

Universidade Católica de Goiás  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

**Expressão e purificação de uma proteína multiepítipo  
recombinante desenhada a partir de proteínas do vírus da  
hepatite C**

**Marielle de Oliveira Castro**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Irmtraut Araci H. Pfrimer  
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

Goiânia-GO  
Março de 2007

Universidade Católica de Goiás  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

**Expressão e purificação de uma proteína multiepítipo  
recombinante desenhada a partir de proteínas do vírus da  
hepatite C**

**Marielle de Oliveira Castro**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irmtraut Araci H. Pfrimer  
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Goiânia-GO  
Março de 2007

Dedico este trabalho

A Deus, por permitir que tantas pessoas me ajudassem a caminhar nestes dois anos. Agradeço a capacitação no trabalho, a renovação diária da força necessária para chegar ao final de cada dia com esperança e pelo consolo em qualquer situação. A Ele a gratidão da vida que foi penetrada por seu amor.

A meus pais, Paulo e Ângela e meus irmãos, Michelle e Paulinho, pelo apoio incondicional a minha eterna jornada de estudante, carinho, amor, paciência, educação e, principalmente, por acreditarem sempre em mim.  
**Amo muito vocês!!!**

A todos os meus familiares, pelo constante apoio e confiança dedicados.

Ao meu namorado, Daniel, que me acompanha em pensamento em todos os meus momentos.

Aos meus amigos, Audir da Costa, Lana Carla, Marcelo Alves, Sabrina Pereira, Samantha Pereira e Vanessa Rasmussem pelo apoio, companheirismo e amizade incondicional.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irmtraut Araci H. Pfrimer, por toda influência em minha formação, desde a iniciação científica até aqui. Pela amizade, carinho, dedicação, prontidão, confiança, incentivo, compreensão em todos os momentos, pelos conhecimentos passados e ainda, pelo grande exemplo de determinação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres, pela paciência e boa vontade em atender as minhas dúvidas, pelos vários conselhos dados, pelo exemplo profissional e amizade.

Ao meu amigo Marcelo Zanini pelo apoio, compreensão, incentivo, por todos os dias de convivência em Brasília e pela participação nos momentos importantes que atravessamos juntos, desde a alegria por termos sido selecionados no mestrado, àqueles difíceis do final de nossos trabalhos.

Às minhas amigas Andrelisse Arruda, Júlia Matinato, Maisa Campos, Marília Vilela e Paula Lúcia Machado pela amizade, pelo auxílio imprescindível na estadia em Brasília e por me tratarem como se eu fosse “de casa”.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da Universidade Católica de Goiás: Artur Bartasson, Brunna Vieira, Camila Silva, Ciro de Souza, Danuza de Sousa, Felipe Maia, Maria Clara Bizinoto e Natália Brandão que me acompanharam nesta jornada, colaborando e incentivando em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília: Alexsandro Galdino, Andrelisse Arruda, Carolina Brêttas, Janice De Marco, Juliana Amorim, Karen Rapp, Pollyanna Pfrimer, Saulo Siqueira e Viviane Castelo pela ótima convivência e por estarem sempre dispostos a me ajudar e a trocar idéias.

Aos funcionários do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Universidade Católica de Goiás, Camilla de Ribeiro e Carlos Lopes pela amizade e colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília: Davi Loures, Maria de Fátima Lopes e Josefa Ivonildes Santos, sempre atenciosos e dispostos a ajudar no que fosse preciso.

E a todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...  
Façamos da interrupção um novo caminho;  
Da queda um passo de dança;  
Do medo uma escada;  
Do sonho uma ponte;  
E da procura...  
Um encontro”.

**Fernando Sabino**

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Fluxograma do Protocolo Geral.....	10
3.2. Material.....	11
3.3. Métodos	
3.3.1. Clonagem dos genes.....	17
3.3.2. Indução da expressão do gene MEHCV em <i>E. coli</i> .....	17
3.3.3. Purificação do MEHCV.....	19
4. RESULTADOS	
4.1. Clonagem dos genes.....	21
4.2. Indução da expressão do gene MEHCV em <i>E. coli</i> .....	22
4.3. Purificação do MEHCV.....	24
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÕES.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

ANEXO

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da organização do RNA genômico do HCV.....	3
<b>Figura 2</b> – Alinhamento dos epítomos na proteína multiepítopo MEHCV.....	11
<b>Figura 3</b> – Alinhamento das diversas regiões imunodominantes de isolados HCV sorotipos 1a e 3a.....	12
<b>Figura 4</b> – Seqüência primária da poliproteína HCV.....	13
<b>Figura 5</b> – Seqüência primária da proteína multiepítopo MEHCV.....	14
<b>Figura 6</b> – Mapa físico do vetor pBSK MEHCV.....	14
<b>Figura 7A</b> – Mapa físico do vetor pET-21a.....	15
<b>Figura 7B</b> – Mapa da região do <i>polylinker</i> do vetor pET-21a.....	16
<b>Figura 8</b> – Indução da expressão do gene MEHCV em <i>E. coli</i> .....	18
<b>Figura 9</b> – Análise de restrição do vetor pBluescripSK contendo o gene MEHCV.....	21
<b>Figura 10</b> – Análise de restrição do vetor pET MEHCV.....	22
<b>Figura 11</b> – Indução da expressão da proteína MEHCV em <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figura 12</b> – <i>Western blot</i> da indução da expressão da proteína MEHCV em <i>E. coli</i> .....	24
<b>Figura 13</b> – Purificação da proteína MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 12%.....	25
<b>Figura 14</b> – Diálise da purificação contra tampão 3 (pH 4,5) após centrifugação.....	26



## ABREVIATURAS

ALT: Alanina Amino Transferase

*AOXI*: Gene da *AOXI*

ATP: Adenosina Tri-Fosfato

BCIP: 5-Bromo-4-Cloroindolil Fosfato

bDNA: *branched DNA* (DNA ramificado)

cDNA: DNA Complementar

C-Terminal: Região Carboxi-Terminal

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

dNTP: Desoxinucleosídeo Trifosfato

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HCV: *Hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

*His-Tag*: Segmento de 6 resíduos de histidina

*IB*: *Immunoblot*

IFN: Interferon

IPTG: Isopropil  $\beta$ -D-Tiogalactopiranosídeo

*IRES*: *Internal Ribosome Entry Site* (Sítio Interno de Entrada Ribossomal)

kDa: Kilo Daltons

LIPA: *Line Probe Assay* (Técnica de Hibridização Reversa)

MEHCV: Proteína Multiepítopo HCV

Mini-Prep: Mini Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina

NBT: Nitroazultetrazólio

NC: Região não Codificadora

N-Terminal: Região Amino-Terminal

OD: Densidade Óptica

*ORF*: *Open Reading Frame* (Região de Leitura Aberta)

PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

pb: Par de Bases

PBS: Solução Salina Tamponada Fosfatada

PBST: Solução Salina Tamponada Fosfatada com Tween 20

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH: Potencial Hidrogeniônico

Poli U: Seqüência Longa de Uracilas

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotação por Minuto

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Transcrição Reversa associada à PCR)

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

TE: Tampão Tris mais EDTA

TBE: Tris Borato EDTA

TEMED: N’N’N’N’ Tetrametilenodiamino

TMA: *Transcription Mediated Amplification* (Amplificação Mediada por Transcrição)

Tris-HCl: Tris (hidroximetil) Aminometano Hidroclórico

## RESUMO

A hepatite C é considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo inteiro, inclusive no Brasil, pois uma vacina preventiva não está disponível, o número de infectados com a forma assintomática é elevado e para o controle da doença, há somente *kits* importados. Considerando, principalmente, o aumento da preocupação com a detecção precoce da hepatite C e que os métodos de diagnóstico desta infecção são de grande relevância clínica, o presente trabalho propõe a expressão e purificação de uma proteína codificada por um gene sintético (MEHCV – Multiépítopo HCV). Para atingir este objetivo, uma proteína multiépítopo recombinante foi desenhada a partir de epítomos lineares, imunodominantes e filogeneticamente conservados do vírus da hepatite C (HCV), com a inclusão de seqüências imunodominantes dos genótipos mais prevalentes no Brasil (1a e 3a) e uma *His-tag* no C-terminal para facilitar a purificação da proteína recombinante expressa em bactéria. Estes epítomos (*core*, NS3, NS4A, NS4B e NS5) são considerados entre os mais importantes para o diagnóstico da doença e utilizados em muitos testes para detecção do HCV. O gene MEHCV (~720pb) possui sítios de restrição (*NdeI* e *XhoI*) nas suas extremidades que permitem a clonagem em fase no vetor de expressão bacteriano pET-21a. Para a síntese deste gene, foi feita a otimização para o códon *usage* de *E. coli*. A proteína de interesse (~29kDa) foi detectada por SDS-PAGE e *Western blot*. A purificação da proteína expressa foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA. Como a purificação não foi total, foi feita uma nova purificação desta proteína por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA. No entanto, não houve esta purificação devido à presença de proteínas celulares. Sendo assim, na tentativa de alcançar a purificação total desta proteína multiépítopo, seria interessante a utilização de um novo protocolo, com a extração dos corpos de inclusão, onde todas as proteínas celulares solúveis seriam retiradas da solução.

