCAGCA  
GCACGCCGGGGATGGCGAAGGCGCCGGCCATGTACGGCGCGGGCAGCTTGGACTTGAGATGT  
CGCCTTCCAGCGCCACCGGCTTGCCGCTACCTTGAGCTTGTGGCCGGTGCCGGTGAGCGGCAA  
GGGCACCGCCCCAGCAGCATGGCCTGGCCCAGCATGCCCTTGACAGCACCTGGTGC GCGCTG  
ACCAGCGCTTGCTTGCTCATATCGAGGCTCGGTACAGATAGAAGGGATAGACCAAATTGTTGCG  
GGTATTGGTGTGCGGCACGGTGTAGTCGACGGTCAGCAGCACGCAGCCCGGATCGTCGCCCTGG  
ACGGCGGACACGCTATTGACATCGATGCGCGGCTCCAGCTTGAGCAAGGCATCCTGGACGCTGT  
GCTCCAGCTCGTACAAGGTGGCGGAGTCGATGCCGGCGAACAAGGTACGCGCCAGTTGGGAGC  
CAAAGTCCGCGCGCATCACCCGCTCGCCCGGCGCCGTGCCAGAATCAGGCGGATGGACTGCT  
GCACCAGCGGCTCGCCGGCCAGTTGCACAGGCAGGCCCGGCTGGCTGAAACGCGGGCGGAAAGG  
CCCAGCCCTGGCCCAGAAAAGCGTATTGGTCCATCTTGCTATCCTCAGGAAATGTTGACGCTGC  
CGGACACCTTGATGTCGACGTTGCCGTCGCTCTTGATGCTGGCTTTCTTGCCCCGACAGGGTGATG  
CCCTGGTTTCGACCATTACAGCGCCGCGCCCTGCTTCAAAGTGAGAGTGTCTTTGTTTTGGCGGGC  
GATCAGGCCGTCCTTGGCGGATAGCTTGAGATCGGTCTTATCGTCGCTGGCCAGGACGATGTTT  
TTGTCCTTGGCGTCGAAAGCCAGTTGCAGCTTGTCTTCTCCAGAATCAGCGCGTGCTTGGGCAT  
CTCCTTGCCATAGGGAAAAGGCGGCTTTTGCTTGGGGTTGTGCACCGCGCCCAAATCGCCGGA  
CAGTCCAGCAGTCGCCAAGGAAACCGACGATGACTTCGTGTCGCGGCTGCGGGCGGCAGATAC  
AAGCCGCGGCTCTTCCCCGCCAGCGGGGTGGCCAGCCGCGCCCATACCAGTTGTCCGGTTCAG  
ACAAGCCCTGCAGCTTGACCGGCAAGCGCTGCAGCGCGTCCGGATCGTCCTTGTAGGGCTGGAT  
CACGCCATGCATCAGCGGCGGCGGGCAAGGGCGCCGGCGGGTCAAGCGCTCGGGCTCCAG  
GCCAGCTGCAAAGTGGTGCAGGCCCTGGCGGTCCAGCTCGATGCGGACGCCTCCCACCCA  
ATAAGGCCCTGCAAAGGCAGCCGGGACTTTGTCTATCTTACCTGACCGCCGGGGCTCACTGCC  
AGATAGCCTTCCAATTGATGCTGCCCTGTTGAAAGCCAGCGCCGCGCGCGTGGTGC GCGCCA  
GGGCCTCGGCTCGCATGCCGCTTTGCTGGCGGGATCGCTGCGCCGACGCTTGACGGTTTTGCG  
CCCCAGCTTGCCCGGATGGTCTTGAGCGGACCAGCGCTCTGGCTGGCTGGGTGCTGACGGCC  
TTCTGTTCTTGATGCTCCAGGCATCCACCTTGGCGTCCGGAATCGCCGATTACCGTTCTGCC  
CAGGTCCATGCCGATGATCTGATGGTCCGGTCAGCTTACGCTGCAAGGCCGAGCCTTGGCCTGC  
GGCTTGTGCAGGCTGACACCGTCTTGGCGCTGAGTATACCAAGCCGTTGGCGGCCGCCAGGT  
GGCGGGCGAACAGCCAGGGGCTGACCGGCGGCAGCACCCGCTGCGAGTATTCGACGGTGGCT  
TGGGCCTGTTCTCCGGCCAGCGTGACGCCGGCTTTCTGCAGCACATCCTTGAACAGCTCGTCGTC  
CTTGACCTTGCTGTTCTTGGCGTAGCCAGCACGCCCTCCCCCGCCTTGATGGCGCTGCAATGGC  
AGACCAGCTCCATATGCAGCTGGTGCATCCTCCAGGCAGTAGCGCCGCTCGCTGAGCACGCCGCT  
GAACAGGGCGAGCGGAACGCTCTGCTCCGGCGGGGTACGCTGGAAGCTGGCCGCGCTGCCAG  
CGCCAGGGTTTCGATCGCTTGGGCCCATCCGGCTTTTCGTAAGCCGGCCTCGACCCGCACG  
CTAAGCCGCGTCGGCTGATTGGCGCAGGCTTCGTA CTCCAGCCGGTAGATGTCGAAGGTCTTGA  
GCGTGAGCCCCCGGATCTTGCAATTCGATGCCGGTCATGCCTGGCCCTCTCGCTGCGATACGGC

GGGAAGGCCACCGTCATGCCGGGGCGCAACAGGCGCGGGCTGTCCAGATCATTGCTGCGGGCG  
ATTTGCGGCGTGAGGGCGCTGTCGCCGTAGATGCTCCAGGTTTTTCAGGTCCAGCCGGTTCGCCGG  
CCACGATCTGGCGCACATGAGTCAGATCCGGCGAATTGAGTTTTGGCGGCCTTGAGCCGCTGCTT  
