

EXPRESSION DA LECTINA TRUNCADA de *Bauhinia variegata* EM *Escherichia coli*.

KNABAH, Paula¹; REIS, Larissa², PINTO, Luciano³

¹Universidade Federal de Pelotas / Curso de Biotecnologia; ²Universidade Federal de Pelotas/ Curso de Biotecnologia; ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia- UFPEL. paulaknabah@gmail.com.

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas capazes de se ligar em carboidratos desempenhando papéis biológicos importantes na comunidade vegetal, na interação parasitária, na atividade anti-HIV. As lectinas estão presentes em todos os organismos, sendo encontrados em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados) e em vírus (SANTOS et al., 2001). As lectinas mais investigadas e bem caracterizadas são as pertencentes à Leguminosae (CAVADA et al., 2001). A especificidade da grande maioria das destas lectinas se dá por possuírem sítios de ligação por oligossacarídeos (RIBEIRO et al., 2006).

A expressão de lectinas vegetais em sistemas de produção de proteínas recombinantes é um meio de produzir proteínas de interesse biológico. Se se trace uma relação entre a sequência, estrutura e função (RIBEIRO et al., 1999). Desta forma, a clonagem dos genes que codificam para essas proteínas pode ser considerada uma etapa importante na produção de proteínas recombinantes para estudos biotecnológicos (LUCAS et al., 2006).

Recentemente as sequências de DNA de lectinas foram identificadas em *Bauhinia variegata* (PINTO et al., 2008). Esta planta é uma leguminosa da subfamília *Caesalpinioideae* e tem sido usada tradicionalmente para tratar bronquite, lepra, tumores e úlceras (KIRTIKAR e BASU, 1998) e demonstrar atividade antibacteriana (ALMEIDA et al., 1999).

A expressão dessas lectinas tem sido testada em sistemas procariotos e eucariotos, mas com sucesso limitado (CAMACHO et al., 2006). Segundo Moreira e colaboradores (2010), a lectina BVL-I de *B. variegata* possui uma terminação que pode ser utilizada como um ponto de clivagem (YOUNG et al., 1995). É reconhecida e utilizada como um ponto de clivagem (YOUNG et al., 1995).

Neste trabalho objetivou-se clonar e expressar a lectina BVL-I truncada de *B. variegata*, a fim de verificar a influência da terminação de 15 aminoácidos na atividade da lectina expressa em *E. coli*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Clonagem do gene *bvl*

O gene *bvlI* foi amplificado por PCR a partir do vetor TOPO 2.1-*bvlI* construído previamente (Pinto, utilizando-se dígnucleotídeos iniciadores específicos. Após amplificação, o produto de PCR com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), digerido sequencialmente com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Kpn*I (New England Biolabs) em duas reações separadas, de acordo com instruções. Em seguida, o produto digerido é purificado com o kit de ligação ao vetor pAE previamente digerido com as mesmas enzimas.

O produto da ligação do vetor *bvlI* foi transferido por eletroporação para a *Escherichia coli* BL21 (DE3) ClonExpress F. A fim de selecionar os clones recombinantes o DNA plasmídico de cada colônia foi analisado em gel de agarose 1% (JOUGLARD *et al*, 2002), tendo o plasmídeo circular não recombinante como

Expressão da proteína recombinante

Os clones recombinantes foram transformados na cepa de expressão e foram testadas quanto a sua expressão.

O teste de expressão foi feito em pequena escala (10 mL de caldo LB/ampicilina/clorafenicol), com a DO_{600} entre 0,5 e 0,7. A expressão foi induzida com IPTG 0,3 mM e 1 mM por 3 horas a 37°C. Pellets de alíquotas foram usados para eletroforese em gel de poli-acrilamida 12%, para verificação da expressão. Western blotting foi realizado para confirmar a presença utilizando-se anticorpos policlonais de coelho produzidos contra a lectina BVL nativa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 é possível verificar a amplificação do gene *bvlI* utilizando-se os iniciadores específicos. O fragmento gerado possui 763 bp, menor que o esperado para o gene nativo (876 bp).

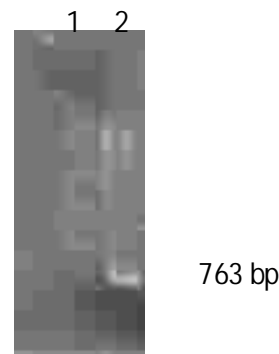


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1%. (1) Marcador de peso molecular 1 kb. (2): BVL-I truncada.

O produto de PCR foi purificado, digerido, ligado no vetor pAE e transferido para a *Escherichia coli* BL21 (DE3) ClonExpress F. A técnica de screening sugeriu que apenas um adensado era recombinante. Esse lote foi usado para a extração de plasmídeos. Após a confirmação da inserção do gene no vetor de expressão, este foi usado para

expressão heteróloga da proteína BVL em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, de acordo com Sambrook & Russell (2001). A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% indicou a presença da proteína recombinante esperada conforme demonstra a Figura 2.