## ABSTRACT

Hepatitis C is considered one of the largest problems of public health in the world, inclusively in Brazil, whereas a preventive vaccine none is available; the number of asymptomatic infections is elevated and for control of the disease, there exist only imported kits. Considering, principally, the increase of preoccupation with the detection of precocious hepatitis C and that the diagnostic methods of this infection are of the highest clinical importance, the presence study proposes the expression and the purification of one codified protein through a synthetic gene (MEHCV – Multiepitope HCV). To achieve this objective, the new recombinant protein multiepitope was designed on the basis of epitopes linear, immunodominant and phylogenetically conserved from the virus of hepatitis C (HCV), including the immune dominating sequences of the genotypes that are more prevalent in Brazil (1a e 3a) and a His-tag in C-terminal to facilitate the purification of the recombinant protein express in bacteria. These epitopes (core, NS3, NS4A, NS4B e NS5) are considered among the most important for the diagnosis of the illness utilized for many HCV detection tests. The MEHCV gene (~720pb) possesses restrictive of sites (NdeI e XhoI) in yours extremities that permits the clonage in phase in the expression of vector bacterial pET-21a. To the synthesize of this gene was made the optimization to the codon usage of *E. coli*. The protein of interest (~29kDa) was detected by SDS-PAGE and Western blot. The purification of the protein express was realized by centrifugal in resin Ni-NTA by affinitive chromatography. Inasmuch as the purification was not total, a new purification was made of this protein by means of chromatography of affinity in column with resin Ni-NTA. However, did not having this purification owe a presence of cellular proteins. In such case, in the trial of obtain a total purification of this protein multiepitope, would be interesting the utilization of the one new protocol, with the extraction of the inclusion body, wherein all the dissolvable proteins cellular would be remove of the solution.

## 1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial, inclusive no Brasil, pois, até o momento, não está disponível uma vacina preventiva e um grande número de infectados apresenta a forma assintomática da doença, geralmente sem o conhecimento prévio do paciente, aumentando a taxa de cronicidade. Para o controle da doença, há somente *kits* importados, os quais nem sempre apresentam a mesma especificidade em todo o mundo, devido à alta heterogeneidade do vírus da hepatite C (HCV) (Dipti *et al.*, 2006). Com isso, as ações públicas voltadas para o tratamento e contenção à disseminação da doença tornam-se muito onerosas. Entretanto, a disponibilidade de diferentes testes viabiliza o diagnóstico precoce, reduzindo, dessa forma, o potencial para disseminação da infecção e permitindo a realização do acompanhamento e tratamento precoce destes pacientes.

Atualmente, cerca de 200 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo HCV (Lauer & Walker, 2001; Alberti *et al.*, 2003). No Brasil, não se conhece, com precisão, a prevalência do HCV, mas estima-se que ela esteja em cerca de 3% da população em geral (WHO, 1997; Strauss, 2001).

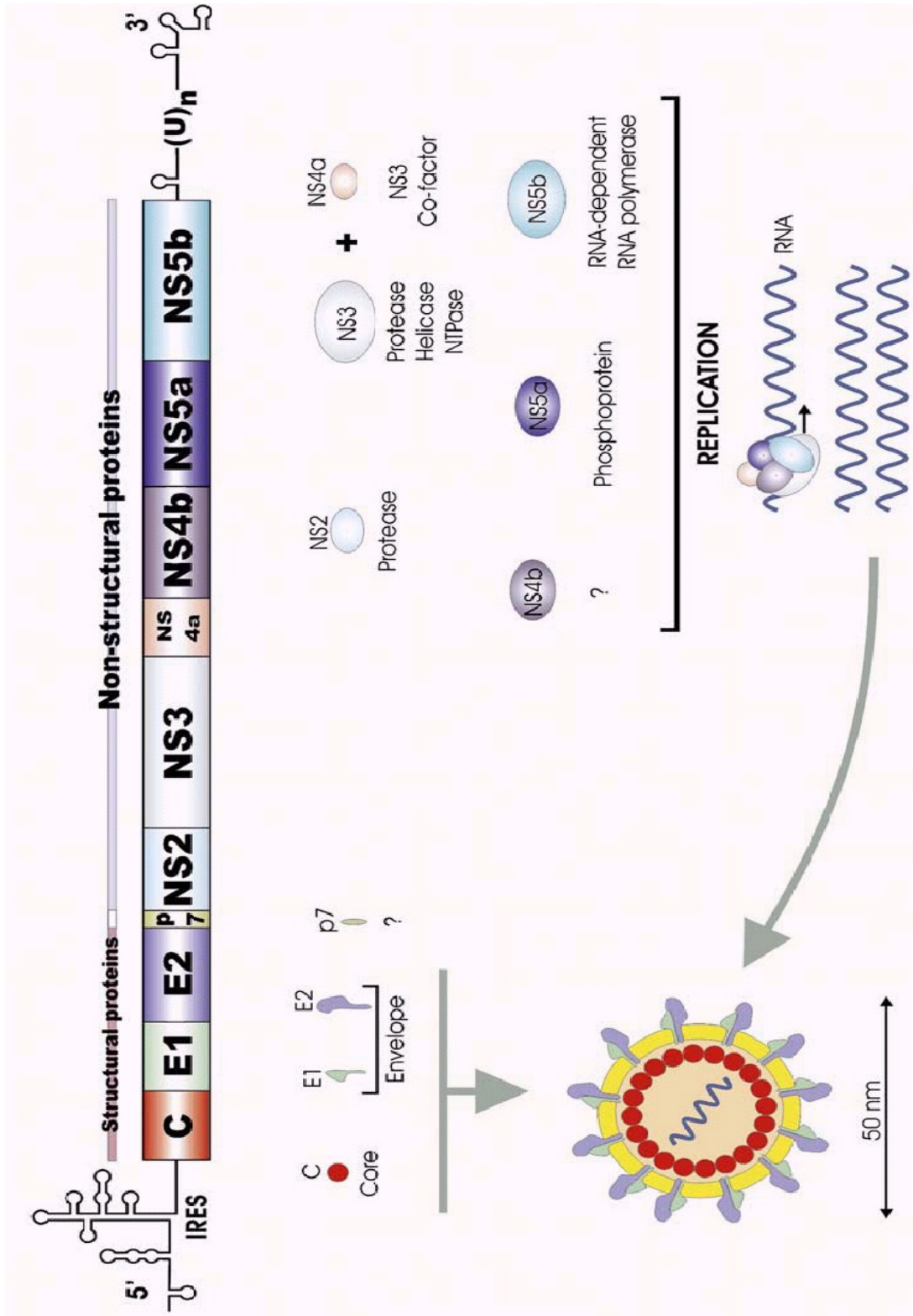
A transmissão do HCV acontece principalmente por via parenteral, por meio de transfusão de sangue e hemocomponentes, utilização de agulhas e seringas contaminadas e pelo transplante de órgãos e tecidos (Sáez-Alquézar *et al.*, 2001). Dentre as formas não-parenterais de transmissão, destaca-se a transmissão por contato sexual, que, embora seja pouco freqüente, se torna um importante fator de risco em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais. A transmissão materno-fetal pode ocorrer principalmente na hora do parto, mas é pouco freqüente (Strauss, 2001). No entanto, num percentual significativo de casos, não é identificada a via de infecção (Ferreira & Silveira, 2004).

O vírus da hepatite C identificado por Choo *et al.*, (1989) através de técnicas de biologia molecular, pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (Choo *et al.*, 1991; Takamizawa *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1998). É responsável por mais de 90% das hepatites por vírus anteriormente rotuladas de não-A e não-B e considerado o principal patógeno humano causador de infecções agudas e crônicas associadas a um curso variável que pode levar à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (Choo *et al.*, 1989; WHO, 1997).