GCGGCTGATGCATTTCGTCAAACTGGCACTCTGCGGCCACCGAGGCGGCCTTGCCGTTGGGTCCC  
ACGCTTTCCGCTTTTCAGCCGGATGCTGCGCAGGATGCCAGGAATTTTTCCGCCCGTAGGGAA  
ACGGCATCGTCTTGTCCCAGGTGAGCGTGAGGAAACGCGGCTGGTGGCTGGCGCCGTCTATGCT  
GTAGCAGCAGGCGTAAAGCTGGGCCAGCTGATCCTGGATGCTGCCGAGGCCGGCGGTGAACTT  
CGCCAGATTGGTGTACACGCCCTCGAACAACAGGAAGGTCACCGTCAACTCGTTGCTGCCGCCG  
CCCTGGAAAGACAGGCCCGCCCGGGACTGCCAGGCTGCGGTCCTTGCGTATTCAATTGCTGA  
GAGAAAGCTGCAGGCTCTCGCTGCGGTAGGCCAAACTCAACGGTTTGCCTTGACAGATTGACGCG  
CTCGATGTCGCTATAGGCCTGCAGCGTGATTTCCGGCAATTCGTTCCGGGTTTCATCGGCATTGCTT  
GGCATTCTTCGAAACGCTACCAGCGCCGCAATTGACGCTGGCGTTGGAGAACCTGCCGCCAT  
TCGCGGCGCTGGCGCTCGGCGTCCGCCAGACGCGGTCCGCCAGACGCGGCGGCGGGAGCG  
ACCTGGCGCGACACCACCTCGATGCGCACGCTCAGTTCTTTGATCAGGATGGTCACAGTGTGAA  
AGGCCGCATGTTCTTGACGCTGAACGTCATCTTCTCGATGATCAGCTGGCCGTTTTCCGCGTTCA  
GATCGCCCCAGTCCAAGTCGGTCAGGATGGCGCGCTCAAACCTCCAGGCCGCCTTGGGCACCCC  
TTTCATATCGATGCTGGCCACCAGGATGTCGAACGCCAGCAGACGCTGGTCCCATAGCTGCAAC  
TGGTTAAGGTTGGCTAAAGCCAGAGCGGAAACCGCGCCATCGGCGATGGAGGTCAGGCCGCGG  
CTGAGCGTGAGGCTCTTGCCCTCGTCGGTCTTGATTGACGGGAGTTTTTTTCCCAATCCAGCGT  
ACGCGAAACCGCCAGCCCCGACACCGACTGAAAGCGGATATCGGTCAGGAACGGCATGGCGCC  
CGCCGTGATAAACACCAGAAACGATAGGCGGGCAGCGGAAAAGGAGGGCTGACGGCCACGT  
TTACAGCCTTCTTCGCCAGGCTGGCAATCGGTTGCAAATGCGCTCTCCCTGTAAAAGTCCGGGC  
CGCCGAGAGGCTGCCCGGACTCGGACTTAGTGGAAGGTGACCGTGATGTCGTCGGCCATCAGCT  
CCAGCTGCTCCAGCGCCACCTCATTTCGAACCGCCGTTGAAGCTGGGCGCGGTCAGTTTTTTTCGG  
GAAGGCGTTGGAGACACTCCAGGTCACCACCGGCTTCTGGCCGGTGGCGTCGGTCAGGCTGAC  
GGTGTGTCGCGCTTGTGACCTGGTTGAGCGAGATGGAGTGGATCCAGTCGTAGAACTGGCTC  
TCTTTTTTACCAGGCCGCGCTTGAGCGTGATGTTGATGTCAGACTGCTGGCCCCGCATGTGGAT  
CTTGCCCAGGCCGTGCTTGTAGGTGATGGTGTGCTAGGCGATGTCCAGTCCGGACACCTCGGAA  
AACGCGATGGATTCCCCCAGACGCTGACCACGAAGCGATAGACCGGAATGGGATAGGTATTG  
GCGATATCTGTGGCTTTGACTGCCATGTCAGGCTCCTAGCTTAGGCGCTGATGGATTTGTGGGA  
GAAGGCCAGCTCGATGAACTCGGCCGGGCGCACGGCGCAAGGCCGATTTTGTATGTTTCATGTA  
ACCGTTGTTGATATCGTCTCGGTCATGGTGGTGGCCAGCCCCACCGCCACGTAGAACGCTGT  
TCGGCGGTATCGCCGAACAGAGCGCCCTCCTTCCACAGATTGGTTCAGATAGGTGTCGATCATCG  
ATTTGACCTTGAGCCAGGTCATCGGCGCGTTGGGCTCGAAGACGGCGAAGGCCGTTGGCCAGCTT  
CACCGACTCCTCCACCATGCTGAACAGGCGACGGACGTTGATGTAGCGCCATTCGTTGCTGTTG  
CCGGCCAGCGTGCGGGCGCCCCAGACAGGGTGCCCTGCCCGGTGAAGGAGCGGATCGCGTTG  
ATCGATTTGCCGCTGACCGGATCGATGTTTCAGCTTGCCCTGTTGATCGGCAGTGACGACCACGC  
TCGGTCCGCTGACGGCGGCCAGCGGCACATTGGCCGGCGCCTTCCACACGCCGCGGTCGCCATC  
GGTCTGCGCGTACACTCCGGCTATGGCGGCAGATGGCGGCAGGACCGGGGACTGCAGAGCCAG  
GAAAGCCATGATCTGGGCGTATTCGGCCTGGCCGGTGCTCAGCAGATCCAGCGTGGCCACCGG  
GTTGCCGCGCTGTCTTTACCCCGCTCAGCGCGATCTTCTTCTTCTGCGCGGTTTGCTTCGTCGC  
