



**SEFIC2017**  
**UNILASALLE**

**A PESQUISA E O**  
**RESPEITO À DIVERSIDADE**

16 A 20 DE OUTUBRO DE 2017

ISSN 1983-6783

## **PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DnaK DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EM *ESCHERICHIA COLI***

Camila Bolson Bortoluzzi<sup>1,2</sup>; João Ismael Budelon Gonçalves<sup>1,2</sup>; Thiago de Jesus Borges<sup>1,2</sup>  
(orientador)

<sup>1</sup>Universidade La Salle, <sup>2</sup>PUCRS

**Área Temática:** Ciências Biológicas.

**Resumo:** As proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*, ou Hsps) são proteínas conservadas evolutivamente, sua indução se dá por sinais de estresse, incluindo estresses ambientais (como calor, mudança de pH, por exemplo) e estados fisiopatológicos como febre, inflamação e infecção. Apesar de serem consideradas proteínas intracelulares, elas podem ser mobilizadas para membrana plasmática ou liberadas no ambiente extracelular, podendo interagir com outras células e exercendo funções imunomoduladoras. A DnaK de *Mycobacterium tuberculosis* é ortóloga das Hsp70s de mamíferos e possui efeitos anti-inflamatórios em modelo animais de transplante de pele, asma e artrite. O objetivo do trabalho é expressar e purificar a DnaK de *M. tuberculosis* (MtbDnaK) de maneira recombinante para posteriormente testar seus efeitos moduladores em um modelo animal de sepse. Para a produção da DnaK recombinante, sintetizamos o plasmídeo pET23a+/MtbDnaK na empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA). Esse construto consiste na inserção do gene da MtbDnaK (NC\_000962.2) no plasmídeo pET23a+ (Novagen), que possui o gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Transformamos a cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* com o plasmídeo. Para padronizar a expressão da proteína, as cepas foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) ágar com ampicilina pelo método de esgotamento, para isolamento das colônias. Retiramos uma colônia e colocamos em meio LB (5mL) com ampicilina para crescer no *Shaker* (overnight; 37°C; 180rpm). Após o crescimento, retiramos 1ml e inoculamos em 100 ml de LB com ampicilina. Incubamos a cultura no *shaker* (37°C; 180rpm) até que a OD (absorbância) atingisse 600nm. Após atingir a OD<sub>600</sub>, separamos o volume total em tubos estéreis com 10ml cada, para realizarmos a indução de IPTG em diferentes concentrações (controle sem IPTG, 2mM, 1mM, 0,5mM e 0,1mM) e com diferentes durações (durante 3 horas e *overnight*). Como resultado, observamos que as bactérias cresceram no meio com ampicilina, sendo confirmada a transformação. Conseguimos isolar as colônias a partir do método de esgotamento. O inóculo atingiu a OD<sub>600</sub> após 2 horas e 15 minutos, todas as condições testadas apresentaram uma boa indução da produção da DnaK. Porém, a condição de crescimento *overnight* sem IPTG foi a com melhor rendimento e, portanto, foi a escolhida para a sequência do procedimento. As perspectivas do projeto são, padronizar a purificação da DnaK por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de ATP-agarose, remover e testar os níveis de endotoxinas contaminantes nas preparações.

**Palavras-Chave:** DnaK, *Mycobacterium tuberculosis*, proteína recombinante.