Trata-se de um vírus RNA de fita simples de polaridade positiva, cujo genoma contém aproximadamente 9400 nucleotídeos e que apresenta duas extremidades não codificadoras: 5'NC e 3'NC. A extremidade 5'NC, a mais conservada do genoma viral, é seguida por um longa e única fase de leitura aberta (*ORF* - *open reading frame*) e pode ser usada no desenvolvimento de técnicas para a detecção do RNA viral, pois possui 341 nucleotídeos com uma estrutura secundária complexa que funciona como uma *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*), que permite a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada, próxima ao códon de iniciação da *ORF*, possibilitando a tradução das proteínas virais (Di Bisceglie, 1999; Bartenschlader & Lohmann, 2000; Rosemberg, 2001).

A 3'NC é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para replicação *in vivo* (Di Bisceglie, 1999; Bartenschlader & Lohmann, 2000; Rosemberg, 2001). A *ORF* compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína de cerca de 3000 aminoácidos (Zein, 2000). Esta poliproteína, quando clivada proteoliticamente, dá origem a proteínas estruturais e não-estruturais (Boulant, 2005), como mostra a Figura 1.

**Figura 1 – Representação esquemática da organização do RNA genômico do HCV.** O genoma é constituído por ~9.400 nucleotídeos. As extremidades 5'NC e a 3'NC, flanqueiam a ORF (*Open Reading Frame*) cuja poliproteína correspondente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. Proteínas estruturais: o C (*Core*), E1 e E2 estão localizadas na porção N-terminal da poliproteína. Proteínas não estruturais: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B na porção C-terminal. Proteína p7 é codificada pela região E2. (Fonte: Roingeard *et al.*, 2004).



As proteínas estruturais são codificadas na região N-terminal e incluem a proteína do *core*, região altamente conservada (Boulang, 2005), seguida por duas proteínas glicosiladas, E1 e E2. A proteína do *core*, procedente do nucleocapsídeo viral, é utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-HCV e parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com o metabolismo lipídico e deprimir a resposta imune do hospedeiro por mecanismos ainda desconhecidos (Kato, 2000; Lai & Ware, 2000; McLauchlan, 2000). As proteínas E1 e E2 são constituintes do envelope viral e estão relacionadas com a adsorção e fusão do vírus a receptores na célula-alvo para indução da infecção viral (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Triyatni *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2003). A proteína p7, recentemente descrita, é codificada pela região E2 e processada por um precursor E2/p7. Estudos apontam que possa mediar a permeabilidade de íons e formar hexâmeros e, até mesmo, apresentar importante função na maturação e infectividade da partícula viral (Pavlovic *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2003, 2004; Premkumar *et al.*, 2004).

As proteínas não-estruturais (essenciais para o ciclo de vida do vírus), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, são codificadas na extremidade carboxi-terminal do genoma viral (Zein, 2000; Strauss, 2001). A proteína NS2 e o domínio amino-terminal da NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (Bartenschlager & Lohmann, 2000). A NS3 apresenta três atividades enzimáticas: uma serina-protease na extremidade amino-terminal, que cliva os sítios NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A e NS5A/B, uma helicase e uma nucleotídeo-trifosfatase-dependente de ATP na carboxi-terminal, essenciais para tradução e replicação do HCV (Suzich *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995; Di Bisceglie, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Bartenschlager & Lohmann, 2000). A proteína NS4A forma um complexo heterodinâmico com NS3, agindo como um cofator necessário para a atividade protease de NS3 (Bartenschlager *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993), enquanto que a função da proteína NS4B na replicação viral permanece indefinida. A proteína NS5A é uma fosfoproteína cujo número de fosforilações é influenciado por NS4A, mediada por uma quinase celular e pode estar envolvida na resistência à ação antiviral do interferon (IFN) (Enomoto *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1998). Já a proteína NS5B é uma RNA polimerase RNA-dependente,



necessária para a replicação genômica e é um excelente alvo para a terapia antiviral (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997).

Uma das características mais importantes do HCV é a sua heterogeneidade genética que parece resultar da pressão imunológica gerada pela resposta imune humoral do hospedeiro. Baseado nessa característica, o HCV tem sido classificado em seis diferentes genótipos com denominação numérica de 1 a 6 (Simmonds *et al.*, 1993), cada um compreendendo múltiplos subtipos, designados por letras do alfabeto: a, b, c, etc (Bukh *et al.*, 1995a). Acredita-se que a existência de diferentes genótipos possa influenciar alguns aspectos relativos à distribuição geográfica, patogenia, infecção e uma baixa resposta ao tratamento com IFN ou IFN peguilado em combinação ou não com ribavirina, em indivíduos infectados com o genótipo 1 em relação aos infectados com os genótipos 2 ou 3 (Zein, 2000; Alberti *et al.*, 2003; Amorim *et al.*, 2004).

Estudos sobre a distribuição geográfica dos genótipos do HCV demonstram que os genótipos 1, 2 e 3 têm uma distribuição mundial (Zein, 2000), sendo que o genótipo 4 é o mais prevalente na África Central e Egito (Chamberlain *et al.*, 1997), enquanto que os genótipos 5 e 6 ocorrem com maior frequência no sul da África e Ásia respectivamente (Cha *et al.*, 1992; Simmonds, 1997). No Brasil, vários estudos têm mostrado que o genótipo 1, é o mais prevalente, seguido pelos genótipos 3 e 2 (Amorim *et al.*, 2004; Campiotto *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006).

Clinicamente, a hepatite C é caracterizada por um período médio de incubação de 6 a 8 semanas, com variação de 2 a 26 semanas (Dienstag *et al.*, 1983). A infecção pelo HCV é geralmente assintomática, com evolução para hepatite crônica em mais de 80% dos pacientes (Alter, 1995). Entre esses, 20 a 50% desenvolvem cirrose hepática e 5% desenvolvem carcinoma hepatocelular (Tong *et al.*, 1995). Quando sintomática, a infecção manifesta-se como nas outras hepatites, apresentando principalmente cefaléia, mal estar, náuseas, vômitos, lesões hepáticas em decorrência da resposta imunológica do hospedeiro que podem ocasionar o aumento da concentração de alanina amino transferase (ALT) (Alter, 1995) e em casos isolados, aparecem sinais de icterícia (Dienstag, 1983; Koretz *et al.*, 1993).

Em função do grande número de infectados apresentarem a forma assintomática da doença e à alta prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C, o diagnóstico da HCV requer testes sensíveis, sendo os ensaios sorológicos os mais utilizados, pois utilizam pesquisa de anticorpos contra o vírus, possibilitando a identificação da infecção presente ou passada (Brandão *et al.*, 2001). O método sorológico mais utilizado para

detecção de anticorpos contra o HCV é a reação imunoenzimática (ELISA). O ELISA de primeira geração tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3, da região não-estrutural NS4 do genoma viral. Esse método foi rapidamente abandonado devido à sua baixa sensibilidade e especificidade, surgindo o de segunda geração, que além da fração c100-3 incorporava as frações c33c (NS3) e c22-3 (*core*) (Sáez-Alquézar *et al.*, 2001). Em 1993, surgiu o ELISA de terceira geração, contendo frações antigênicas das regiões não-estruturais NS3, NS4 e NS5 e da região estrutural *core*. Além disso, grande parte dos testes de terceira geração substituíram algumas frações antigênicas (obtidas por recombinação genética), tais como a c100-3 e c33c, por peptídeos sintéticos correspondentes aos epítomos imunodominantes dessas frações, melhorando tanto a sensibilidade quanto a especificidade (Sáez-Alquézar *et al.*, 2001). Atualmente, já existe o ELISA de quarta geração que contém frações antigênicas do *core*, NS3 e NS4, derivadas do genótipo 1, incluindo também antígenos NS3 e NS4 de genótipos diferentes do tipo 1 (Sáez-Alquézar *et al.*, 2001). Este método detecta praticamente todos os portadores do vírus, além de indivíduos que foram infectados e não desenvolveram manifestações clínicas (Gretch, 1997). Como vantagens, apresenta rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo.

