

Genética Molecular II

333

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EIF2 BETA HUMANO E PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-EIF2 BETA. *Rodrigo Maron Carlessi, Gabrielle Salton, Fernanda Munari, Claudia Laurino, Jomar Pereira Laurino (orient.) (UFRGS).*

O uso da molécula de eIF2 beta (subunidade beta do fator eucariótico de início da síntese protéica 2) como alvo em terapia gênica celular está sendo explorado por nosso grupo. Atualmente, estão em fase de andamento em nosso laboratório ensaios in vitro visando ao bloqueio da proliferação celular por inibição de síntese protéica em células de mamífero. Contudo, para a detecção específica da expressão de eIF2 beta, será necessária a produção de anticorpos anti-eIF2 beta humano. O objetivo deste trabalho, portanto, é a expressão heteróloga em *Escherichia coli* e a purificação da proteína recombinante, bem como a produção de anticorpos policlonais anti-eIF2 beta humano em coelho. Para isso, a região codificadora de eIF2 beta humano foi clonada no plasmídeo de expressão PinPoint™ Xa-1. Diversas temperaturas de cultivo, linhagens de *E. coli* e concentrações de IPTG foram testadas visando à produção da maior quantidade de proteína na forma solúvel. Entretanto, apesar de ser produzida em grandes quantidades, em todas as condições testadas a proteína se mostrou extremamente insolúvel. Os corpúsculos de inclusão foram, então, lavados com Triton X-100 1%, Tween 20 1% e uréia 1M, o que permitiu a retirada de proteínas de membrana e outros debris celulares, no entanto sem solubilizar a proteína de interesse. Após a lavagem, o precipitado foi solubilizado com uréia 8M. A análise por gel de poliacrilamida-SDS mostrou eIF2 beta humano com alto grau de pureza após o processo de lavagem do corpúsculo de inclusão. Tal preparado está sendo utilizado na imunização de coelhos da raça Nova Zelândia, com a finalidade de produzir soro policlonal hiper-imune anti-eIF2 beta humano. Esse soro será utilizado na detecção de eIF2 beta por Western Blot em extratos de células de mamíferos em cultivo.