ATCGAGATCCAGCATCGGCGTCAGCGTGGTGTTCAGATACGGGTAGTAGGCGGGCGCCGTAATTG  
AGCGTGTGAGGGTTCGCGGTGACCTTGTGCGCGAGGTTCTGGGCGGCGGTGGCGTGATCGACGG  
CCGGCACGGTGTGATCAGCGCGAAGCGATCGCCAGGTCATGGGCTTGGGTCAGCATGTAAGT  
GGCGATGTTCTGGTAGTAGTTGGGCAGCGACACCGCCTCCGGCGCCAGCAACAGGGTGACCTCT  
CCAGCTCCCTTGCCCTTGTGATGCCCTTGTGAAAGTCGGCTTCTTGGTGGGTGGCGCTGTTGGTG  
CCCACCGCGATGACATAGGCGTCGCCCGCCCGTTTCAGGTAGAAGTGCTGCACCGCGTAATACA  
GATAATTGCTGGTGTGATCAGCGCGGCGGGATCGCTGACATAGGTGAACTGGCCTGGGGATACTTG  
ATTCAGTGTGCCGTGCAGCCATTCACCCAGGCCAAAATATTTCTGGTAATCCAGCATCGAACTG  
TGCGGCGCACACAGGGTAGGCGCTGGCCGGAACCTGTTGGCCATTGTCGTCAGCGCTTTCTG  
CACGTAGCCGATAAATGCGGGGATGGCGGTGGCTACTTGCGCCACCGAGGGCGCCAGGGTGG  
CACTTCGGTTCACATAAACACCCGGCGTGGTATACGGTTTACTAGCCATGAAGGGAAATCCTTAG

TCTGGCCCTAGACACGCCGGCCACCGCTTGGCGATGGGCCGGGTTGCGGGGCGGGGCTGTGG  
GAAGGGAAAGCGAACGGGGCAGGCGCTTGGGACAAGCCTGGAGCCGAAACGGACTGAGCC  
GTGAAAGTGAGGCTATCTTAGCCGGCGGCCGGCGCTTTGCGGCGGGCGGCGGTCACCATGTGTG  
TGGGGTCGAAATCGTCACTTAATCTTATTCATCACCTTTTGCATGTCATAATATAAATGACAAG  
TTAAGTGACAAATCAAGGTTGTTGCCTTCTTGGCGGACAAGATGTCTTATAATCGACCGTATAA  
GTGACAATGAGAGCTCAAGCATGCTGATCGGCTATATGCGGGTGTCCAAGGCGGATGGCAGCC  
AGGCCACCGACCTGCAGCGCGACGCGCTGAGCGCCGCCGGCGTTCGCGCCGGAACAATGGTATG  
AGGACCAGGCTTCCGGCAAGCGCGAGGATCGCCCAGGACTCGCCGCTGCCTGAAGGCGCTGC  
GCGCCGGCGACACGCTGGTGGTGTGGAAGCTGGACCGGCTGGGCCGCGACCTGCGCCATCTGG  
TCAACACCGTGCACGAGCTGACCGCGCGCGGCATCGGCCTCCGGGTGCTGAGCGGACACGGCG  
CCGCGATCGACACCGCCAGCGCCGCCGGAAGCTGGTCTTCGGCATCTTCGCGCGCTGGCGGA  
GTTTCGAGCGCGAATTGATTTCCGAGCGCACACCAGCGGGGCTGGCCGCGGCGCGCGCGCGG  
CCGCCACGGCGGCCGGCCCTACAAGATGACCGCCGCAAGCTGCGCCTGGCGCAGGCGGGCAT  
GGGTGAGCCGAAACCAAGGTGGCGGAGTTGTGCGCGGAATTGGGCATCACCCGCAAACGCT  
GTACCGCCATGTCTCCCCGCGGGAGAATTGCGGCCCGATGGCGAGAAGCTGCTGGCCGACGG  
ACTGCGGATAAACGCGCGCCCTTCCCTACTTGCCTCGTTCTGCCCTATCCAATCTGGACGAT  
TCTCAAACAAACACTTTCTCTCCGATCTTGGTCCGCTGCTGCTGCCCGCAATCGCCTATGCCAG  
CCCTTTTCATCGCACGCCAGGGTCTCGGGGCTTCGCCCTGAGCAGGCAGGTAGGCTGCACCAGG  
AAGTGAAACGACTGCAGCGCGGCCGTTTGTGATACAGCGGGGTTCCGGCGGTATCACAAACCCT  
ACCTTGTCTCGATTGAAGTCTGCCTTCCGCACGTCTTGTGCGATACAGAATCGGTAACAGGA  
AGAAACGCCAAAAGCATCGCCAGGCGCCATCATGGAAACGGATCGCCGACAGCTCGATCAGA  
CCGCGAGTCAAACACGTACTCAGCCAAAAGATAGCCCGTTGAAACCAGGCAGAAAACGTCAG  
CGGAAACAGTATCGAAAACCGCTGGCGAAACTTAGCGGAAATCAGAACGGCCCCGTTCTGGA  
AACCGATCTGAAATACCTGTTCTTACATGTTTATTGTTGTAATAACAATACTTTTACGAT  
GTTTTTTGTTTTACAACATTAAGATGTATTTTAGGAGCTCGCCATGCACTACCCCGTCCGCAC  
TCTGGAGCAGCTGCGCCCGCTATTGCTTGGCCTGCGCAAGGCGGCGGGGCTGACTCAGGCTCAA  
CTGGCCGCGCGCCTAGGCGTGTCTCAGCAAAGCTACGCCAGGCTGGAAGCCAACCCCGCCGCC  
GCCAGCGTGGAACGCTTGTACCGCGCGCTGCGGGCGCTGGATGCGGAGTTGGCGTTGTCCAGCT  
