

TITLE: PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE DUAS PROTEÍNAS N RECOMBINANTES DE SARS-COV-2

AUTORS: GREGIO, B.¹; BORGES, P.H.G.¹; DIONÍSIO, M.F.A¹; SILVA-RODRIGUES, G.¹; ANDREASSA, E.C.²; TAVARES, E.R.¹; SOUZA, T.A.C.B.²; YAMADA-OGATTA, S.F.¹; YAMAUCHI, L.M.¹

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

SARS-CoV-2, o beta-coronavírus responsável pela COVID-19, é composto por aproximadamente 29 proteínas. Quatro são identificadas como proteínas estruturais - proteína Spike (S), do nucleocapsídeo (N), do envelope (E) e proteína de membrana (M). Dentre elas, uma das mais relevantes é a proteína N, a qual é responsável pela regulação do processo de replicação viral. O uso dessas proteínas na pesquisa é de grande importância, entretanto, a dificuldade de manuseamento deste vírus em laboratório torna necessário o trabalho com proteínas recombinantes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi purificar duas proteínas N recombinante expressas no vetor de expressão pET28a em *Escherichia coli*. As regiões clonadas foram: proteína N completa (clone 1) e a proteína N parcial, representando apenas as regiões imunogênicas (clone 2). Os plasmídeos contendo os genes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* BL21-star (DE3). As proteínas recombinantes, contendo uma cauda de histidina, foram expressas a 37°C em meio suplementado com IPTG. As bactérias foram lisadas por sonicação com tampão de lise e centrifugadas, coletando-se os sobrenadantes. Para purificação das proteínas foram utilizadas colunas de cromatografia contendo sais de níquel, que possuem afinidades com a cauda de histidina. Para obtenção das proteínas, foram utilizadas uma solução eluente contendo imidazol em sete concentrações diferentes: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75% e 100%. As proteínas foram analisadas em SDS-PAGE 13% e quantificadas pelo método de Bradford. Após separação das frações eluídas das proteínas através de SDS-PAGE, observou-se que o clone 1 apresentou uma maior quantidade de proteínas nos eluatos das concentrações de 20 e 30%, já para o clone 2 observou-se nas concentrações de 10 e 20%. A quantificação da proteína apresentou como resultados para o clone 1: 1,5 mg/mL para 20% e 0,659 mg/mL para 30%; e para o clone 2: 1,7 mg/mL para 10% e 1,6 mg/mL para 20%. Portanto, pode-se concluir que é importante padronizar a purificação das proteínas recombinantes, e que para a proteína N a concentração de imidazol ótima para a purificação foi de 20% para uma melhor extração da proteína em ambos os clones.

Keywords: Proteína do nucleocapsídeo; purificação de proteína recombinante; SARS-CoV-2

Development Agencies: CNPq, CAPES