No entanto, em populações de baixo risco, como doadores de sangue, o ELISA tem baixo valor preditivo positivo, podendo gerar resultados falso-positivos em pessoas que nunca foram expostas ao vírus da hepatite C (Souto *et al.*, 2002). Neste caso, são recomendados testes suplementares para aumentar a especificidade do ELISA. O mais utilizado é o *Immunoblot (IB)* que contém os mesmos antígenos presentes nos testes ELISA, sendo que alguns mais recentes, de terceira geração, apresentam frações antigênicas altamente purificadas do *core*, região hipervariável E1 e E2, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Além disso, apresentam antígenos recombinantes derivados de diversos genótipos (Brandão *et al.*, 2001; Sáez-Alquézar *et al.*, 2001). Este teste consiste na detecção de pequenas quantidades de proteínas adsorvidas em uma membrana de nitrocelulose pela reação com anticorpos específicos, presentes no soro do paciente, para reconhecer o polipeptídeo que está sendo analisado (Medina & Schiff, 1995; Lauer & Walker, 2001). O teste é considerado negativo e indeterminado, quando não há reação a qualquer dessas proteínas ou há reação a apenas uma proteína, respectivamente. No caso de reação a duas ou mais proteínas, a positividade do ELISA anti-HCV é confirmada. Sendo assim, a utilidade desse teste concentra-se na

diferenciação de indivíduos com testes falso-positivos daqueles que necessitarão de investigação clínica, pois identifica anticorpos a antígenos individuais (Lok & Gunaratnam, 1997; Damen *et al.*, 1995). Em comparação aos testes para pesquisa do RNA viral, o *IB* de terceira geração é de realização mais simples, mais específico e possui uma maior acurácia e reprodutibilidade, além de produzir menor número de resultados indeterminados (Lok & Gunaratnam, 1997; Martin *et al.*, 1998).

Para o diagnóstico de infecção pelo HCV atingir o padrão ouro, além do ELISA e do *IB*, é necessário a determinação do RNA do HCV através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O método utiliza *primers* com estrutura complementar a uma seqüência do ácido nucléico a ser detectado, possibilitando a amplificação dessas seqüências genéticas específicas (Brandão *et al.*, 2001).

A detecção do RNA do HCV pode ser feita utilizando técnicas de biologia molecular qualitativas e quantitativas. Os testes qualitativos estão baseados no princípio de amplificação do alvo usando a PCR ou a amplificação mediada por transcrição (TMA). A reação em cadeia da polimerase com a enzima transcriptase reversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) é o teste mais sensível que utiliza a PCR, sendo capaz de detectar até 100 cópias do genoma/mL de soro (Gretch *et al.*, 1993; Brandão *et al.*, 2001). Esta técnica, a partir da região 5'NC do RNA viral, catalisa a síntese do DNA complementar, que, em seguida, será amplificado pela técnica de PCR, produzindo quantidades suficientes para serem analisadas em gel de agarose (Medina & Schiff, 1995). O TMA permite a detecção simultânea de duas partículas virais (HIV-1 e HCV). É um teste simples, com rapidez no processamento, e capacidade de detecção inferior a 50 cópias do genoma/mL (Schiff *et al.*, 1999). Os testes qualitativos servem para a confirmação da viremia e avaliação da resposta terapêutica (Brandão *et al.*, 2001; Lauer & Walker, 2001).

Para a detecção quantitativa do RNA viral, existem duas técnicas de biologia molecular: uma que utiliza a tecnologia do DNA ramificado (*branched DNA*, b-DNA) e outra que utiliza a técnica de PCR. Atualmente, o teste mais utilizado, que se baseia na técnica de PCR, é o AMPLICOR de segunda geração da Roche Molecular Systems. Este teste baseia-se na transcrição reversa do HCV RNA alvo em cDNA e na amplificação desse cDNA por PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos (*primers* ou iniciadores) conjugados a uma enzima com atuação sobre um substrato quimioluminescente (Gretch *et al.*, 1995). Conforme os fabricantes, apresenta um limite de sensibilidade de 1000 cópias de HCV RNA viral/mL. No b-DNA, o RNA viral,

presente na amostra, é capturado por sondas, que são DNAs quimicamente modificados, que possuem inúmeras ramificações, que se ligam a uma outra sonda marcada com biotina, para revelação do sinal amplificado. Sendo assim, esta técnica se diferencia da PCR por amplificar um sinal, e não o DNA alvo (Sáez-Alquézar *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2001). Como vantagem, ela não depende de uma atividade enzimática e parece ter resultados com maior reprodutibilidade em relação a PCR, porém a sua sensibilidade comparada a mesma, é menor. Os testes quantitativos são indicados na definição do tempo de tratamento combinado (interferon/ribavirina) de pacientes com hepatite C crônica (Brandão *et al.*, 2001; Sáez-Alquézar *et al.*, 2001).

Para uma melhor definição do tempo de tratamento da hepatite C pelos testes quantitativos, a determinação dos genótipos do HCV é essencial. Esta pode ser feita a partir da análise da seqüência genômica, por meio da técnica de hibridização reversa (LIPA – *Line Probe Assay*, Innogenetics, Bélgica), que utiliza sondas de oligonucleotídeos da região 5'NC, complementares a uma determinada seqüência específica de tipos e subtipos do HCV (Stuyver *et al.*, 1993, 1996). Além da importância clínica, a técnica de genotipagem por LIPA, apresenta uma sensibilidade de 94 a 100% e uma especificidade de 98% (Lau *et al.*, 1996; Van Doorn *et al.*, 1996).

A determinação dos genótipos do HCV também pode ser feita utilizando técnicas sorológicas (sorotipagem) que baseiam-se na detecção de anticorpos genótipo-específicos contra epítomos do HCV (Machida *et al.*, 1992). Embora estas técnicas apresentem baixo custo e maior facilidade de processamento, em comparação com as técnicas de biologia molecular, elas não possibilitam a identificação do subtipo viral.

Assim, considerando que: 1) a preocupação com a detecção precoce da hepatite C aumenta a cada dia, principalmente em bancos de sangue; 2) os métodos diagnósticos desta infecção são de grande relevância clínica e podem ser utilizados como marcadores de cronicidade e indicativos da eficácia terapêutica; e 3) o Brasil tem destinado grande investimento financeiro para o tratamento de pacientes com Hepatite C, esse trabalho propõe a expressão e purificação de uma proteína codificada por um gene sintético (MEHCV – Multiepítomo HCV). A produção de uma proteína multiepítomo recombinante poderá contribuir em pesquisas para o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico para detecção do HCV, pois os *kits* disponíveis no mercado, utilizam de 3 a 6 peptídeos e/ou antígenos recombinantes das regiões estruturais e não-estruturais, enquanto que a proteína multiepítomo substitui essas diversas proteínas recombinantes e peptídeos, reduzindo consideravelmente os custos de produção destes *kits*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

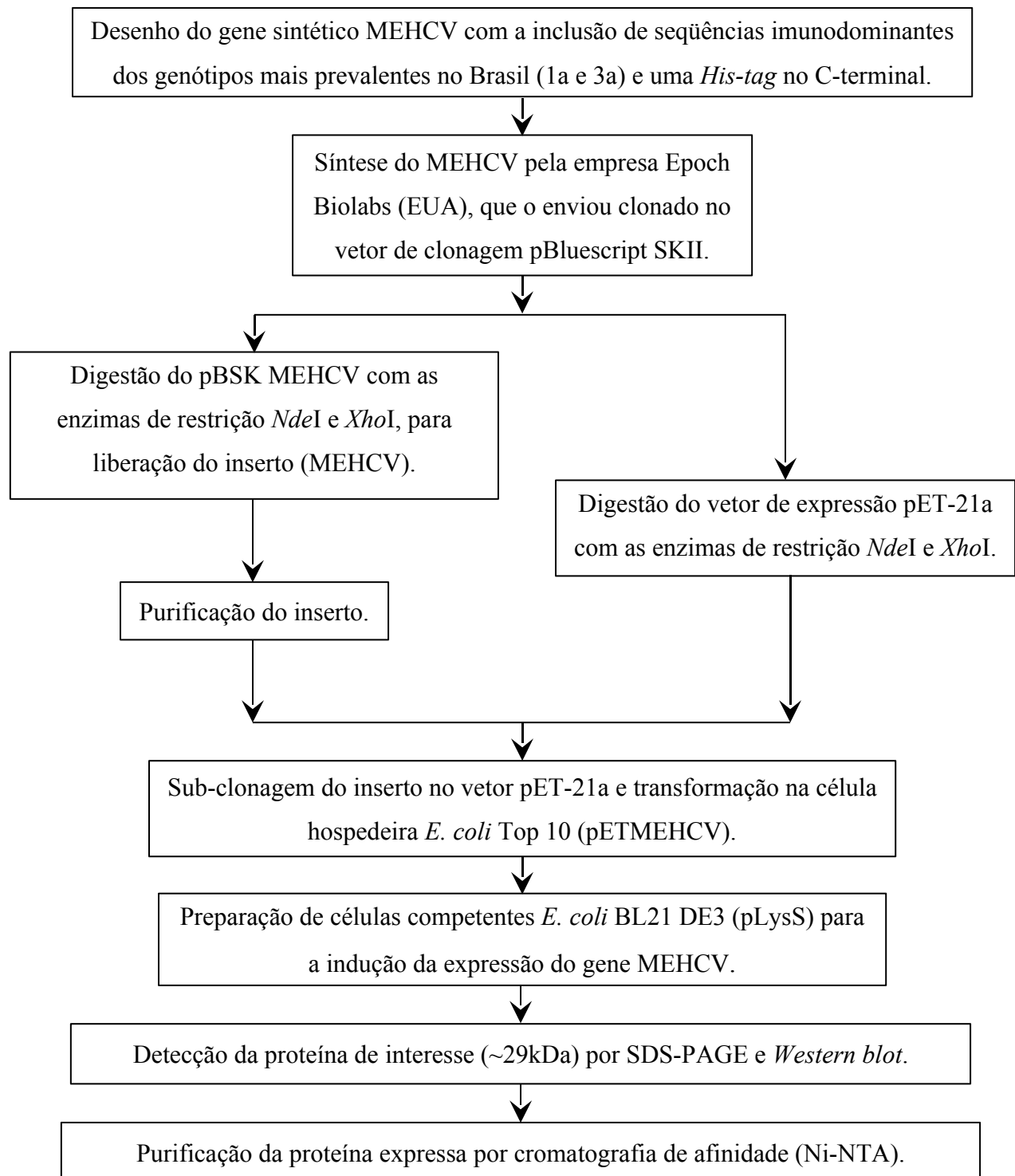
Expressão e purificação de uma proteína multiepítipo recombinante desenhada a partir de 4 proteínas do HCV.