CCGGCTCCCCTCCTCCGCCATCCGCGCGGATGCGAACGGCGAGGACTGGTGACATGGGCCGCC  
GCAACAGCAGCAAAAATTGCATGTCTGGATGAATGGCCTGCCGTCGGCAGTTGGGAGACCG  
GCCGCGCCGGTGATCGGCTGAATTATTCGACCACTGGCTGGCGCATCCGCAAGCGCGGCCGCT  
GTCTCTGTCCCTCCCCTTCTGCCGGGCAACATGCCGCACCAAGGCGCGGCGGTGGCCGCTTTT  
TCGATAAATTGCTGCCGATAGCGAAGCCATCCGCCGACGACTGGCGCAACGCCATCGTTTGGC  
CGAAGCGTCTCCGTTCCAGCTGCTCTCGGCCCTGGGCCGGGACTGCGTCGGCGCGATCCAGCTG  
CTGCCCGAAGATGAAACGCCGAGGAGCTGCGGGCGATTTCGAGGCGAAGCCTTGGATGAGGC  
CGGCATCGCCGCTTGTGCGCCAGGCTGTGCGGCGGAGCCGCTTGGGCTGAGGGAGGATGA  
CGCGGACCTGCGGCTGTCCATCGCCGGCGCCAGGAAAAGACCGCGTTGCTGCGCCATGCCGAT  
CGCTGGCTGCTGCCGCAAGGCAGCACCCCCACCACCCATATTTCAAGCTGCCGCTGGGCCCTTG  
TAGGCGGGATGCAGGCGGACATGCGTAGCTCGGTGGAATAATGAATGGCTATGCTCGCGCCTGG  
TCGCCGCTTTGGCCTGCCGGTGGCCAACTGCGGCATCGAGCGATTTCGAAGAACAGAAGGCGC  
TGGTGGTGGAGCGTTTTGACCGCCGCTGGCAACGGATGGCGGCTGGATCCTGCGCCAGCCGCA  
GGAAGACATGTGCCAGGCGACGGCCACCCcTCCCATCTCAAATATCAGGCCGACGGCGGGCCC  
GGCATCGCCCGCATTCTGGATATTCTGGCCGGCTCGCAAGCGCGGGAACGCGACCAGATGAACT  
TCTCCGGACCAACTGGTTTTCTGGCTGCTGGCCGCGACAGACGGCCACGCCAAAACCTTCAG  
CCTATTCATTTGCCGGGCGGGCAATATCAGGCCGCCCTTTATACGACATTCTGTCCGCCACC  
CCATCATCGGAACCGGCCGCGGCCGGATCGCGCCGCAAAAGGTCAAGCTGGCCATGGCGGTGC  
GCGGCGGACGCAACCACTACCTGTTGGAACGCATTTCGTTATGGCCATTGGTTGGCCAGGCCAG  
ACAAGCGGGATTGGCGCCGGAGCACGCCGCGCGGTGGATGGATGAGTTAATGGAGAAAACCGG  
CGAGGTGGTGAACCGTTGCCAAGGCATTGCCTGCGGATTTTCCCGAAGACGTGGCGGATTCT  
ATTTTCCATGGCATGCTGCGCCAGCGGATAAATTGGCCATGGGAAAGTTAGTCGGCGACGAAT  
AGCTCATATCGCCACATTACGTTCCCTCCCCTGCTGGATCTAATCTCAAGCTTGGCTAGGTGATG  
AAATTCATGTTTTCAAGCCGCTATTTGGATTTGAA

**>1-7440 (contig 4 Size: 7440 bp)**

CGACCCCTTGCTCTGCCAGCTGCTTCACGGCCTGTTCCAGATAGACGGTATTCCATAGGATGATG  
GCCGCCACCACCAGATTCAGGCCGCTGGCGCGGTAACGCTGGTTTTCGAAGCTGCGGTGCGGGA  
TTTACCCAAACGGTTTAGAAACACGGCGCGGGCCAGCGCATTACGCGCCTCGCCTTTGTTTACAG  
CCCCACCTGGACGCGGCGGCGTAGATCCACGCTCTGTATCCAGTCCAAGGTAACAGCGTGCCT  
TCGATGCGACCCAACTCACGCAACGCCACCGCCAAGCCGTTCTGGCGCGGGTAACTGCCGAGCT  
TGCGCAGCATCAGCGAAGCCGTACGGTGCCTGCTTGATCGAGGCCGCGAGCCGAGGATTTT  
ATCCCAGTGGGCGCGAACGTGCTGAAGGTTGAGCGTGCCTCCTATCAGGCTGGCCAGCGTGGGG  
TAGGCGCTGGCATCCCCAGGAATGTAGAGCCGTTTGTGAGCCAGGTCGCGGATGCGGGGCGCG  
AAGCGGAAGCCCAGCGGAGGCATCAACGCAAACACGTGGTCGGTGAAACCCGCTGTGTGCGGTG  
TAATGTTCTTCAATGCGCAAGTCAGATTCATGGTACAGCAGGCCATCCAGCACGTAGGTCGCAT  
CGCGTGGCGCCGCATGGATCACCTTGATGTGATACGGCGCATACTGGTCGGAAAATGTGAGTATA  
GAACTGCACGCCCGGCTCTTGGCCATGCTTACAGATTCACCTGGCCGCTGACTTGTCCGTGGCCA  
CCAGCCTTGAAGTATTGGCCATCCGAAGAGGACGTAGTGCCTTCGCCCAATGGGCAGCAAAA  
GGTTGGCGCGACTGCGCGTTCACCAACTCCGCCAGCGCAGCTGAGTAGGTTTTCGTCCCGGATGT  
