



CLONAGEM POR RESTRIÇÃO E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEÍNA IMUNOESTIMULATÓRIA

JOÃO VICTOR MOUTTA DE CARVALHO; CHRISTIANE ELISE MOTTA DUARTE; MARCO AURÉLIO FERREIRA

Introdução: Com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se possível, através de ferramentas de biologia molecular, introduzir moléculas de DNA recombinante em células para a produção de proteínas de interesse terapêutico. Nesse contexto foi pesquisado a possibilidade de expressar uma lectina que em ensaios pilotos mostrou possível atividade imunoestimulatória. Essa lectina foi isolada de *Brassica oleracea* ssp, *botrytis*, (BOL), contudo, sua purificação a partir de floretes de couve-flor apresentou baixo rendimento. **Objetivos:** Clonar o gene BOL em vetor de expressão bacteriano e expressar a proteína recombinante em *Escherichia coli*. **Metodologia:** O gene BOL foi clonado por restrição enzimática no vetor pET28a, a seguir procedeu-se a transformação de *Escherichia coli* (E.coli) DH5 α para a propagação do DNA plasmidial. O vetor foi extraído da bactéria através de mini-preparação por lise alcalina e utilizado para transformação da cepa de expressão Rosetta, por choque térmico. A expressão de BOL foi induzida pela adição de 0,8mM de isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 horas a 37°C ou 48 horas a 20°C. Os extratos celulares foram avaliados por meio de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. **Resultados:** A transformação por eletroporação e replicação do gene BOL em cepas de DH5 α foi confirmada pela presença de colônias cultivadas em meio sólido seletivo com o antibiótico de seleção, canamicina e pela análise eletroforética em gel de agarose do DNA plasmidial extraído de E.coli DH5 α , que foi utilizado para a transformação da cepa Rosetta. As colônias transformantes foram inoculadas em meio líquido e a expressão de BOL foi induzida pela adição de IPTG. Na análise por eletroforese em SDS-PAGE não foram identificadas bandas expressivas que poderiam corresponder à fração induzida da proteína de interesse, com peso molecular aparente de 35kDa, em comparação a fração não induzida. Assim, sendo necessários novos testes com condições modificadas como a concentração de IPTG, tempo de indução e outras cepas de expressão. **Conclusão:** A expressão heteróloga de BOL nas condições testadas apresentou resultados inconclusivos, indicando que as condições de expressão devem ser otimizadas para que seja possível produzir uma lectina recombinante capaz de ser utilizada em ensaios biológicos futuros.

Palavras-chave: Cepa, Recombinante, Lectina, Vetor, Expressão.