### 2.2 Específicos

- Desenho de um gene sintético (MEHCV) com códon otimizado para *Escherichia coli* contendo epítomos da proteína do *core*, NS3, NS4 e NS5 do HCV;
- Sub-clonagem do gene sintético em vetor de expressão de *E. coli*;
- Expressão dos genes clonados em *E. coli*;
- Purificação da proteína expressa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fluxograma do protocolo geral



### 3.2 Material

O gene sintético (MEHCV) foi desenhado semelhante à proteína multiepítipo indiana (HCVFMEP) elaborada por Dipti *et al.*, (2006), mas com a inclusão de seqüências imunodominantes dos genótipos mais prevalentes no Brasil (1a e 3a) e uma *His-tag* (segmento de 6 resíduos de histidina no C-terminal) para facilitar a purificação da proteína recombinante expressa em bactéria. Foram selecionados epítomos representando as seguintes proteínas do HCV dos genótipos 1a e 3a: core (1a), core (3a), NS3 (1a), NS4A (1a), NS4B (1a) e NS5 (1a). Estes epítomos foram distribuídos *in tandem* separados por um pequeno *linker* flexível formado por resíduos de glicina e serina e as seqüências dos epítomos foram obtidas a partir do site da European Hepatitis C Virus Database - <http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/> (Figuras 2, 3, 4 e 5).

**NH3-core (1a)::linker::core(3a)::linker::NS3(1a)::linker::NS4A(1a)::linker::NS4B (1a)::linker-NS5 (1a)-COOH**

**Figura 2 – Distribuição dos epítomos na estrutura primária da proteína multiepítipo MEHCV, baseado na mesma estrutura da proteína indiana HCVFMEP.**

**Core**

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG (1a) AF009606  
 MSTNPKPQKKNRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG (1a) M62321  
 MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG (1a) M67463  
**MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG (1a) MEHCV**  
**MSTLPKPQRKTKRNTIRRPQDVKFPGGGQIVGGVYVLP RRGPRLG (3a) MEHCV**

**NS3**

YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII (1a) AF009606  
 YMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII (1a) M62321  
 YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADAGCSGGAYDIII (1a) M67463  
**YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII (1a) MEHCV**

**NS4A**

IIPDREVLYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKALGL (1a) AF009606  
 IIPDREVLYREFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKALGL (1a) M62321  
 IIPDREVLYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKALGL (1a) M67463  
**IIPDREVLYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKALGL (1a) MEHCV**

**NS4B**

IAFASRGNHVSPTHYV (1a) AF009606  
 IAFASRGNHVSPTHYV (1a) M62321  
 IAFASRGNHVSPTHYV (1a) M67463  
**IAFASRGNHVSPTHYV (1a) MEHCV**

**NS5**

PPLVETWKKPDYEPPVH (1a) AF009606  
 PPLVETWKKPDYEPPVH (1a) M62321  
 PLLVETWKKPDYEPPVH (1a) M67463  
**PPLVETWKKPDYEPPVH (1a) MEHCV**

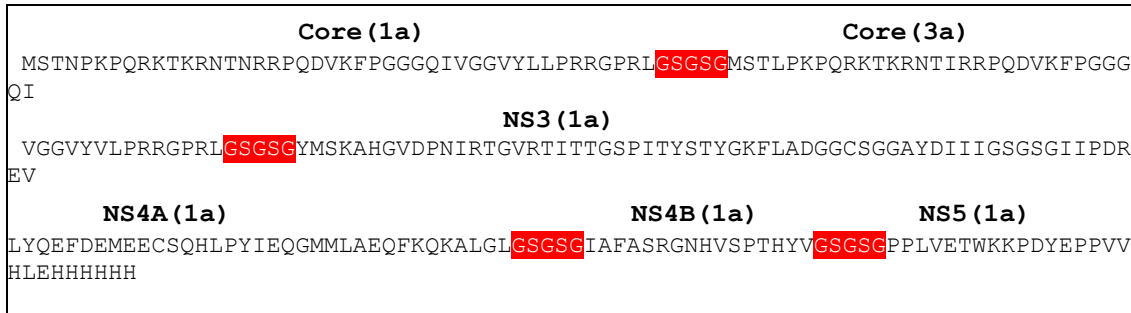
**Figura 3 - Alinhamento das diversas regiões imunodominantes de isolados HCV sorotipos 1a e 3a.**

As seqüências utilizadas para este alinhamento foram obtidas do GenBank sob os números de acesso AF009606, M62321 e M67463 e do site <http://euHCVdb.ibcp.fr/euHCVdb/>. Em vermelho, estão as seqüências selecionadas para compor a proteína multiepítipo. As diferenças na proteína core dos sorotipos 1a e 3a estão sublinhadas. MEHCV representa a seqüência consenso para o desenho da proteína multiepítipo construída nesse trabalho.