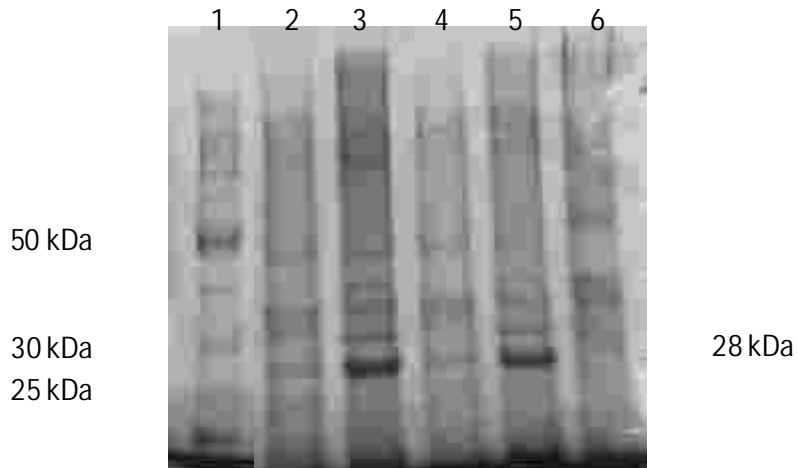


Figura 2: Eletroforese da expressão da proteína BVL induzida em *E. coli* pLysS em gel de poliacrilamida 12%. (1): Marcador de massa molecular: BenchMark Protein Ladder. (2): pAE-bvl *E. coli* pLysS Não induzido. (3): pAE-bvl *E. coli* pLysS Induzido com IPTG 0,3 mM. (4): pAE-bvl *E. coli* pLysS Não induzido. (5): pAE-bvl *E. coli* pLysS Induzido com IPTG 1,0 mM. (6): Controle negativo (somente a cepa).

Através de *Western blotting* confirmou-se a presença da proteína recombinante BVL-I a partir do vetor pAE-bvl e constatou-se que a utilização das diferentes concentrações de IPTG não influenciou significativamente os níveis de expressão, como demonstra a figura 3.

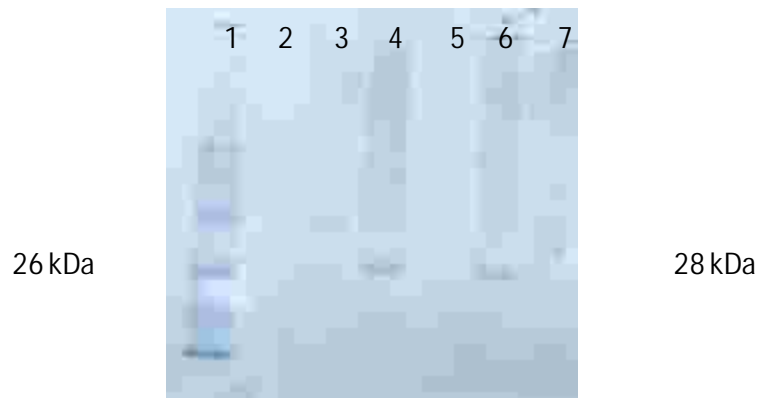


Figura 3: *Western blotting* da proteína BVL expressa a partir do vetor pAE-bvl. (1): Marcador de massa molecular: BenchMark Pre-Stained Protein Ladder. (2): pAE-bvl *E. coli* pLysS Não induzido. (3): pAE-bvl *E. coli* pLysS Induzido com IPTG 0,3 mM. (4): pAE-bvl *E. coli* pLysS Não induzido. (5): pAE-bvl *E. coli* pLysS Induzido com IPTG 1,0 mM. (6): pAE-bvl *E. coli* pLysS Induzido com IPTG 1,0 mM. (7): Controle negativo.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as etapas para a produção da proteína recombinante foram realizadas com sucesso e a expressão da proteína em *E. coli* cepa pLysS, a qual pode ser utilizada em ensaios biológicos.

5 REFERÊNCIAS

SHANMUGHAM, L.N. et al. Relevance of plant lectins in human cell biology and immunology. **Rivista di Biologia**, v. 99, p. 227-49, 2006.

TRINDADE, M.B. **Purificação, caracterização e estudo de novas lectinas ligantes de quitina das *Artocarpus***. 2005. 127f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

RAEMAEKERS, J.M.R. et al. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. **European Journal of Biochemistry**, v.265, p.394-403, 1999.

LUO, S. et al. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zentner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v.69, n.2, p.184-191, 2005.

MOREIRA, Gustavo; PINTO, Luciano; OLIVEIRA, Taian; MOURA, Tales; SAMPAIO, Alexandre; DEBRAY, Henri; PINTO, Vicente; DELLAGOSTIN, Odir; CAVADA, Benildo. **Previsão da Estrutura Tridimensional da Lectina BVL-I In: CIC UFPEL, XIX, Pelotas, 9-12 de Novembro, 2010. Resumos, Pelotas: UFPel, 9-12 de Novembro, 2010.**

PINTO, Luciano; NAGANO, Celso; OLIVEIRA, Taian; MOURA, Tales; SAMPAIO, Alexandre; DEBRAY, Henri; PINTO, Vicente; DELLAGOSTIN, Odir; CAVADA, Benildo. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v.33, n.3, p. 355–363, 2008.

YOUNG, Martin; WATSON, David; YAGUCHI, Makoto; ADAR, Rivka; ARANGO, Rafael; RODRIGUEZ-ARANGO, Esperanza; SHARON, Nathan; BLAY, Pearl; THIBAUT, Pierre. C-terminal Post Translational Proteolysis of Plant Lectins and Their Recombinant Forms Expressed in *E. coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 6, p. 2563-70, 1995.

CAMACHO, NaPINEO, Luciano da Silva; DELLAGOSTIN, Odir **Artôni o. EX IRE SSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA Lectina BVL-I de *Bauhinia forficata* EM *Escherichia coli* In: CIC UFPEL, XV, Pelotas, 5-7 de Dezembro, 2006. Resumos, Pelotas: UFPel, 5-7 de Dezembro, 2006.**