

Avaliação da estabilidade de dsRNA em diferentes condições de cultivo e armazenamento

Murillo Emery de Carvalho Neto¹, Tiago Antônio de Oliveira Mendes¹, Isabela Malaquias Dalto de Souza¹

¹ Laboratório de Biologia Molecular (LBM)

ODS 2 – FOME ZERO E AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

Pesquisa

Introdução

Os RNA de interferência (RNAi) são moléculas pequenas de RNA não codificante que controlam a expressão gênica. Diferentes tipos de RNA, como miRNAs, siRNAs e dsRNAs, podem iniciar esse processo, que tem aplicações em áreas como medicina e agricultura.

A estabilidade do dsRNA é afetada por temperatura, pH e radiação UV. Baixas temperaturas preservam a molécula, enquanto calor e pH inadequados causam degradação. Embora mais estável que RNA de fita simples, sua durabilidade em longo prazo ainda precisa de comprovação.

Técnicas laboratoriais permitem avaliar essa estabilidade, sendo essencial mais estudos para garantir a eficácia do dsRNA armazenado sob diferentes condições.

Objetivos

Testar visando a otimização de produção de dsRNA, diferentes meios de crescimento de bactéria (LB e TB), temperaturas e concentrações de IPTG e, também, avaliar durante 45 dias, o efeito de diversas temperaturas de armazenamento na viabilidade do dsRNA.

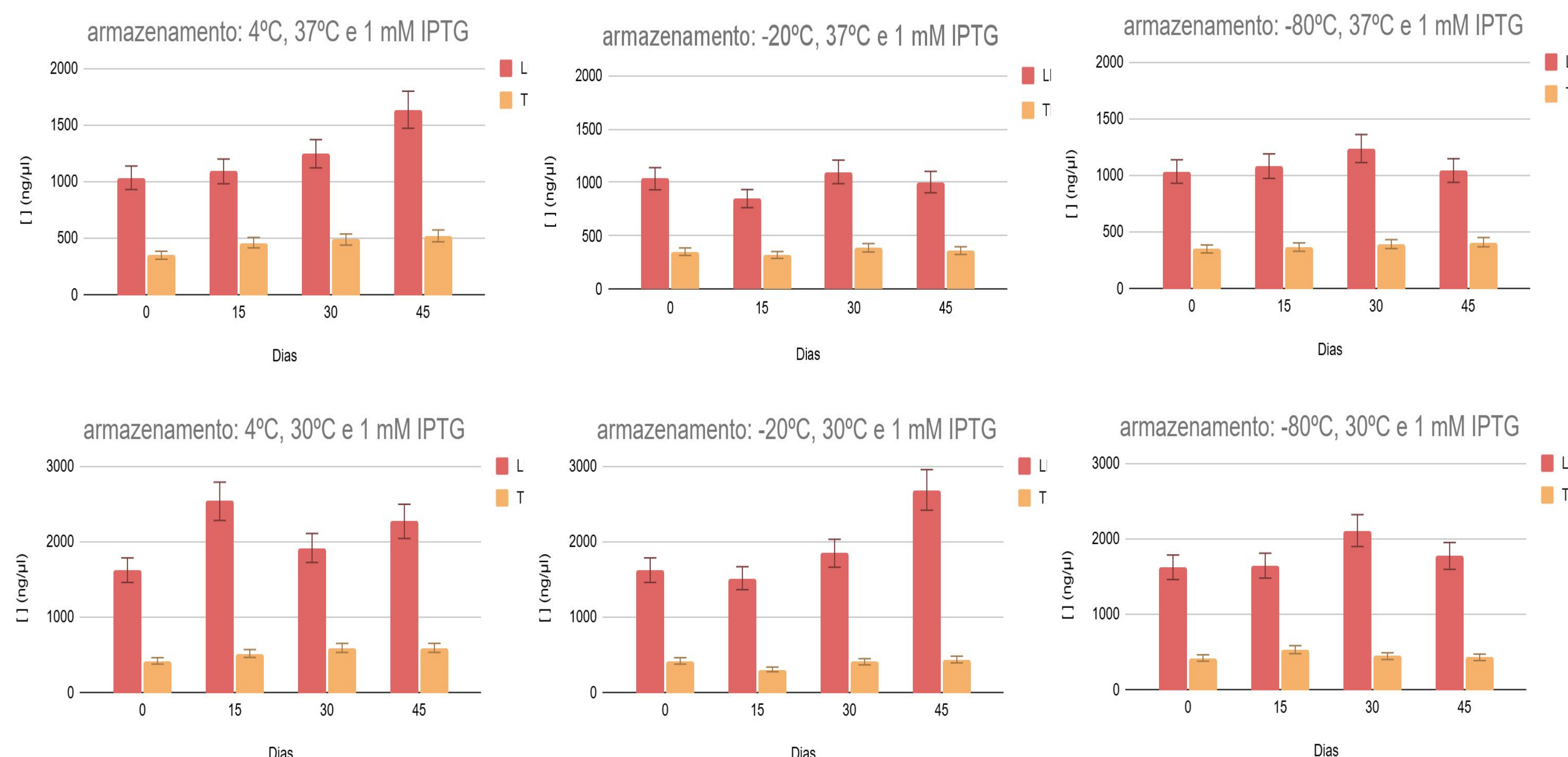
Metodologia

Para a extração do dsRNA foram utilizadas células transformadas de *E. coli* HT 115, de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989). Seguindo o protocolo de Papić et al (2018) foram feitos pré-inóculos das células transformadas de *E. coli* HT 115 utilizando 12 mL de meio líquido LB e TB.

O dsRNA, foi armazenado em três diferentes temperaturas, sendo elas: 4°C, -20°C e -80°C e, a cada 15 dias. Aos 15, 30 e 45 dias após produção, o dsRNA foi quantificado em NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) para avaliar a concentração e a pureza das amostras, nas proporções 260/230 e 260/280 e também foi realizada a avaliação da qualidade do material por eletroforese com gel de agarose a 2%.

Apoio Financeiro

Resultados



Conclusões

Ao final de 45 dias e das análises, concluiu-se que o dsRNA produzido a 37°C foi o mais estável, permanecendo íntegro independentemente do armazenamento. A utilização de baixas concentrações de IPTG (0,5 mM) levaram a uma degradação mais acelerada do dsRNA. O meio LB mostrou-se mais eficiente para conservar a estabilidade do que o meio TB. Por outro lado, o dsRNA gerado a 30 °C já apresentava baixa atividade logo após a extração sofrendo degradação significativa em todas as condições testadas.

Tais resultados fornecem dados fundamentais para otimizar as condições de produção, formulação e armazenamento de dsRNA destinado a aplicações biotecnológicas.

Bibliografia

PAPIĆ, Ljubomir; RIVAS, José; TOLEDO, Soledad; ROMERO, Jaime. Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant *Escherichia coli* HT115 in fed-batch culture. *Biotechnology Reports*. [S. l.]: Elsevier BV, Dec. 2018. DOI 10.1016/j.btre.2018.e00292.

ROSA, J. DA et al. Optimizing dsRNA engineering strategies and production in *E. coli* HT115 (DE3). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 51, 1 jan. 2024. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae028>

BAI, M. et al. Influence of diverse storage conditions of double-stranded RNA in vitro on the RNA interference efficiency in vivo insect *Tribolium castaneum*. *Pest management science*, v. 79, n. 1, p. 45–54, 26 set. 2022. DOI 10.1002/ps.7171