

Expressão, produção e purificação da proteína NS1 para uso em kit diagnóstico rápido para dengue

Tatiana Aparecida de Oliveira^{1*}; Juliana Martins Machado¹; Antônio Phelipe Carlete Zóboli¹; Vagner Aguiar¹; Ana Paula Almeida¹; Antônio Helvécio Tótola¹.

RESUMO

O diagnóstico de dengue vírus é atualmente realizado utilizando como antígeno viral a proteína NS1, esta, importante no processo de infecção do vírus. Técnicas de clonagem molecular são usadas a fim de expressar a NS1 de forma heteróloga em bactérias. As sequências gênicas desta proteína dos quatro sorotipos de dengue vírus foram analisadas e o consenso entre elas utilizado para a construção de um gene sintético (p70). Este foi ligado ao vetor de expressão pQE-32 e transformado em uma *E. coli* modificada (XL1-Blue), sendo posteriormente, a expressão do gene induzida com IPTG, e a análise da expressão feita por Western Blotting. O êxito da ligação do gene p70 ao vetor pQE-32 e posterior transformação em bactérias *E. coli* cepas XL1Blue, foi comprovado através da expressão da proteína recombinante de NS1 e esta pode ser utilizada como insumo para testes rápidos para diagnóstico de dengue.

Palavras-chave: dengue; NS1; proteínas recombinantes; diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa aguda, de gravidade variável, cuja transmissão ocorre mais prevalentemente através da picada do mosquito vetor *Aedes Aegypti*¹. O dengue vírus (DENV) é um vírus de RNA de filamento único, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, responsável pela infecção em seres humanos. Seu genoma tem cerca de 11kb de comprimento, é organizado em uma única fase aberta de leitura que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), proteínas precursoras

de membrana (prM) ou de membrana (M) e do envelope (E); e sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e NS5².

Existem quatro sorotipos diferentes do dengue vírus: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4³. Todos os sorotipos podem infectar os seres humanos e produzir um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde uma doença febril aguda autolimitada (febre do dengue, FD) até uma doença grave como a febre hemorrágica do dengue (FHD/síndrome do choque do dengue – SCD)⁴.

O diagnóstico laboratorial de dengue ainda utiliza como antígeno o próprio vírus envolvendo diversas preparações de cultura de células. Atualmente uma alternativa viável para substituir vírus no diagnóstico, é a produção de proteínas recombinantes antigênicas capazes de serem reconhecidas por anticorpos específicos⁵.

A NS1 é uma glicoproteína com cerca de 353 - 354 aminoácidos, que possui elevada quantidade de aminoácidos e nucleotídeos homólogos entre *flavivirus*, não faz parte da partícula viral, mas é liberada das células infectadas pelo dengue. Estudos preliminares têm mostrado que ela está envolvida na replicação do RNA viral, e foi encontrada em amostras da fase aguda do sangue de pacientes com infecções primárias ou secundárias. Isto sugeriu um maior envolvimento desta proteína viral na patogenidade do dengue vírus e sua possível utilização como um marcador adequado para infecção pelo vírus da dengue^{6,7}.

O objetivo deste trabalho é expressar a proteína NS1 de forma heteróloga em bactérias *E. coli* modificadas (XL1-Blue) a fim de obter insumos para serem empregados em kits de teste diagnóstico rápido para dengue.

MATERIAL E MÉTODOS

As seqüências das proteínas NS1 correspondentes aos quatro sorotipos do dengue vírus foram analisadas e a seqüência consenso entre elas foi usada para a construção de um gene sintético chamado de p70.

¹ Universidade Federal de São Del Rei – Laboratório de Bioquímica, Imunologia Celular e Molecular - 36420-000, Ouro Branco – MG – tatitolkien7@hotmail.com.

* Autor para correspondência: tatitolkien7@hotmail.com.

O gene p70 foi clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I com o objetivo de prepará-lo para a ligação no vetor de expressão pQE-32 (*Qiagen*[®] – *Sample & Assay Technologies*, São Paulo, Brasil).