GCCAGGCTTGAGCCAGGTCAGCTTGGCATAAGTGACGCCAGGGCAGGACTCCGCCATTTTGCT  
CAGACCGAGATTGATGGCATCGGCCAGAATGGCGCTCAGCAGCAAGAAACGGTCGCTGGCTTC  
CTTTTCAATTTTTAGGTTGCGTGAAATGGCGGGTGAAGCCGGTCCAGTCATCGACTTCCATCAAC  
AGTTTCGGTGATTTTTAGGTTGCGGCAGCAGCGCATAGGCTGTCCGCAATAGTGCTTCCGCCTCGT  
CGGGCACGGCGTTGTCGAGTGGCGTAATCTTGAGCCGTCCACTGGGCATAATGCAGGCATCTGG  
CAATTCATCCGCAGCCGCCAGCCGTTCCACCGTGGCCAGCCGCTCCCGCAGCAAGGTGAGCCGC  
GACTCCAGATAACGCTCACAATCGGTTTTGATGGACAGTCCCAACTCGTGCCCGCGCTGTTGCT  
CACGAAAGTGCGCCGGCGGCAACAGATATTCCTCGAAATCCTTGAAGTGGCGGGAGTGACAGTA  
CCCAGATATCGCCGGAACGCAGTGCCTTCTCAGCTCAGTCAGGACACATAGCTCGTAAAAGCG  
TCGATCCAGTCCTTCGTCGGTCATGACCAGGTTTTCCAGCGCTTGCGGATGAAGGCGGTGGGC  
GCGTCTTCCGGGACTTTGCGCGCCTGGCGAGCATGCATTCTTTTACGCACCTGGACCGCTCCAG  
CAGCTCCCGCGCCACGGGGGCGGCCTTCAGTTCAGCGATTGCAGCAAGGTGGGCGTGTAGCG  
CCGCAATTTGTCGAACCCTTCTCCATCAATGCCAGGTAGTCGAAATGGGCAGGCTGGGCCAGT  
TGTTCTGCCTCATTGAGGCTGGCGGCGAAAGCTTCCAGGAAATGACGGTTTTCGATGGCGGCGA  
ACGGATCCGTGCCGGCGTCTTGGCTTCCAGCAAGGCGCGACCGATCTGCAAGTACAGCCGCAC  
CTTGTGCTTGTGATGGCCTTGGCGGACTCTTGAAGCGTTCCGCATGGCGGCGCTTGGCCTGATTGA  
ACAGCGAGCCCAGGAAGCGATCATGCAGGTCGAGCGTTTCATCAATCAGCGTGGCGCGCGTTTC  
GAGCAAGATGGCCACCAGCGTGGCGAAGCGTCTGACGGGCGCCAGGTCGCGCAGATGCTGGGC  
GGTCATCTGGCCGCCCTCCCGCGCCAGCTTCAGCAAACGGTTTTTGGTGAATCGCCTTTCCCAACT  
CGGCGGGAAATCCCAACGCCTGTAGGCTGTTTACGTCGCTCCAGATGCGCCAGGATATGTTTGGG  
CTTGGGCGCTCCTGGCGGCTGCCGCAACCACATCAAGCCACTCTCCCGGCTGCCACTCTTGGTCT  
TCAACAAGTCGTCGAGAGCGTGGCAATGCGCGATGGAGAGCGATGCGGTCATGGCCTGATAA  
AGCTGCTGCGTCCCCAAAGATAGGGCTTCGCTGCAAATGCGCTCGATGACGTCCATCGCAGGCA  
AGATGATGCGCTGCTGCCGAGCGAAACGACCAGCGCTTCCGCCAGCGCCATGCCTTGATCAGT  
CTGAAAGGCCAGCTCCGCCAAGGCTGCCACGCAACGCGGGTAGTCATCTGTCGAAAACAGCCG  
CAATTGCAGCCAGGCTTGAATTCCAGCAGGTGCTCGCGCCGGGTCTGCTCCCGCCGACCGTAA  
TCTTCCAGCCGTCAGCGGACAGCTTACAGTGTTCGCGACCCATTGCAACAGCGGTGGAAAGG  
GTGGCTGCCCCATGCCAGGTTGATGCCAGGAAAACGCAGGTAGCACAGCTGCACAGCACAGC  
CCAGACGGTTGGCTGCACCCCGGTGCTGGCGGATAAACGCCAGATCAGCCTCGCTAAAGGTGT  
AGCAGCGGATGATCTCGTCCAGGCTGTCTGGCATGGCCAGCAATTGGGCGCGCTCTTCGGCGGA  
CAGCAGGTTACGGCGGGGCATCCAGCAACTGGGCAAGGCACCTGGGCAACTACCCGAATAGTC  
AGTCAACTCAGGATGACAAAAGCCTAACGTGCTATTTTTTCCGTTTTCTGAGCTGACCCCAAATT  
CGGCTTAGCGTACGATTTTTTCCGTTTTCTGAGACAATCCCTTGAAGACTTCAAGAAAGCCGCTT  
GACCGCAGCGACAAAATCCAGCCGGTACAGGTGCATGGTCAGGTCGATGGCACCGCCCGCCG  
CTTTTTGGTTCGTGTGTCGTACCACTTTGGCCCGTCTGCCAATAGCTCAAAAACCGCCATTGCCA

CGGACACATTGAGGCGAACGGTTGTAGCGGCCTTACGGGCACGAAGTCAGGGTCACGCTTCC  
AGTGCAGGCCAGCCGGTCTAGCGCCTGCTGCACGGTCATGGCCCGCAGGGAATCCAGCAAGG  
CAGGCGAGAAAGAACGCTTGGCGCGGCTCAAGACAACCCCCGGCACACAGAGAGAGGGGGC  
