

295

CLONAGEM E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *FIXABCX* DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*. Sperotto, R.; Gross, J.; Schrank, I. E Passaglia, L. (Centro de Biotecnologia, Deptos de Genética e de Biologia Molecular e Biotecnologia, IB-UFRGS).

Para realizar a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) para formas quimicamente reativas (p. ex. amônia), os microrganismos diazotróficos utilizam o sistema enzimático nitrogenase. Esse sistema é extremamente complexo e depende da ativação coordenada de diversos genes, entre eles os genes *fixABCX*. Esses quatro genes formam um único operon, sendo transcritos conjuntamente e controlados segundo o sistema geral de fixação de nitrogênio pela proteína reguladora NifA. O operon *fixABCX* está sendo caracterizado em *A. brasilense*, onde os genes *fixA*, *fixB* e *fixC* já foram totalmente seqüenciados. A região reguladora deste operon apresenta três seqüências UAS, que são sítios para a ligação da proteína NifA. A expressão *in vivo* da atividade das regiões promotoras de diversos operons de genes relacionados ao processo de fixação do nitrogênio em *A. brasilense* tem sido realizada pela fusão entre a região promotora e o gene *lacZ* em nosso laboratório. Nesse trabalho demonstramos que a atividade da região promotora do operon *fixABCX* é dependente da presença da proteína NifA. Para isso, a região promotora foi isolada por PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, o qual foi clonado no vetor pMC1403. O plasmídeo recombinante, pMCpfix, foi transformado em linhagens de *E. coli* MC1061 contendo ou não o plasmídeo pCK3, que expressa a proteína NifA de *K. pneumoniae* constitutivamente. Através desses experimentos foi possível demonstrar que o promotor do operon *fixABCX* somente ativa a transcrição do gene *lacZ* na presença de NifA. (Apoio: Fapergs e Propesq-UFRGS).