O produto da ligação inserto-vetor foi inserido em bactérias *E. coli* geneticamente modificadas, cepas *XL1-Blue* e *JM109*, através do protocolo tradicional de choque térmico.

Os clones de bactérias *E. coli* *XL1-Blue* foram analisados através de PCR e aqueles contendo o gene p70 foram cultivados em meio de cultura LB para a manutenção e seleção dos plasmídeos.

Foram selecionadas oito colônias crescidas de *XL1-pQE-32-p70* e inoculadas em meio LB contendo 100ug/mL de antibiótico ampicilina, em placa de 24 poços e posteriormente foi realizada uma PCR a partir deste mesmo material.

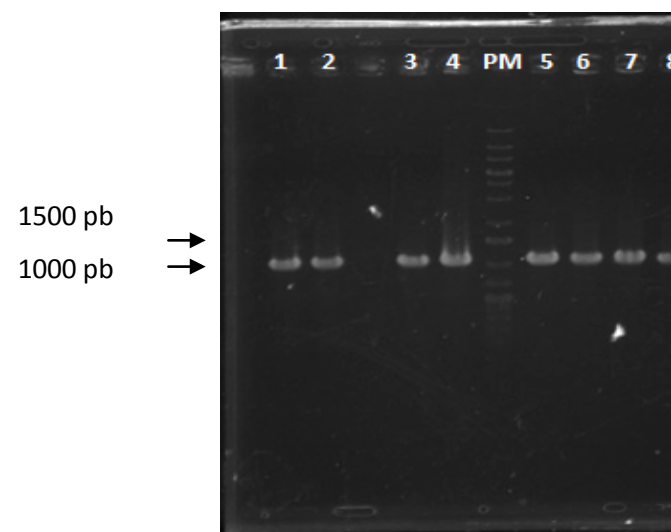
Na segunda etapa de confirmação da clonagem, foi feita uma extração de DNA plasmidial das colônias *XL1Blue-pQE-32-p70* com o kit *Plasmid Miniprep*[®] System da *Promega Corporation*, Brasil e realizado um ensaio de restrição enzimático usando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I.

A verificação da expressão foi feita por eletroforese em SDS-PAGE e western blotting utilizando anticorpos específicos para proteína NS1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

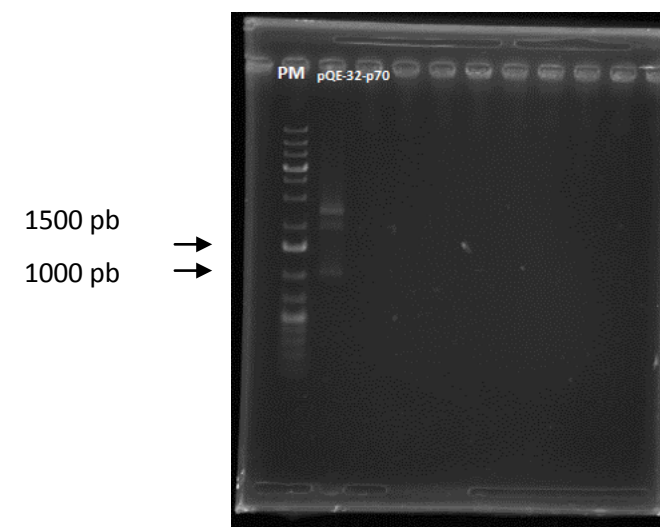
Através da PCR realizada a partir das colônias, em gel de agarose 1%, foi possível verificar que estas apresentavam o fragmento amplificado na altura entre 1000-1500 pares de bases, tamanho esperado para o gene p70.

Figura 1. Gel de PCR de colônias *XL1-Blue* com fragmento amplificado 1000-1500 pares de base.



