

**TITLE:** ANÁLISE *IN SÍLICO* E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N) RECOMBINANTE DO SARS-COV-2 EM *ESCHERICHIA COLI*

**AUTORS:** GREGIO, B.<sup>1</sup>; BORGES, P.H.G.<sup>1</sup>; DIONÍSIO, M.F.A<sup>1</sup>; SILVA-RODRIGUES, G.<sup>1</sup>; ANDREASSA, E.C.<sup>2</sup>; TAVARES, E.R.<sup>1</sup>; SOUZA, T.A.C.B.<sup>2</sup>; YAMADA-OGATTA, S.F.<sup>1</sup>; YAMAUCHI, L.M.<sup>1</sup>

**INSTITUTION:** 1. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA - UEL, LONDRINA - PR (Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, km 380. Campus Universitário. Londrina - PR. CEP: 86057-970) - BRASIL; 2. INSTITUTO CARLOS CHAGAS, FIOCRUZ/PR - CURITIBA - PR - BRASIL.

## ABSTRACT

Após um surto na província de Hubei, China, em 12 de dezembro de 2019, foi identificado uma nova espécie pertencente aos beta-coronavírus, denominado de SARS-CoV-2. Este vírus é agente etiológico da COVID-19, uma doença caracterizada como uma síndrome respiratória aguda grave. Os coronavírus são vírus envelopados, compostos por RNA de cadeia única sentido positivo, envolto por uma proteína fosforilada, a proteína do nucleocapsídeo (N). A proteína N desempenha papel importante no empacotamento viral quando associada a outras proteínas, podendo ser alvo terapêutico e de diagnóstico para detecção viral. Este trabalho teve como objetivo a análise *in silico* da proteína N do SARS-CoV-2 e sua expressão em *Escherichia coli*. As sequências de aminoácidos/nucleotídeos da proteína N foram obtidas em modelo FASTA do servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information), através da busca “nucleocapsid SARS-CoV-2”. A proteína N foi analisada *in silico* pelo programa Epitope Database para predição das sequências homólogas e de epítomos de linfócitos T e B. Para expressar a região imunogênica da proteína N, o gene foi artificialmente sintetizado e subclonado em vetor pET28a. Células competentes de *E. coli* BL21-Star (DE3) e BL21-plysS foram transformadas com o plasmídeo pET28a-proteína N. Para produzir a proteína recombinante, bactérias transformadas foram cultivadas em LB suplementados com 1mM de IPTG em três diferentes temperaturas: 20°C, 35°C e 37°C. A expressão do antígeno recombinante foi verificada em SDS-PAGE (fração total e fração solúvel) e confirmada por *western blot* com anticorpo anti-histidina. A análise *in silico* demonstrou que o tamanho da proteína N completa é de 47 kDa, apresentando as seguintes regiões imunogênicas 42-62, 153-172 e 355-401. A expressão da proteína recombinante apresentou melhores resultados quando induzida na temperatura de 37°C, utilizando a bactéria *E. coli* BL21-Star (DE3) como hospedeira. O resultado da separação proteica por SDS-PAGE mostrou que a proteína recombinante de 47 kDa foi observada na fração total e na solúvel, sendo considerada uma proteína solúvel. A proteína N recombinante foi confirmada pelo *western blot*. Desse modo, conclui-se que a análise *in silico* é uma ferramenta eficaz para predição de epítomos e projeção de proteínas recombinantes. A expressão da proteína N recombinante em *E. coli* BL21-Star (DE3) foi otimizada para o crescimento em uma temperatura de 37°C para produção da proteína N em larga escala.

**Keywords:** Proteína do nucleocapsídeo; análise *in silico*; expressão de proteína recombinante

**Development Agencies:** CNPq, CAPES