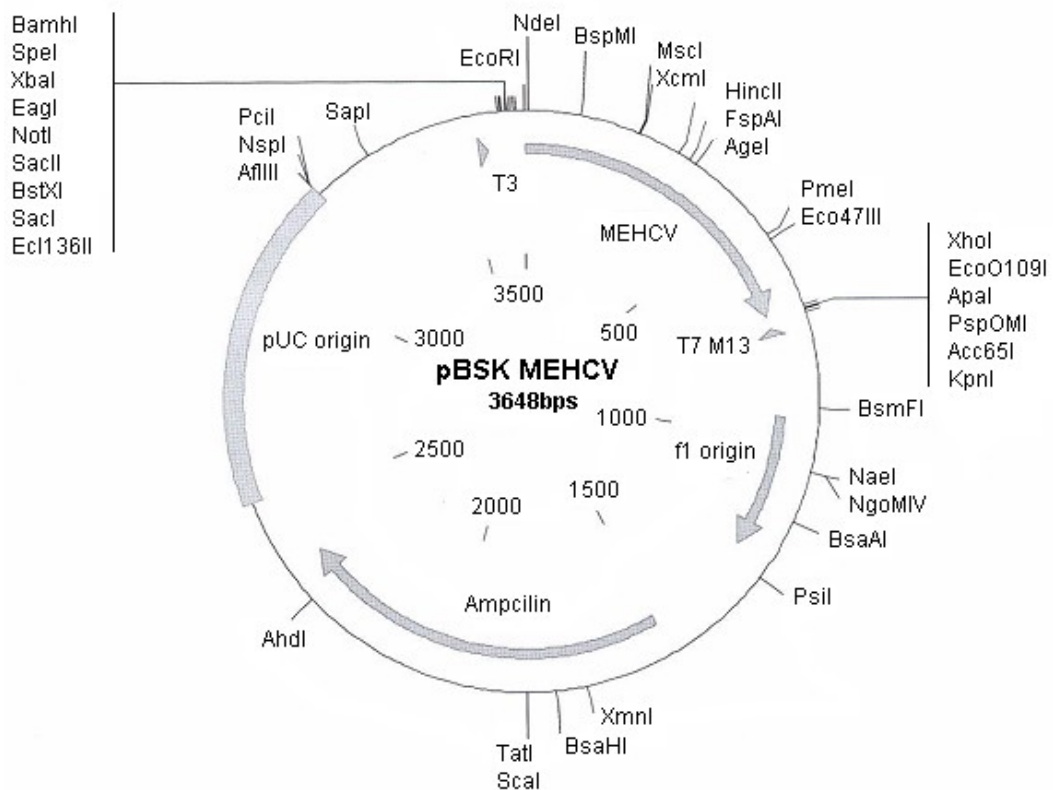
**1 MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATR CORE**  
 51 KTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP  
 101 RGSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGPALGGAARA  
 151 LAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYQVRNSSL  
 201 YHVTDNCPNSSIVYEADAAILHTPGCVPCVREGNASRCWAVTPTVATRD  
 251 GKLPFTQLRRHIDLLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVQGQFTFSRRHW  
 301 TQDCNCSIYPGHITGHRMAWDMMNWSPTAALVVAQLLRIPQAIMDMIAG  
 351 AHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLLFAGVDAETHVTGGSAGRTTAGLV  
 401 GLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLAGLFYQHKFNSS  
 451 GCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPCGIVPAK  
 501 SVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTPLPLGNWF  
 551 GCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSG  
 601 PWITPRCMVDYPYRLWHYPTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWRTRQ  
 651 RCDLEDRDRSELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTLPALSTGLIHLHQNVIVDQ  
 701 YLVGVGCSIYASWAIKWEYVLLFLLLADARVCSCLWMMLLISQAEAALEN  
 751 LVILNAASLAGTHGLVSFLVFFCFAWYKGRWVPGAVYAFYGMWPLLLLL  
 801 LALPQRAYALDTEVAASC GGVLVGLMALTLSPYKRYISWCMWWLQYFL  
 851 TRVEAQLHVWVPLNVRGGRDAVILLMCVVHPTLVFDITKLLLAIFGPLW  
 901 ILQASLLKVPYFVRVQGLLRICALARKIAGGHYVQMAIKLGLALTQYVY  
 951 NHLTPLRDWAHNGLRDLAVAVEPVVFSRMEKLI TWGADTAACGDI INGL  
 1001 PVSARRQEIILLGPADGMVSKGWRLAPITAYAQQTRGLLGCITSLTGR  
 1051 DKNQVEGEVQIVSTATQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPIVQ  
 1101 YTNVDQDLVGPAPQGSRSITPCTCGSSDLYLVRHADVIPVRRRDSRG  
 1151 SLLSPRPISYKGS SGGPLCPAGHAVGLFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEN  
 1201 LETTMRSPVFTDNSPPAVPQSFQVAHLHAPTSGSKSTKVPAAAYAAQGYK  
 1251 VLVNPSVAATLGFAYMSKAHGVDNIRITGVRTITTTGSPITYSTYKFL **NS3**  
**1301 ADGGCSGGAYDII** CDECHSTDATSILGIGTVLDQAETAGARQAVVITPAV  
 1351 PPGSVTVSHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGRHLIFCHSKKCC  
 1401 DELAAKLVALGINAVAYRGLDVSIVPTSGDVVVVSTDLMTGFTGDFDS  
 1451 VIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETTLTPQDAVSRTRRRGRTGRGKPGIYR  
 1501 FVAPGERPSGMFDSVLCCEYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTFGLPV  
 1551 CQDHLFEWEGVFTGLTHIDAHFLSQTKQSGENFPYLVAYQATVCARAQAP  
 1601 PPSWDQMWKCLIRLKP TLHGPTLLYRLGAVQNEVTLTHPI TKYIMTCMS  
 1651 ADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAAYCLSTGCVVIVGRIVLSGKPAI **IPDREV NS4A**  
**1701 LYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLL**QTASRQAEVITPAV  
 1751 QTNWQKLEVFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTAAVTSP  
 1801 LTTGQTLLEFNILGGWVAAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGLGKVLVD  
 1851 ILAGY GAGVAGALVAFKIMS GEVPSTEDLVNLLPAILSPGALVGVVCAA  
 1901 ILRRHVGPGEAVQWMNRL **IAFASRGNHVSPTHYV**PESDAAARVTAI LSS **NS4B**  
 1951 LTVTQLLRRLHQWISSECTTPCSGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKLM  
 2001 PQLPGIPFVSCQRGYRGVWRGDGIMHTRCHCGAETGHVKNGTMRIVGPR  
 2051 TCRNMWSTGTFPINA YTTGCTPLPAPNYK FALWRVSAEYVEIRRVGDFH  
 2101 YVSGMTDNLKPCQIPSEFFTELDGVR LHRFAPPCKLLREEVSRVFG  
 2151 LHEYVPGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDPSHITAEAAAGRRLARGSPMAS  
 2201 SSASQLSAPSLKATCTANHSDPAELIEANLLWRQEMGNITRVESENKV  
 2251 VILDSFDPLVAEEDEREVSVAEILRKSRRFARALPVWARPDYN **PPLVET NS5**  
**2301 WKKPDYEPPVH**GCPLPPRSPPVPPPRKRTVVLTSTLSTALAEATK  
 2351 SFGSSSTSGITGDNTTTSSEPAPSGCPPDS DVESYSSMPLEGE PGDPDL  
 2401 SDGSWSTVSSGADTEDVCCSMSYSWT GALVTPCAAEEQKLPINALSNL  
 2451 LRHHNLVYSTTSRSACQRQKVTFDRLQVLD SHYQDVLKEVKAASKVKA  
 2501 NLLSVEEACSLT PPHSAKSKFGY GAKDVRCHARKAVAHINSVWRDLLEDS  
 2551 VTPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVS  
 2601 KLPLAVMGSYGFQYSPGQRFVFLVQAWKSKKTPMGFSYDTRCFDSTVTE  
 2651 SDIRTEEAIYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGGPLTNSRGENCYRRCR  
 2701 ASGVLTTSCGNTLTCYIKARAACRAAGLQDCTMLVCGDDLVVICESAGVQ  
 2751 EDAASLRAFTEAMTRYSAPPDPPQPEYDLELITSCSSNVSAHDGAGKR  
 2801 VYVLTTRDPTTPLARA AWE TARHTPVNSWLGNII MFAPTLWARMILMTHFF  
 2851 SVLIARDQLEQALNCEIYGACYSIEPLDLPPIIQRLHGLSAFSLHSYSPG  
 2901 EINRVAACLRKLGVPPLRAWRRHARSVRARLLSRGGRAAICGKYLFNWA  
 2951 RTKLKLTPIAAAGRLDLSGWFTAGYSGGDIYHSVSHARPRWFVFCLLLLA  
 3001 AGVGIYLLPNR

**Figura 4 - Sequência primária da poliproteína HCV.** Em vermelho, as regiões correspondentes aos epítomos usados para construir a proteína multiepítomo.



**Figura 5 - Seqüência primária da proteína multiepítopo MEHCV, com as diversas regiões imunodominantes (core 1a e 3a, NS3, NS4A/B e NS5) e a terminação *His-tag* (HHHHHH). Os linkers flexíveis estão destacados nas caixas em vermelho.**

O gene MEHCV foi sintetizado nos EUA pela empresa Epoch Biolabs que o enviou clonado no vetor pBluescript SK dando origem ao vetor pBSK-MEHCV (Figura 6). Este gene possui sítios de restrição nas suas extremidades 5' (*NdeI*) e 3' (*XhoI*) que permitem a clonagem em fase no vetor de expressão bacteriano pET-21a digerido com as mesmas enzimas.



**Figura 6 – Mapa Físico do vetor pBSK MEHCV.**

A linhagem Top 10 de *E. coli* foi usada rotineiramente para manipulação de plasmídeo recombinante enquanto a linhagem de *E. coli* BL21 DE3 (pLysS) foi usada em ensaios de expressão. O plasmídeo pET-21a é comercializado pela Novagen (Figuras 7A e 7B).