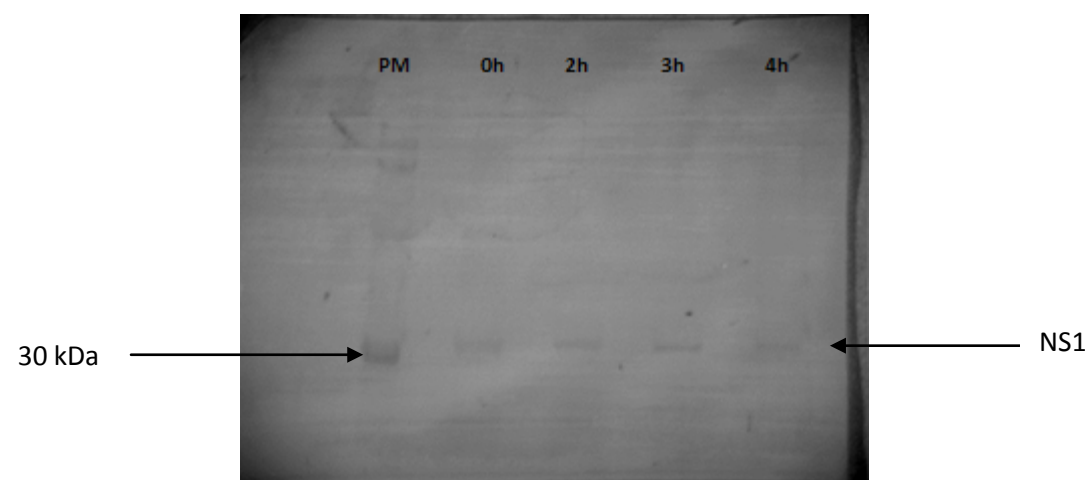
O resultado da digestão de pQE-32-p70 em gel de agarose 1% mostrou a presença das três bandas que indicaram respectivamente a banda do fragmento gênico, a banda do plasmídeo pQE-32 linearizado e o excesso de DNA plasmidial não digerido.

Figura 2. Digestão de pQE-32-p-70 em gel de agarose 1% com fragmentos.



A análise da expressão gênica do p-70 foi confirmada através de Western Blotting, em que a NS1 recombinante foi reconhecida, por anticorpos específicos anti-NS1.

Figura 3. Western Blotting de NS1 recombinante – Colônia C3.



CONCLUSÕES

A expressão da proteína recombinante NS1 através do gene p70 mostra-se promissora, como pode ser evidenciado pelos resultados obtidos referentes à ligação do gene p70 ao vetor de expressão pQE-32 e transformação em bactérias modificadas *E. coli* cepas XL1-Blue. Entretanto, a quantidade de proteína produzida mostrou-se abaixo do esperado, devido a fraca marcação obtida no teste de Western. Estamos agora testando diferentes condições de indução com o objetivo de aumentar a expressão da proteína NS1 recombinante, para utilização em ensaios de diagnóstico molecular da Dengue.

REFERÊNCIAS

- (1) GUBLER, D. J. Dengue and dengue Hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology, Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998;
- (2) LINDENBACH, B. D; RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields virology**. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkin, p. 991–1041, 2001;
- (3) MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91:2395–2400, 1994).
- (4) CHATUVEDI U.; NAGAR R.; SHRIVASTAVA R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: Implications of host genetics. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.47: p. 155–166, 2006;
- (5) BONALDO, M.C.; CAUFOUR, P.S.; FREIRE, M.S.; GALLER, R. The Yellow Fever 17D Vaccine Virus as a Vector for the Expression of Foreign Proteins: Development of New Live Flavivirus Vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 95(1), p.215-223, 2000;
- (6) BLOCK, J., S. M.; MCWILLIAM, H. C. BUTLER, A. J.; GIBBS, G.; WEILLER, B. L; HERRING, A. C.; HEMSLEY, J. G.; AASKOV, S.; YOKSAN. Comparison of a dengue-2 virus and other viruses. **Virology** v.187: p. 573–590, 1992;
- (7) YOUNG P.R.; HILDITCH P.A.; BLETCHLY, C., HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol** v. 38:p. 1053–1057, 2000.