



XXIV
Mostra
de Iniciação
Científica

SEMANA DO
CONHECIMENTO

A Universidade em movimento

De **7a10** de outubro de 2014



RESUMO

Desenvolvimento da Proteína de União a Maltose recombinante

AUTOR PRINCIPAL:

Helenize Molozzi

E-MAIL:

109779@upf.br

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Probic Fapergs

CO-AUTORES:

Rafael Pandolfi, Michela Miani, Luiz Carlos Kreutz e Rafael Frandoloso

ORIENTADOR:

Rafael Frandoloso

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

5.05.02.00-0 Medicina Veterinária Preventiva

UNIVERSIDADE:

Universidade de Passo Funso

INTRODUÇÃO:

A Proteína de União a Maltose (MBP) é uma proteína nativa de *Escherichia coli* comumente utilizada no desenvolvimento de proteínas de fusão recombinantes. Vetores de expressão contendo MBP aumentam significativamente a solubilidade de proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, prevenindo a agregação da proteína de interesse e possibilitando sua fácil purificação mediante cromatografia líquida de afinidade por metal imobilizado (IMAC) (1). Neste trabalho, descrevemos a purificação da MBP recombinante expressa como parte da proteína de fusão His-Mbp-Tev-TbpB, clonada no vetor pET20 modificado.

METODOLOGIA:

O DNA plasmidial contendo a construção his-mbp-tev-tbpB foi purificado a partir de células de *E. coli* TOP10 mediante um kit comercial (Wizard® Plus SV - Promega). Em seguida, 50ng do DNA purificado foi utilizado para transformar quimicamente células de expressão de *E. coli* ER2566. As células transformadas foram cultivadas em meio líquido (LB) suplementado com ampicilina (100 g/ml), até alcançarem uma D.O. de 0.5, mediada a 600nm. Após expressão (12 horas), as bactérias foram submetidas a uma lise mecânica (desruptor ultrassônico) e a proteína de fusão, purificada mediante cromatografia líquida de proteína, utilizando-se uma resina composta por sefarose carregada com níquel. A continuação, a proteína de fusão foi submetida a uma digestão com a protease TEV (Tobacco Etch Virus), e a proteína MBP, purificada através de uma coluna de intercâmbio iônico (sefarose-Q). A presença da proteína MBP foi confirmada por meio de um gel de proteínas em condições desnaturizante (SDS-PAGE).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

O desenvolvimento de proteínas recombinantes para uso em vacinas, métodos diagnósticos e terapias curativas é cada vez mais pretendido. Imunologicamente e com relação às vacinas clássicas, inúmeras vantagens podem ser atribuídas às vacinas modernas constituídas por antígenos recombinantes e, a que merece mais destaque, consiste no direcionamento específico das respostas imunológicas contra moléculas chaves para a sobrevivência dos microrganismos dentro do seu hospedeiro natural. Diversos sistemas vetoriais para a produção de proteínas recombinantes estão disponíveis no mercado, e a utilização da MBP como proteína de fusão associada, além de aumentar a produção da proteína de interesse, melhora sobremaneira, sua solubilização quando comparado com outros agentes solubilizantes (tirodoxina e Glutathione S-transferase) associados a proteínas de fusão (1, 2). Neste estudo, demonstramos a expressão de uma proteína de fusão de *H. parasuis* constituída por MBP (His-Mbp-Tev-TbpB). Mediante condições de cultivo convencionais, obteve-se aproximadamente 3 mg de proteínas por litro de cultivo induzido, colocando de manifesto o alto rendimento proteico do sistema de expressão utilizado (vetor pET20 + *E. coli* ER2566). A partir da proteína de fusão, realizamos um corte enzimático com a protease TEV e conforme esperado, verificou-se a presença de duas proteínas, uma com peso molecular de 68 KDa, referente a proteína TbpB intacta e outra, de aproximadamente 42 KDa, referente a proteína MBP (Figura 1). Ambas proteínas foram ultra-purificadas em uma coluna de intercâmbio iônico, sendo a proteína MBP eluída mediante adição de um tampão contendo 150 mM de NaCl, e a TbpB com 50mM de NaCl (Fig. 1). A proteína MBP ultra-pura obtida neste estudo, será utilizada para o desenvolvimento de anticorpos policlonais em coelhos. Estes anticorpos serão utilizados para a detecção mediante Western Blotting de proteínas de fusão (MBP+) normalmente desenvolvidas em nosso laboratório.