CGCCCTTCGGGCGGCGGGCTACTCCGGGCCTTTGGCCCCTCCGCGCCGTTCCGGCGCTACGCAG  
CGGTGGGTAACCTCGTTTGCAGTTACCCACCGGCTTTGCGGGCTACTCGCATTGAAAAATGCG  
GGGGGCTACTCAAAGGCAGGCGCTTCGCGCCGGGCGAGGGCTTCGCCATTAGTAATACGCAGG  
GACTTGTCTCACGCATTGGCCGCACCTTCTCCCCCTGTAATACGCAGGAACTTGTCTACTGGC  
AGACATGGGCTTGCCAGCGCGATACCAGCTTGCAGCGGCTCATTCCAAGGCTTCCCACGGCTTT  
TGCCGGGTACAGGAGTTGGCCTCGTAGGTTGCCCGCTCCACCGCCCCAGCGGCCCGCCTGCGGG  
CCTCGTCGCGCTTCTGTGGCGCTCTGCTGCCACGTCCCGGCTAACCAGCGTGCAGTGTGCTGC  
TGTTTCGTCGTCGGTGTATGCCAAACAGGCTGATGAGCGTGTATTCTTCGGAGTGTAGAGCGGGC  
AAAGCTGCTTGGCGTTGAACTCGATTTTTtCCCcGGCCTCGTGCAGCTTGGCCTTGCTGTACAGCG  
TCATCAGTTCGGCGCTGCGGTAGCTCCATGCCGGTCAAGCTCGCGGGCCAGTGCTGCGGCCTC  
GTGGTACATCTGGCCGCTGTGCGTGGCACCGGACAGCAACAGGAAATTGAGACGCCAGAAAAG  
GTGCGTCATGCGCTGGCCATCGTTCACGCCGCCCGGATCTCGGCCAGCCGCCGAGATCCTCC  
AAGCGATCCCAAGCCAGTTGCCGCCGCTGAACCCGCGCAGGTTGCCGTTTTCCCGCCCGGTA  
GGAGCTTGAGCTGGCGACGGTTCGGCGCGGGCCTTGGCGTCCGATGTCCAGCGTGCAC  
CGGCAAGAGCGTTTTCCGCCAGATACTCGAATCCATACCGGAGCGGCTCGCCGTCGCGCCGTTGT  
TGGACGTGAACGACACGGCAGACCTCGCCGTTTTGCTGTTACCGTGTGACCAGCCGCAGAA  
CGCGGCTGGCATCCTTGGCCGAGGGTCGGCCCCGAGTCCGGCCAGCCGGTCGATGAGGTGAC  
GCTGGCAGGCGTTCAGCGCGGCAGCGCGGCACGCGGCAAGGTGCCGTCAGCAGCCATTTAG  
CTTGAAGCCCACGCCCGCTATAGACCAGCAGCGAGGGGgCCGGAATGCCCTCTTCTTGGCAGCG  
GTACAGCACCGCGGCGGCCAGTTCGTCGGGGCTACGGCCTGCGGCCACGGCTCGCGGTAGGT  
GTCCAGATCGGCGAACAGTAGCCCGATGCGGGCCAGATTGACCACTCGGCGATTGGCCTTGATG  
AACTCGGCTTGTGACAGCCAGGTATCCCGGCTGTGGTCGAGGTGGGATAGCACCGTGGGCATGA  
GAGACAGCCGGTAGCTGTCCTGCTTCTTGTGCTTGTTCGCTGGTGGCGATCAGCAACGAGAA  
AAAGCCCTGTGGGCTGTGTCGTGATAGCAACCCGCCTCATCGGTGGGGCTGAATAGTCGTAAC  
TGCGCTGACTGCATGCGCCTCTTCCCTCTTGTGCGACAAGAGGTAGGGCGCTAGAATGTGAGCT  
AAGAATCTGGTGTTACCCACGTGCCACGTGCTAGCCCCTTCGGGTTCCAAACAGTGCCACCTG  
TACGGTTCCCACCTCTTGCCAAGCCTCGCTGCCACGCGGGGCTTTGCTTTTTCAATCTGTGCAAT  
TCCGCTCCTTTGCCGTCAAGGTTTCGCGGAACCCACCCTGTCGCGTCTGCCGTCATTGAAGGACT  
CCATGCTGTGCGAGCACGGCGGCTGCGCCGTCGAACGACCGGAAGAACCGCACACCGCCCCGG  
TACTGCCCGAGGATGCGCCGCTCGTTTTCCGATGTGCAGCACGATACCAGCCCTTGCTCCGTGTT  
CCTGATCGCTGCCCCGTGGATTCATGGGGAGTTGCGTTCGCAAACCTCCTTGAACACCGCAGGC  
GGCAGCACCTGTAACCTCAACGGTTCAGAATCGACCATCGCTTTATAACCCACATCCCGTTTTTC  
AGCAACATTATTCAATTCGCACGTCTCAAAAAGTATGGAACAGAGTCCATACACGGCGGCTA  
CGCCTGATCGCCGCCCTCGATGCGCAAGCCCGTTTTCGAGGGCCTGAAAAATCGCCAGATTGATG  
ACGGCGGCGCGGCTTTGCCAAGCTGGGCCGCTCGCTCGTCAACGCGGGCCAGTAGCGGCTCCG  
CAATGGTTAGGGTGATCTGTACTTTCTTGCCCTTGCACACCCTGCGCGGGGCCCTCTGGTGCCGTG  
GCGGCCGCATCGGGCGCACCACTGATAAAGGCATCGGCGGTGGTCGGCTTACCAGGCTTTTTTG  
TAATCGCCATTTTATCTATCCTAAATCTCTAAAACGCATTTTTTtAATATTAACAATGCGTTAA  
CAAGTGCAATTTAGCTCCGCGCTCGCCTTGGCATCTGCGGCTTGATTTCAAGCACTGACAGGCC  
