

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE UMA FOSFOLIPASE A2 A PARTIR DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *BOTHROPS ERYTHROMELAS*

Natália Malavasi Vallejo e Patrick Jack Spencer
CNPQ / PIBIC

OBJETIVO

Geraiis: Obter o cDNA de glândula de veneno codificando para alguma proteína de interesse farmacológico.

Específicos:- Transformar por eletroporação os cDNAs da glândula de veneno de *Bothrops erythromelas*, os quais estão inseridos em pGEM-11Zf(+), em *Escherichia coli*; - Purificar plasmídeos contendo insertos de cDNA;Seqüenciar estes clones, com o intuito de buscar a Fosfolipase A₂; - Analisar e alinhar as seqüências em banco de dados; - Construir primers, afim de amplificar a seqüência codante do DNA da PLA₂; - Realizar PCR, com o objetivo de amplificar a seqüência da Fosfolipase A₂; - Subclonar a fosfolipase A₂ em vetor de replicação (pGEM-T easy); - Subclonar a PLA₂ em vetor de expressão; - Padronizar um protocolo de expressão de proteína.

METODOLOGIA

Uma biblioteca de cDNA no vetor pGEM 11Zf(+) da glândula de veneno de *B. erythromelas* foi cedida pela Dra. Camargo-Guarnieri. O plasmídeo contendo cDNA foi transformado em *Escherichia coli* DH 5 α por eletroporação, estes foram purificados pelo método da lise alcalina [1]. O sequenciamento foi realizado utilizando a tecnologia "Big Dye" e as amostras foram analisadas em sequenciador ABI 370. Foram feitas análises por alinhamento usando o programa BLAST e DNASTar.

Foi obtido um cDNA codificando para fosfolipase A₂, que foi amplificado através de PCR, e logo depois foi subclonado em vetor de expressão pET-

20b(+). Os resultados da expressão podem ser visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida [2].

RESULTADOS

A partir da purificação dos plasmídeos, foram obtidos vários clones que foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Dentre os clones sequenciados, obtivemos a seqüência de um cDNA codificando para uma fosfolipase A₂ de *Bothrops erythromelas*, contendo 753 pares de bases, seqüências 3' (1 a 87 pb) e 5' (505 a 753 pb) não traduzidas (UTRs), peptídeo sinal da fosfolipase A₂ (88 a 134 pb) e a proteína madura (135 a.504 pb), sendo então que a proteína contém 369 pb. Para fins de comparação com outras toxinas, a seqüência obtida foi inserida em programas de alinhamento (BLAST e DNASTar), tornando evidente a alta homologia de seqüência com outras fosfolipases do grupo II. Nota-se ainda que esta homologia se estende as regiões não traduzidas. Alguns autores atribuem a esta região um papel na estabilização estrutural do RNA mensageiro [3].

A partir da seqüência, foram construídos primers, e foi realizada PCR com o intuito de amplificar a região codante da fosfolipase A₂, e assim possamos subclonar esta em vetor de expressão. O produto da PCR então, foi subclonado em vetor de expressão pET-20b(+) e transformado em *E. coli* BL 21. Logo depois foi feita a expressão desta, utilizando 0,5 mM de IPTG para a indução. A presença da proteína recombinante foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970), observando-

se uma banda com massa molecular compatível com o esperado (figura 1).

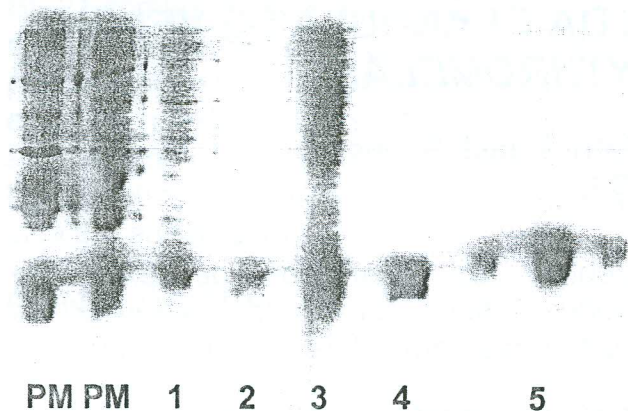


Figura 1.: PM: Padrão de peso molecular, 1 – sobrenadante não induzido; 2 – “pellet” não induzido; 3 – sobrenadante induzido; 4 – “pellet” induzido; 5 – Bothropstoxina I. SDS-PAGE da expressão feita com a fosfolipase A2, nas formas não-induzida e induzida, e também comparando com a Bothropstoxina I, a qual tem quase o mesmo peso molecular (13.720 Da) que a PLA2 (13.789 Da).

CONCLUSÕES

- Foi clonado e sequenciado com sucesso um cDNA que codifica para fosfolipase A2 de *Bothrops erythromelas*;
- Observou-se uma altíssima homologia da seqüência, tanto nas UTRs quanto na pré-proteína, e proteína, comparada com diferentes espécies de serpentes, mostrando a conservação da seqüência, mesmo com a evolução do gênero *Bothrops*;
- Baseados no alto grau de homologia do peptídeo sinal, sugerimos a construção de um primer universal para “screening” de venenos de crotalídeos;
- Resultados iniciais da expressão, sugerem que a mesma foi bem sucedida. A identidade da proteína será confirmada por Western blot e por atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MANIATIS, T; FRITSCH, F & SAMBROOK, J.-Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [2] LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature., 227, 680-685, 1970.
- [3] OGAWA T, ODA N, NAKASHIMA K, SASAKI H, HATTORI M, SAKAKI Y, KIHARA H, OHNO M., Unusually high conservation of untranslated sequences um cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2 isozymes, Proc. Nati. Acad. Sci, 89,8557-61, 1992.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

PIBIC