CONCLUSÃO:

Mediante um protocolo convencional de expressão de proteínas e dupla purificação utilizando a combinação de uma coluna de metal (níquel) e outra de intercâmbio iônico (sefaroze-Q) é possível obter altas concentrações de proteína MBP ultra-pura, a partir da construção His-Mbp-Tev-TbpB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kapust RB, Waugh DS. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1999;8(8):1668-74.
2. Tropea JE, Cherry S, Nallamsetty S, Bignon C, Waugh DS. A generic method for the production of recombinant proteins in Escherichia coli using a dual hexahistidine-maltose-binding protein affinity tag. *Methods in molecular biology*. 2007;363:1-19.

INSIRA ARQUIVO.IMAGEM - SE HOVER:

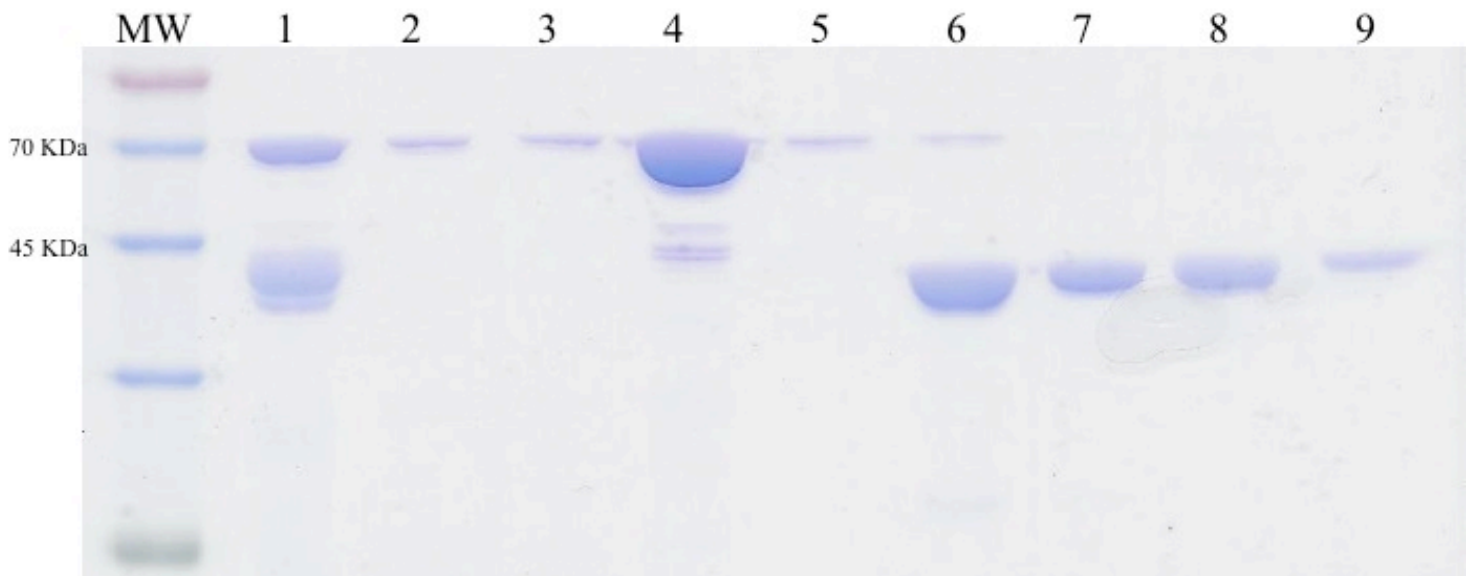


Figura 1. Gel de proteína SDS-Page. MW: marcador de peso molecular. 1: Proteína de fusão cortada com TEV. 2: Proteínas não unidas a coluna de sefaroze-Q. 3: Lavado da coluna. 4: Proteína TbpB eluída com 50mM de NaCl. 7: Proteína MBP eluída com 150mM de NaCl.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador