**EXPRESSÃO, PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NS1 PARA USO EM *KIT* DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA DENGUE**

Tatiana Aparecida de Oliveira1\*; Juliana Martins Machado1; Antônio Phelipe Carlete Zóboli1; Vagner Aguiar1; Ana Paula Almeida1; Antônio Helvécio Tótola1.

1Universidade 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.

# RESUMO

*O diagnóstico de dengue vírus é atualmente realizado, utilizando-se como antígeno viral a proteína NS1, tão 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. Já o consenso entre elas foi 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 induzida do gene com IPTG. A análise desta expressão foi feita por Western Blotting. O êxito da ligação do gene p70 ao vetor pQE-32 e a posterior transformação em bactérias E. coli cepas XL1Blue foram comprovados através da expressão da proteína recombinante de NS1, podendo esta ser utilizada como insumo em testes rápidos para diagnóstico de dengue.*

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

## INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa aguda e de gravidade variável, cuja transmissão ocorre mais prevalentemente por meio da picada do mosquito vetor *Aedes Aegypiti*1. O dengue vírus (DENV) é um vírus de RNA de filamento único, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e 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, 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, tendo sido encontrada em amostras da fase aguda da doença no (entendi que a proteína NS1 foi encontrada no sangue dos pacientes que estavam na fase aguda da doença) sangue de pacientes com infecções primárias ou secundárias. Isto sugeriu um maior envolvimento desta proteína viral na patogenicidade 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 sequências das proteínas NS1 correspondentes aos quatro sorotipos do dengue vírus foram analisadas, e a sequência consenso entre elas foi usada para a construção de um gene sintético chamado de p70.

O gene p70 foi clivado com as enzimas de restrição *BamH*I e *Xba*I a fim de ser preparado 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. coliXL1-Blue* foram analisados através de PCR. Aqueles que continham 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. 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 *BamH*I 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 e 1500 pares de bases, tamanho esperado para o gene p70.

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



1000 pb

1500 pb

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.



1000 pb

1500 pb

A análise da expressão gênica do p-70 foi confirmada através de *Western Blotting*. A glicoproteína NS1 recombinante foi reconhecida por anticorpos específicos anti-NS1.

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



NS1

30 kDa

# 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 à transformação em bactérias modificadas *E. coli* cepas XL1-Blue. Entretanto, a quantidade de proteína produzida mostrou-se abaixo do esperado, devido à 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 & W ilkin, 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**.**