

066

CLONAGEM DO GENE DA HSP70 HUMANA: PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO DE SURDEZ NEUROSENSORIAL AUTOIMUNE. *Rodrigo de Almeida Vaucher, Luiz Carlos Rodrigues Junior, Cristina Bonorino* (Instituto de Pesquisas Biomédicas- HSL- PUCRS).

A HSP70 é a mais conservada de todas as proteínas, mantendo a homeostase celular frente a diferentes estresses, como o calor. Mais recentemente na escala evolutiva, a HSP70 assumiu um importante papel na defesa imunológica. Ela age como citocina, realizando imunomodulação; introduz peptídeos na rota de apresentação pelo MHC de classe I e é um importante antígeno em infecções e doenças autoimunes. O objetivo desse trabalho é clonar o gene da HSP70 humana em vetor plasmidial, expressar e produzir a proteína de forma recombinante. Para isso foi desenhado um conjunto de primers para o gene que codifica a proteína, mas contendo nas extremidades sítios para as enzimas de restrição. Após amplificação o gene foi clivado com essas enzimas e ligado ao vetor pUC 18 e o produto da ligação utilizado para transformar bactérias *Escherichia. coli* linhagem XL1-blue. A partir desta clonagem, sequenciaremos o gene e o subclonaremos testando dois sistemas de expressão, o sistema pGEx da Pharmacia e o sistema Gateway da Invitrogen. No primeiro, é produzida uma proteína de fusão com a GST, no segundo a proteína é produzida de forma nativa. A seguir, a proteína é purificada por cromatografia de afinidade em coluna de ATP-agarose, seguida por cromatografia de troca iônica com DEAE- Sephacel e descontaminação de LPS (lipopolissacarídeo) em colunas Detoxi-Gel, sendo a pureza e a concentração final da proteína determinada em gel SDS-PAGE e espectrofotometria. A proteína obtida será então utilizada nos diversos projetos do laboratório. Para este bolsista, o projeto é testar a proteína como antígeno em um kit diagnóstico desenvolvido em nosso laboratório. (Fapergs, PUCRS).