

EXPRESSÃO, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA P36 DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE, FUSIONADA COM GST. Rodrigo Maron Carlessi, Gabrielle Salton, Fernanda Munari, Jomar Pereira Laurino (orient.) (UFRGS).

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da pneumonia micoplásmica suína (PMS), uma doença de distribuição global que ataca o rebanho suíno, causando grandes perdas econômicas. A PMS, apesar de dificilmente levar à morte do animal, caracteriza-se por uma alta taxa de morbidez e difícil diagnóstico. Contudo, Stipkovits L, *et. al.*, (1991) mostraram que anticorpos policlonais feitos contra a proteína p36 de *M. hyopneumoniae* poderiam ser utilizados para o diagnóstico da doença por meio da técnica de imunoblotting. Assim, o objetivo deste trabalho é expressar e purificar a p36, fusionada com GST (p36-GST), em *Escherichia coli*, com a finalidade de utilizá-la no desenvolvimento de testes diagnósticos para PMS. Células de *E.coli* da linhagem BL21 transformantes, carregando a ORF da p36 clonada no vetor pGEX-4T1, foram submetidas a várias condições de cultivo para a otimização da expressão. Verificou-se que a condição ótima é de 5 horas a 37° C, 250 rpm e 0, 2 mM de IPTG. A proteína, após a lise das células por sonicação, apresentava-se insolúvel. Então, foram testados Triton-X-100 e Sarkosyl, ambos em diversas concentrações, na tentativa de solubilização da proteína. O tratamento com Sarkosyl solubiliza quase 100% da p36-GST, contudo não permite a ligação posterior da molécula à resina de afinidade glutathione sepharose 4B. Já o tratamento com Triton-X-100 a uma concentração de 1% solubiliza cerca de 30% da p36-GST e a fração solúvel liga-se eficientemente à resina de afinidade. Toda a padronização da expressão, solubilização e purificação foi monitorada em SDS PAGE corado com comassie blue. A quantificação das amostras de proteína purificadas foram feitas pelo método de Bradford e o processo de purificação se mostrou eficiente, com um rendimento de 42, 5 mg de p36-GST por litro de cultivo bacteriano.