

## REA.06 - Expressão e purificação das proteínas NS1 e NS5 do vírus Zika para utilização na seleção de aptâmeros

Ana Paula Corrêa Argondizzo<sup>1\*</sup>; Alessandra Alves Abalo<sup>1</sup>; Laís Nascimento Alves<sup>1</sup>; Henrique Francisco Rocha<sup>1</sup>; Liliane Monteiro de Moraes<sup>1</sup>; Sotiris Missailidis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Fiocruz/Bio-Manguinhos.

### Introdução:

O vírus ZIKV é um vírus de RNA do gênero *Flavivirus*. Inicialmente isolado na África e Ásia, atualmente encontra-se difundido nas Américas, com o primeiro caso reportado no Brasil em 2015. A infecção causada por ZIKV pode ser assintomática ou apresentar sintomas similares com aqueles causados por outros vírus da família *Flaviviridae*. O RNA do ZIKV é traduzido em uma poliproteína, que é processada resultando na formação de três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). A NS1 pode ser segregada e encontrada na corrente sanguínea durante a fase aguda da infecção. A NS5 (RNA polimerase RNA dependente) pode desempenhar papel importante na regulação do processo de *splicing* de genes em células hospedeiras, além de interagir com outros fatores e ativar a secreção de interleucina 1- $\beta$ .

### Objetivo:

Expressar as proteínas NS1 e NS5 de ZIKV e purificá-las, para seleção de aptâmeros e MAb's a serem utilizados no desenvolvimento de diagnósticos específicos.

### Metodologia:

O gene codificante para NS1z foi amplificado e clonado no vetor pET100-D/TOPO. A região correspondente à porção C-terminal da proteína NS5z foi sub-clonada no vetor pET28a, a partir do pQE30/NS5z. Ambos os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) e as proteínas recombinantes expressas a partir da indução com IPTG. A fim de melhorar a solubilidade proteica, foram testadas diferentes temperaturas de indução (15°C, 20°, 25°C e 37°C) e tampões, contendo sais, detergentes e agentes caotrópicos, no processo de lise celular por sonicação. As proteínas foram purificadas por IMAC (coluna HisTrap HP) e dialisadas em tampões específicos para permitir enovelamento.

### Resultado:

As proteínas rNS1z e rNS5z foram expressas, nas 4 temperaturas descritas, de forma insolúvel. A rNS5z solubilizou quando empregado tampão HEPES 25mM/NaCl 200 mM/triton x-100 0,1%/glycerol 10%/n-lauril-sarcosil 3%. Na IMAC os contaminantes foram eluídos com 10, 30 e 50 mM imidazol e a rNS5z com 500 mM. Subsequentemente, a proteína foi dialisada em tampão PBS/glicerol 5% pH7,4. Diferentemente da rNS5z, a rNS1z foi solubilizada apenas com a adição de 6 M de ureia. Para a purificação de rNS1z o precipitado bacteriano foi lisado em Tris 20 mM pH 8,0. Em seguida, o corpo de inclusão foi lavado com Tris 20 mM pH 8,0 contendo 2 e 4 M ureia e solubilizado com Tris 20 mM/ureia 6 M pH 8,0. No processo de purificação os contaminantes foram eluídos nas concentrações de 20, 80, 100 e 120 mM de imidazol, e rNS1z com 500 mM. Após purificação, a proteína foi dialisada em tampão Tris 20 mM pH 8,0 com redução de ureia de 6 M para 2 M.

### Conclusão:

As proteínas rNS1z e rNS5z, foram expressas e purificadas com sucesso e subsequentemente empregadas na seleção de aptâmeros que poderão ser utilizados no desenvolvimento de ensaios diagnóstico para ZIKV.

**Palavras-chave:** expressão e purificação de proteínas recombinantes; NS1 e NS5; Zika vírus