CGCTCCTGCGGCGTTGGAAAACGCCTTGCAGCTGCGTAGCGGAGTTGGCAGATAGGCGAACTGG  
GGTACGTCGGCCACGGCTGCGGCGGCTTCGGCGTTGTGCGTTCGAGTGTGCTCGCCGGGGTTCGGCAC  
AGTTGAGCACCGCAAAGGCTCGCAGGCCGTCGCGCACGCTGCGGGCCTCGTCCACCAGTGCGG  
CAATGTCGTTCAAAGCCATACGTCATAGCTGCGCGGCTGGAATGGCACCAGAGCACATCCG  
ACAGGACGAGGGCGGCACGTAGGGCCGTCGAGTGCAGCCCGCCTGCGTTCGATCACCACATCGT  
CAAACGTGCCCGCCTGCTGCTGCACCTGTGCCCGCAGCGTTGGGCCGTCTGGGTAGGTGGCGC  
ACGCAATGCCGGGGAGTGCCCCGCTCGGCCCGGATGCTGATTGCGGTTTGTGCGGTGCCTTG  
CCTGTCGCCATCAATCAACCACACGTCGCGCCCCGACAAGGCGCGGGCAATCGCCAGATTGACC  
GCAATCGTGGTCTTGCCACGCGCCCTTGGTGTTCCTCAATGGTGACAATCATTTTACCTCACT  
TTAATATTAACAACACTATGCAATTATAGTTAATTCGATGTATTTGTCAATGTCAAGCGGATGCAA

AAAATCCCGCACTTGGCGGGGCTTTTCAGGGGTCGCAAGGGTCAGTCAGCGAGCCGGGGGCCA  
CTGCTGGGCCGCATGGAGTACGCGCAGCACGGCCAGCGTGTCCGCTCGTCTCGATGCGATAC  
ACCATGACGTAATTGGGCCGCACGACGATTTCCCGTGTGCCGCGCACGCGGCCTGTTTTGTAGA  
GGGTAGGGTGCTGCCGCGCCTGCTCGGCCTTGGCCTCGAACTCGTCGTCAAGCTCGATGGCCGC  
TGCCGGGTTATCCTGCGCGATGTAGTCCATGATGGTGTGCGGGTCGGCCAGTGCCATAGGCCGC  
CAATCAAGCCGCATCACC GCGCCGCTGCCGCAATGCGGCCTTACGGGTAGCAAACCGGGCGC  
GGGCCTCATCGTCCGGTACGCTGGGGCGCGGGTCGTCGATGCTAGCCTGCACCTGCTCACGGAA  
CCACGTGTCATAGGCGGGCGGCTTCGTGGGCACGCTTCAACGCCTCGGCCCGGTTCGGGCCTGCGG  
GTCGCGGATGCCGCTCGGGGTCGTAGTTCGCCGCGTCCACGTGCAAGCGGGCAATGCCAATCT  
CCTTGAGGTAGGAAACCAGCGTCTCGAACTTGGCGAACAAGCGCACCTGTCGGCTGCGCTGCGC  
GGCCAGTGGCCGCTCGGTTCATGCCGACTTGACCAGCACGGCCAGCCGCCGCTCTGGCCACG  
ATGTGGGCACCCCTGACC GCTCCGGCCTCCACCAGCCGGGACAGGGTGCCGTGGTCAATGGTTT  
CTGCTGCCATGTCGTCACCTCACTTTTTCCAATGGATCCGCGTTGCGGATAACTATTGACATTCT  
ATGCAAACAACAGTTATTTGCAAGGTGTACTTTTGTTGAAGTGCTCAACTACTGGCGCTGTTGCA  
TAAATCCAGAACAGGGTAATCCCCCAGAAATTAGTCGTCGTCTGAAGTAGAATTTTCTCCAAC  
AGGATTGAAGGGTGTCAATCAG

### > 1-3062 (contig 14 Size: 3062 bp)

TTTGCTGCGCAAATTGTTGTTCCGCTCCTCCGGAGGGGGCTACCGCCTCGCTGTGCTCGTTGGT  
GGTACCGACCTGAAACGCATCGGCTCGTTGGCCGATACGTCCCAGCTCGGCAGCTCGAAATGG  
GCGTCCGTGATAGACGGTAGATTTGGGGGGTTGgAACGGAGAAGGGGGTCAAGGGGGTCGTGGAA  
TAAATGGGCCGGTTTCATCGGCCCGTTTTATGCCGCGAAAGCCCCCTTGATGCCTTCGCAGTGACC  
CACGCTCACGGCAGGGGTGGGGgTGGCTTTTCGCCCCcAGCCCCGACGCTCGCGGGCGAGAG  
CGGAGGTTTGGAGGCAGAGCCTCCAAGGTCTGGTTTTCTGTTTTTTTCGGACTTGTGCAGTTTTA  
CAGGAAAACCGACGTGGCCAAC TGGCCGCGGTGCCGCAACGGGCGGCACACCAAAGGCGG  
GCAGTGCCGGCCTTGGCCGGTCAATTTCTGCTGTTGCGGGCTTGCCCGCCCTATCGCGCCGTTGGC  
GCATAAGCCAGCCGAGCGCACCCAGCGCGAGGGCACCCCTTTGGGCTGGCACATAACCGGTTGCA  
GCGTGGCCACATAGTCCTCGTTTTTTAAGATCGTTTTTTAAGAAAAGCGTTTTTTAGGGGGCTGGAA  
CCCGCTTCAGCTAAGGCTCTCCGGGGAGGAAATGGAACATTTTCCGGGTTCGTATCCACAGGGAA  
ATGGAACATTTTCCGGGTTACTGGAACATTTTCCGGGCCGTATCCACATATGGAACATCTTTT  
