



SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA XXVIII SIC

paz no plural



Evento	Salão UFRGS 2016: SIC - XXVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2016
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Clonagem da subunidade AgB8/1 do Antígeno B de Echinococcus granulosus em vetor para expressão em Picchia pastoris
Autor	ANA CAROLINE SILVA SILVEIRA
Orientador	ARNALDO ZAHA

Clonagem da subunidade AgB8/1 do Antígeno B de *Echinococcus granulosus* em vetor para expressão em *Pichia pastoris*.

Ana Caroline Silveira, Edileuza Danieli da Silva, Arnaldo Zaha (orientador)

Ecchinococcus granulosus é um helminto pertencente à classe Cestoda, causador da hidatidose cística, uma doença caracterizada por causar cistos em diversos órgãos, principalmente fígado e pulmão dos hospedeiros. O cisto é uma estrutura unilocular preenchida por líquido hidático que contém os produtos de excreção/secreção do parasito, assim como proteínas do hospedeiro. A proteína mais abundante no cisto é o antígeno B (AgB), uma lipoproteína de aproximadamente 150-230 kDa, formado por subunidades de 8 kDa codificadas por uma família multigênica, do qual já foram descritos genes que codificam para cinco subunidades diferentes, denominados EgAgB8/1 à EgAgB8/5. O AgB tem sido descrito em diversos mecanismos que auxiliam no estabelecimento e sobrevivência do parasito no hospedeiro intermediário, mostrando um importante papel na biologia do parasito. O objetivo geral deste trabalho é expressar a subunidade AgB8/1 do antígeno B de *E. granulosus* na levedura *Pichia pastoris*, possibilitando estudos sobre estrutura e função. A sequência codificadora da subunidade AgB8/1 já clonada em pGEX-4T-1 foi amplificada por reações de PCR primária e o produto foi diluído 1:150 e utilizado como molde em uma reação de PCR secundária para inserção de extremidades complementares ao vetor. Para a clonagem por recombinação homóloga, células DH5 α competentes de *Escherichia coli* foram transformadas com o plasmídeo pPICZ α C linearizado com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI e a sequência codificadora amplificada da subunidade AgB8/1. Foram preparadas três reações contendo 50 ng de cada DNA, sendo um controle positivo com vetor íntegro, um controle negativo com vetor clivado e a amostra com vetor clivado e o produto da amplificação da sequência codificadora da subunidade AbB8/1. As amostras foram incubadas à 37°C por aproximadamente 2 horas, depois os transformantes foram selecionados no meio LB *low-salt* contendo o antibiótico Zeocina e mantidas em estufa à 37°C *overnight*. A eficiência das células foi satisfatória, mostrando que a transformação foi eficiente com o vetor íntegro. As colônias que cresceram na reação de recombinação foram analisadas por meio de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos (AOXI_F e AOX1_R) para amplificação da região do DNA no sítio de clonagem do vetor. Todos os fragmentos apresentaram aproximadamente o mesmo tamanho quando analisados em gel de agarose 1,2%, mostrando que nenhuma colônia era recombinante. A clonagem da subunidade AgB8/1 foi repetida, mediante uma nova amplificação da sequência codificadora e inserção de um passo de purificação do produto de PCR, previamente à transformação, onde foi utilizado o kit de purificação de DNA GFX™ (*GE Healthcare Companies*). Seguindo a metodologia já realizada, as células DH5 α competentes foram novamente preparadas e transformadas com o vetor linearizado pPICZ α C e o produto da amplificação da subunidade, desta vez utilizando 100 ng de cada DNA. As reações foram incubadas por 2h30 e os transformantes foram novamente selecionados em meio LB *low-salt* contendo Zeocina e incubados em estufa à 37°C *overnight*. As colônias estão sendo analisadas por meio de reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos, para avaliar se algum recombinante foi obtido. (Apoio: PIBIC, FAPERGS, CNPq)