



CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE EIF2 BETA

Maurício Schiavo (Probic/Fapergs), Claudia Laurino, Ana Paula Longaray Delamare, Sergio Echeverrigaray, Jomar Pereira Laurino (Orientador(a))

A síntese proteica é considerada um dos mais complexos mecanismos biossintéticos celulares. Aproximadamente trezentas macromoléculas diferentes cooperaram para a síntese polipeptídica. Os primeiros passos do início de síntese proteica são as principais etapas regulatórias de todo o processo de tradução. Neste sentido, a formação do complexo ternário, a qual ocorre pela ligação do heterotrímero de eIF2, Met-tRNA_i e GTP é o mais importante passo regulador de toda síntese proteica. A caracterização de formas mutantes da proteína eIF2 beta, não funcionais no processo de tradução, pode representar uma ferramenta molecular para a terapia gênica com a finalidade de diminuir a proliferação celular. Uma limitação para mostrar o trânsito destas moléculas na célula reside no fato de que os anticorpos comerciais existentes não possuem uma boa afinidade e sensibilidade aos epítomos *in natura* de eIF2 beta. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma ferramenta imunológica que possa ser utilizada para a detecção da expressão das formas selvagem e demais mutações de eIF2 beta em células de mamíferos em cultivo a serem analisadas por "Western-Blot" e por imunofluorescência. Neste sentido, a região codificadora de eIF2 beta humano foi clonada em plasmídeo de expressão em procariotos Pet 23^a(+). *Escherichia coli* BL21DE3 Codon Plus-RIL transformadas com este plasmídeo recombinante foram selecionadas com ampicilina e induzidas com IPTG para realizar super-expressão da proteína eIF2 beta humana recombinante. O extrato de proteínas totais foi obtido pela lise bacteriana utilizando lizozima, detergentes e sonicação. A seguir este extrato passou por processo de purificação cromatográfica de afinidade em coluna de Níquel NTA. A proteína de fusão eIF2 beta humana recombinante foi eluída com imidazol. As amostras obtidas das eluições cromatográficas foram dialisadas e concentradas. Os eluatos foram mensurados pelo método de Bradford. Alíquotas destas purificações foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS para análise de pureza e degradação proteica. Apenas uma proteína com peso molecular de aproximadamente 58kDa, correspondente a eIF2 beta humana foi observada. A proteína eIF2 beta purificada humano está sendo utilizada na imunização de coelhos para a produção de anticorpos policlonais anti eIF2 beta humano.

Palavras-chave: eIF2 beta, Anticorpos policlonais, Início da tradução em eucariotos.

Apoio: UCS, Fapergs.