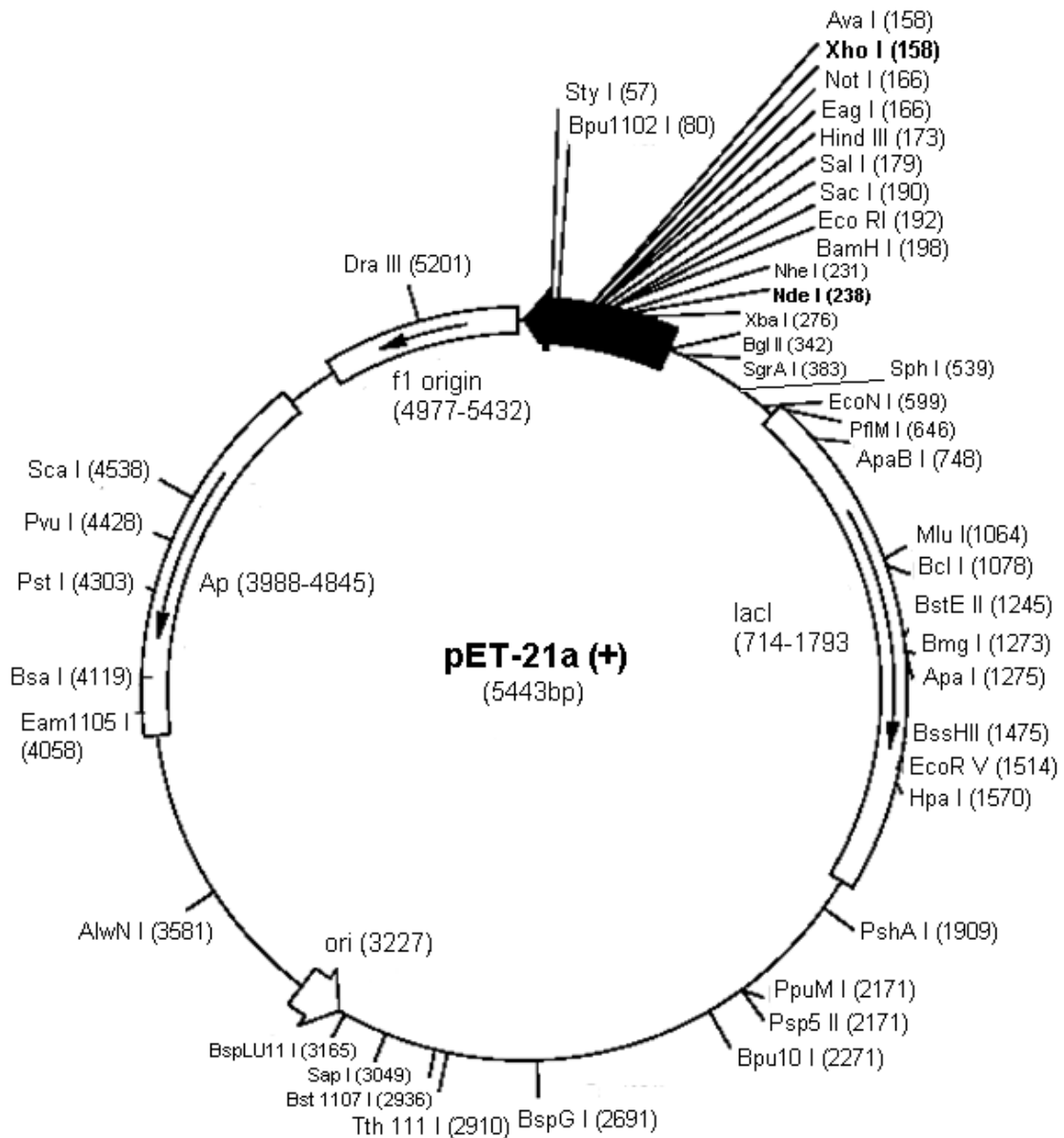
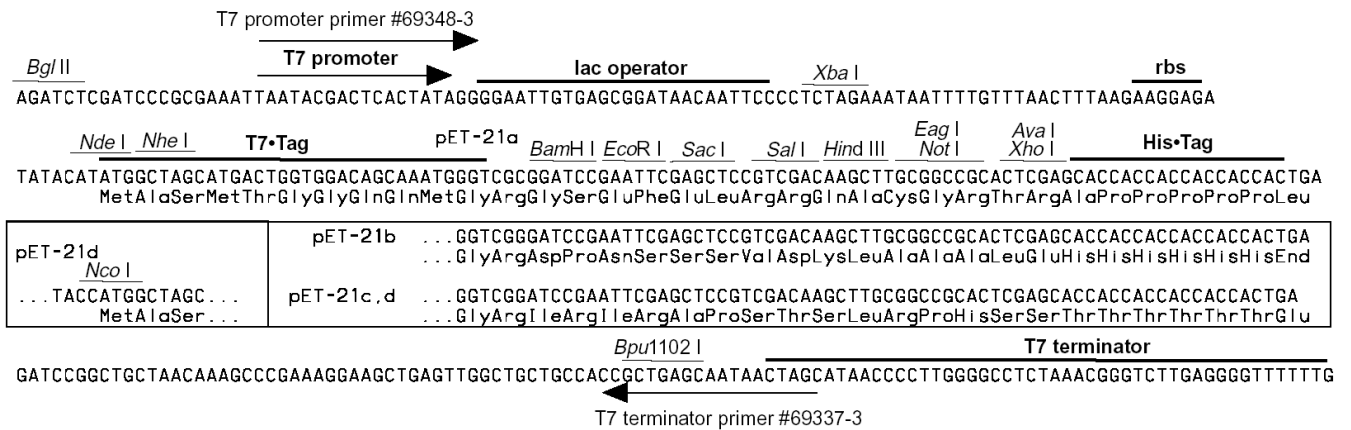


Figura 7A – Mapa físico do vetor pET-21a.



### pET-21a-d(+) cloning/expression region

**Figura 7B - Mapa da região do *polylinker* do vetor pET-21a.** O gene sintético MEHCV foi clonado entre os sítios de *NdeI* e *XhoI* do vetor pET-21a, acrescido da sequência do *His-tag* no C-terminal.

As enzimas de restrição *NdeI* (catatg) e *XhoI* (ctcgag) foram adquiridas da New England Biolabs (EUA), enquanto que a T4 DNA ligase, usada rotineiramente para ensaios de ligação foi adquirida da USB (EUA).

Nas purificações do MEHCV, por cromatografia de afinidade, foi utilizada uma resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (centrifugação) e uma coluna com resina *Ni-NTA (HiTrap affinity columns)*, ambas da Amershan Biosciences.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Clonagem dos genes

O vetor pBluescript SK contendo a seqüência MEHCV foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (também presentes no vetor pET-21a), para liberação do inserto, um fragmento de aproximadamente 720pb.

Após a digestão, foi feita a purificação do inserto (*Purelink Quick Gel Extration Kit* - Invitrogen). Em seguida, este inserto foi sub-clonado no vetor pET-21a, digerido com *NdeI* e *XhoI*, seguindo-se a transformação na célula hospedeira *E. coli* Top 10. O vetor resultante foi denominado pETMEHCV.

Na transformação, metade do sistema de ligação (inserto mais vetor) foi inoculado em células competentes *E. coli* Top 10 e incubado no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi aplicado um choque térmico a 42°C por 90 segundos seguindo-se uma rápida incubação no gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado meio LB às células transformadas e o crescimento da cultura foi realizado sob agitação de 250 rpm por 1 hora a 37°C. A seguir, o sistema foi plaqueado em duas placas contendo LB ágar mais ampicilina. Estas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

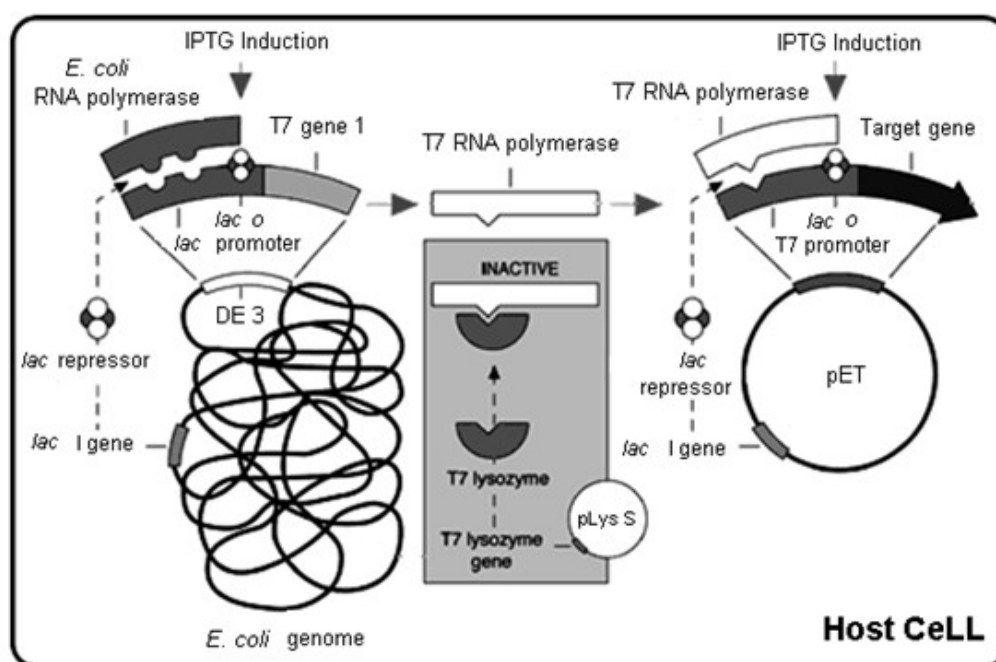
Após a transformação, colônias isoladas foram inoculadas em meio LB mais ampicilina e as culturas foram crescidas sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. Foram realizadas mini-preparações de plasmídeos por lise alcalina (Mini-Prep) das culturas para obtenção do plasmídeo intacto (pETMEHCV), seguindo-se digestão deste com *NdeI* e *XhoI* para confirmação da presença do inserto.