GTTTGTGTTCCATGTGACGAAATGGCACGATGGTTCATCGTTCCAGTAACCCGGAGGTTGTTCC  
ATATGAAGCGTGAAACAGCTGCAGCCC GGCAGGTGCAGGCAGCGCATGAGCTACCATCCGGCA  
AGCTCCGGGTACCATGTCCAACGCACTGACCACGGCGGCACAACGCCTATCACTGGCTGAAA  
AGCGGGTGATGATGTACGCCGTAGGCAAGCTGGATAGCTTCAAACACAACGGCGGCACCGAGG  
CGGGCATGGTTAAGCTGGTAGCGCACGAGTACGCCGAGCTGTTTGGCGTGGACGCGAACACCG  
CCTACGAGCAGCTGCAGGCGTGTGCCGAGAGCATCATCAACAAACAAGTCTGGTGGTATGAG  
GAGGCCAAACCGGCCTCAAGAAAAAGCAAATCAACTGGCTGGGCGCTGCCGAGTACTACAAG  
GGTGAAGGCACCGTGTGCTGTGGTTACGGCCAGATTGCACCACACCTTTTGCAGCTCAAGG  
GGCAGTTCACCACGTACCAGCTGGCGCAGGCGTCTGCGCTTCGCTCGGTCTACTCGTGGCGAAT  
GCTGGAGCTGCTGAGCCAGTACGCCAGCACCGGCTGGCGCCAGATCGAGCTGGACGAGTTCCA  
CCACGCGATGGAGACCCAGAGGGTTACAAGGCCAACTTCAAGATTCTCCGGCAGCGGGTCGT  
AGAGCCTGCCGTGAAGGAGTTGCGCGAGAAGGATGGCTGGCTGATCGAGTGGATTCCAATCAA  
GACCGGCCGGAAGGTTACGTGCTGCGCTTCGAATCAAACGAGACCCGCAAGGGCAGTTAGC  
GCTATGAAACGGAACATCAACCGAGGTTGCGCCTACCTGACCATCATGCTGCGTGAAGTGTGTTT  
TTGCCGAGCTTGCTGAAGACTAAAGCGAGACTGCATTACCATCCAAGACTCGGCAGAACGGCC  
AAACTCTCTCAAGAGCAATTGCCATATCTGCTGTAAGTGATGCCTTCCCATCGATTAGCCTAC  
TGATTGCTGACGTGGAAAACCCATAACGTTTACGCCAGGCTCTTCTGGGTCATACCGGCAGGTTT  
GACATAAGCGAGTTGCAGGTA CTCCCCGGGTGCATTGTGATCATATCTAGTCCTTTTTGCGCGT  
TGCGCAACGCGCAATATTCACCTTAAAAAAAaGCTATTGACAGCTATCACCCAATTGTGATAGC

LISTIK, 2014. Plasmídeos naturais de *Chromobacterium violaceum*: Análise de sequências e construção de um vetor para transformação genética.

TTCAAATGATTTGGCGCATCAATGGCATGATTACTTTTAAACGTGCAAAGTGAAGTGTAACGTG  
TCGTTTCTCTTGGCGTCAAATAAAACGTTAAATACACAGGAGAAATTGCATGATTAGTGAAAACG  
ATATTGTCCACAAAGGGCTAAAGAAGTTCTGGGTTAGTAATGGGAAAGATAAGAGTGGAATCA  
CTCCGTCACATGAGAAGTCAATCCGTCTCATCCTTGTTTACCTAGACAGTGCCACCTGCCTAGAT  
GACATTCTGACAGGTCTCAAGAATGCCAAACCACTCGAAGGAGGTCGGTACAGCATGGAAGTC  
AACGGCAACTGGCGCATCACCTTTGACTATAACGAGGCGGCCAGCAAGGTTGAGAAGATTTATT  
TGGAAGACCTTCATGGTCCCGGTGGGGCGAAGAAGTTCTGACGTACCAGCAGGGAGAAGAAGC  
CTACAGCCTTAGCTGTGGGCCTCTTTGTGACCGTTCCTGTTGTTTGTATTGCTCTTGCAGTTTTGG  
TGCGACCTGCTGGATCTCGGCCCGGATGGCGTTTTGCTGCTTGGGGTCAGCGCAGCCCGGAGAA  
TGCCGCGCAATCGCGTTTTTCGACGCTCTCAGGTGCCTGACCATTACCCGCAATGGCTTCGCGCA  
CTGTAGCGACCTCTACGGCCCGCAATCGACCTTGCTAGGGTCGCTACCGGCCTGTTTAATGGC  
TTCCGACGCCTTGAGTCCGAACGTGTAGGTTGCTCCGGCCCGTTTGCAGCTCTGGCAGCTCC  
GTGACACGTCGCTGCACCTCTGCTGCCACTTCGACCCTCTGAGCCTCCTCTGCGGCCTTCTGACG  
GGCTTCCTGGAGCTTTTGCCTTTCTCTGCGTCTGCACACGCTTGCCTGCGCTCCTGCGCCTGCTCA  
CTCCTCCGGCGTGAATAACTGGGCGATGCTGAACAGCTTGTTTCGCTCAACTCCAGCTTGGCCG  
ACCGCTGCACGTAGTGGCTGTTGACTGCTTCAGCTCGCCACCTTGAACGGAGGGCTTCCGC  
TTCCTTGGCCTGCGCCTGATGGCGACGGCCGTCGCCACGGCGgCATCCCcTcTGT