

21.007 - Regulação da Transcrição e Transdução

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PERIPLÁSMICA DE ENDOSTATINA MURINA RECOMBINANTE

EM *ESCHERICHIA COLI*¹Balduino, K. N. ******; ²Chura-Chambi. R.M. ******; ³Morganti, L.; ^{1, 2, 3}Centro de Biotecnologia, IPEN;

Objetivo:

A endostatina é uma proteína, que está relacionada à inibição da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), processo importante para o crescimento de tumores.

Para a produção desta sequência polipeptídica, utilizou-se a bactéria *Escherichia coli* como hospedeira, devido a rapidez e baixo custo na produção de proteínas heterólogas. Este trabalho tem como objetivo escolher a melhor, entre 4 cepas de *Escherichia coli*, que expressam a proteína endostatina bem como otimizar algumas condições para esta expressão.

Métodos e Resultados:

Foi utilizado o plasmídeo pTRC contendo o promotor *trc*, ativável pela adição de IPTG e o peptídeo sinal pelB para a secreção periplasmática da proteína. Foram plaqueados 3 colônias de células transformadas com plasmídeos pTRC-endo (contendo o gene da endostatina) e pTRC de bactérias de cada uma das seguintes cepas: W3110, RB792, HB2151 e BMH7118 em placas de agar LB contendo ampicilina. As células foram cultivadas a 37° C sob agitação por 16 horas. Os pré-inóculos foram diluídos 100 x em meio LB contendo ampicilina até que a D.O. (600nm) atingisse 1,0, quando então iniciou-se a ativação pela adição de IPTG (0,5 mM final), cultivando-se por mais 4 horas a 37° C sob agitação. Aliquotas foram estocadas a -20°C e posteriormente aplicadas em gel SDS-PAGE para análise por Western blot. Verificou-se que a melhor cepa

produtora de endostatina foi a W3110. Esta cepa foi então utilizada para o teste da melhor densidade óptica para a ativação. Foram testadas as D.O.s de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0, e as amostras novamente analisadas por western blot. A densidade óptica escolhida foi de 1,5. Outras etapas para otimização da expressão da endostatina por *Escherichia coli* ainda estão em andamento.

Conclusões:

pelas análises realizadas até o momento, a cepa que melhor expressou a endostatina foi a W3110, seguida da RB 792, as cepas HB 2151 e BMH 7118, apresentaram pouca ou nenhuma expressão. A melhor expressão foi obtida quando a ativação foi realizada em D.O. de 1,5.

Apoio Financeiro: FAPESP

[imprimir](#)