

355

O PAPEL DAS REGIÕES PROMOTORAS NA ATIVAÇÃO DO OPERON QUE CONTÉM OS GENES *nif* USV DE *Azospirillum brasilense*. Friedrich D, Schrank I e Passaglia L. M. P. (Centro de Biotecnologia, Deptos de Biologia Molecular e Biotecnologia e Genética, UFRGS.)

A bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* encontra-se associada a raízes de gramíneas de grande importância econômica como, por exemplo, cana-de-açúcar, milho, trigo, arroz e diversas forrageiras. Os genes envolvidos no processo de fixação de Nitrogênio são denominados *nif* e estão envolvidos na síntese e no funcionamento do complexo enzimático da Nitrogenase. A transcrição desses genes é dependente da proteína NifA, que se liga em uma região denominada UAS, presente na região reguladora, em torno de 100 pares de bases do sítio de início da transcrição. Estudos anteriores da ativação do operon contendo os genes *orf2nifUSVorf4* de *A. brasilense* demonstraram que a funcionalidade do promotor independe da presença da proteína NifA. Análises da sequência de DNA desta região identificaram sítios com características de sequências promotoras dependentes da RNA-polimerase complexada com o fator σ^{70} . Assim a região reguladora do operon em estudo possui: 2 possíveis regiões promotoras para o fator σ^{70} , uma região ativadora UAS e uma região -24/-12 característica de genes ativados pelo complexo RNA-polimerase- σ^{54} , típica de genes envolvidos no processo de fixação de Nitrogênio. A fim de caracterizarmos melhor o papel dessas sequências reguladoras foram desenhados *primers* que amplificam um fragmento de 221 pb contendo apenas uma das regiões para σ^{70} , a região UAS e a região -24/-12. Esse fragmento foi purificado em gel de agarose, teve suas extremidades preenchidas e foi ligado no vetor pUC18, clivado com *Sma*I. A reação de ligação foi utilizada para transformar *E.coli* XLI. Das colônias transformantes obtidas foi extraído o DNA plasmidial e aqueles plasmídeos que apresentaram um padrão de migração diferente do plasmídeo selvagem foram clivados com *Eco*RI e *Pst*I. Os plasmídeos recombinantes com o fragmento de 221 pb clonado serão sequenciados para determinação da orientação da clonagem. Os recombinantes que apresentarem a orientação desejada serão clivados com enzimas de restrição *Eco*RI e *Bam*HI e clonados em pMC1403. A dosagem da atividade de β -galactosidase será, então, realizada para confirmar se a região reconhecida por σ^{70} ainda influencia a transcrição dos genes desse operon. (CNPq-PIBIC/UFRGS, Fapergs)