#### 3.3.2 Indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*

Antes de iniciar a indução, foram preparadas células competentes *E. coli* BL21 DE3 (pLysS) (Anexo). Em seguida, o plasmídeo pETMEHCV foi incubado nestas células competentes recém-preparadas, no gelo por 30 minutos. A partir desse momento, foi feito o processo de transformação como descrito anteriormente.

Após a transformação, foi feito um pré-inóculo em tubos estéreis, de 1 clone isolado da placa de transformação com meio LB mais ampicilina. A cultura foi crescida sob agitação de 250rpm a 37°C por 16 horas. Um inóculo foi feito a partir do pré-inóculo, com meio LB mais ampicilina, seguindo-se incubação sob agitação de 250rpm

a 37°C por 30 minutos. Em seguida, o crescimento celular foi acompanhado até atingir OD<sub>600nm</sub> igual a 0,6. Neste momento, foi retirada uma alíquota (tempo zero), que foi centrifugada, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em tampão de amostra 2x SDS-PAGE. No restante da cultura foi adicionado IPTG 1mM e incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm. A Figura 8 mostra a indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*. Esta célula possui o gene da T7 DNA polimerase clonado no genoma sob repressão do operador lac. Uma vez adicionado o agente indutor, IPTG, a expressão da T7 polimerase, assim como do gene heterólogo, são ativadas. O pLysS, presente na célula hospedeira, possui o gene da T7 lisozima que inativa a T7 RNA polimerase, impedindo a expressão do gene. Quando o IPTG é adicionado, a quantidade de T7 lisozima é inferior a da T7 RNA polimerase produzida. Conseqüentemente, esta polimerase se liga ao T7 promotor presente no vetor pET, ativando a expressão do gene heterólogo.



**Figura 8 - Indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*.** (Fonte: <http://bio.takara.co.jp/catalog/images/pETa.gif>).

Alíquotas de células foram retiradas de uma em uma hora para análise em SDS-PAGE. Cada alíquota coletada foi centrifugada, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em tampão de amostra 2x SDS-PAGE. As alíquotas dos tempos

0, 1, 2 e 3 foram analisadas em 2 géis por SDS-PAGE (Gel concentrador 5% e Separador 12%). Após a corrida, o primeiro gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7% e observado através de um transiluminador. O segundo gel foi utilizado para imunodeteção da proteína em membrana de nitrocelulose (*Western blot*), por meio de uma membrana de nitrocelulose (Anexo).

### 3.3.3 Purificação do MEHCV

Após a indução de cultura de células expressando MEHCV, as células foram coletadas por centrifugação usando-se o rotor R10A3 (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi reservado para a purificação da proteína. A purificação foi iniciada com a solubilização do *pellet* em tampão de lise (6M de Guanidina HCl; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 8,0]), seguindo com sonicação (sonicador *Ultrasonic Processor*) e incubação a 4°C por 16 horas. O material lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *Falcon* contendo resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Amershan Biosciences) pré-equilibrada com tampão de lise. O sistema foi incubado sob agitação orbital por 1 hora a 16°C. A seguir, foi feita uma nova centrifugação e coletado o sobrenadante (*flow-through*). O sistema foi lavado extensivamente com tampão 1 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 6,3]), eluído com tampão 2 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 5,9]) e novamente eluído, com tampão 3 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 4,5]). Após cada lavagem, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para análise posterior em gel desnaturante. A seguir foi feita a análise destas frações em gel SDS-PAGE, que foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. O restante do sistema, eluído com tampão 3, foi submetido à diálise contra tampão 3 (pH 4,5) em membrana de celulose. Como houve precipitação do sistema, o material foi centrifugado. Amostras do sobrenadante e do *pellet* foram analisadas em gel de poliacrilamida que foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, para confirmar que a proteína recombinante estava no *pellet*. Sendo assim, todas alíquotas com o *pellet* foram solubilizadas com bicarbonato de amônio 50mM (pH 6,5). A seguir foi feita a dosagem da concentração desta proteína pelo método de *Bradford*. O restante das alíquotas foram armazenadas a 4°C.

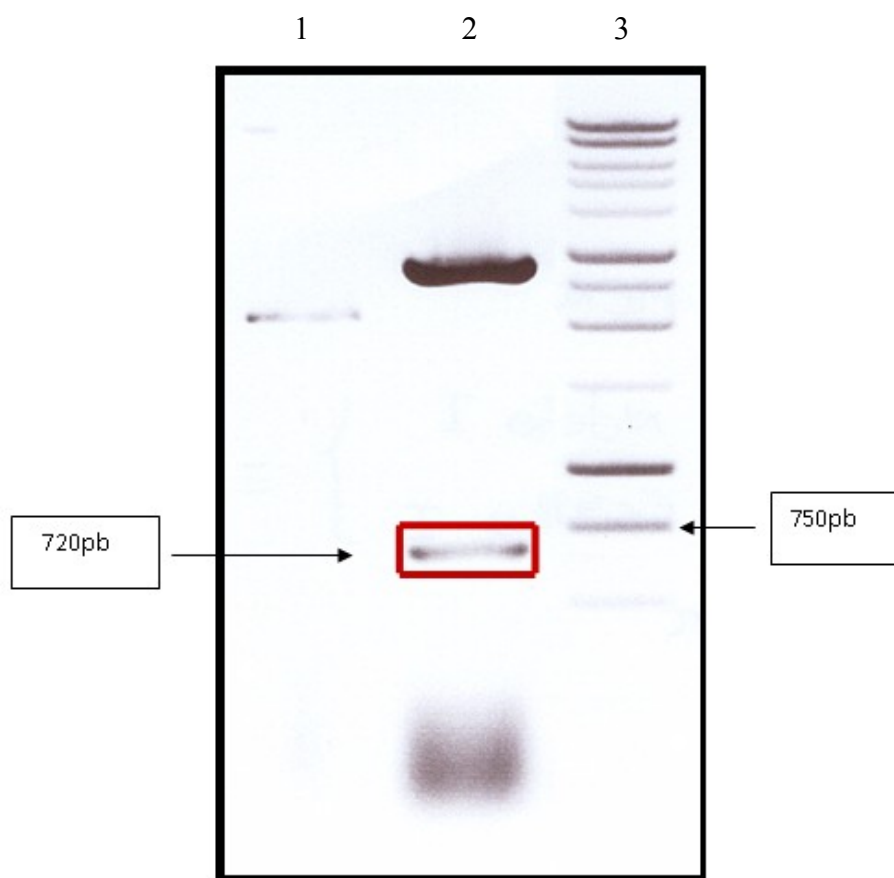
Para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA, foi realizada uma nova indução, como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação usando-se o rotor R10A3 (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi reservado para a purificação. Esta foi iniciada com a solubilização do *pellet* em tampão de lise (6M de Guanidina HCl; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 8,0]), seguindo com sonicação (sonicador *Ultrasonic Processor*) e incubação a 4°C por 16 horas. O material lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para a coluna com resina Ni-NTA ((Hitrap Chelating HP, 1m - Amershan Biosciences), lavada com H<sub>2</sub>O destilada e sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>), e pré-equilibrada com tampão de lise. Após todo material passar pela coluna, esta foi lavada extensivamente com tampão 1 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 6,3]), eluída com tampão 2 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 5,9]) e novamente eluída, com tampão 3 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 4,5]). Após cada lavagem, foram coletadas alíquotas para análise posterior em gel desnaturante. A seguir foi feita a análise destas frações em gel SDS-PAGE, que foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Clonagem dos Genes

O gene sintético MEHCV foi sintetizado nos EUA pela empresa Epoch Biolabs que o enviou clonado no vetor pBluescript SKII, o qual foi submetido a análise de restrição (Figura 9), para verificar a presença do inserto de cerca de 720pb correspondente ao gene MEHCV, assim como dos sítios de clonagem.

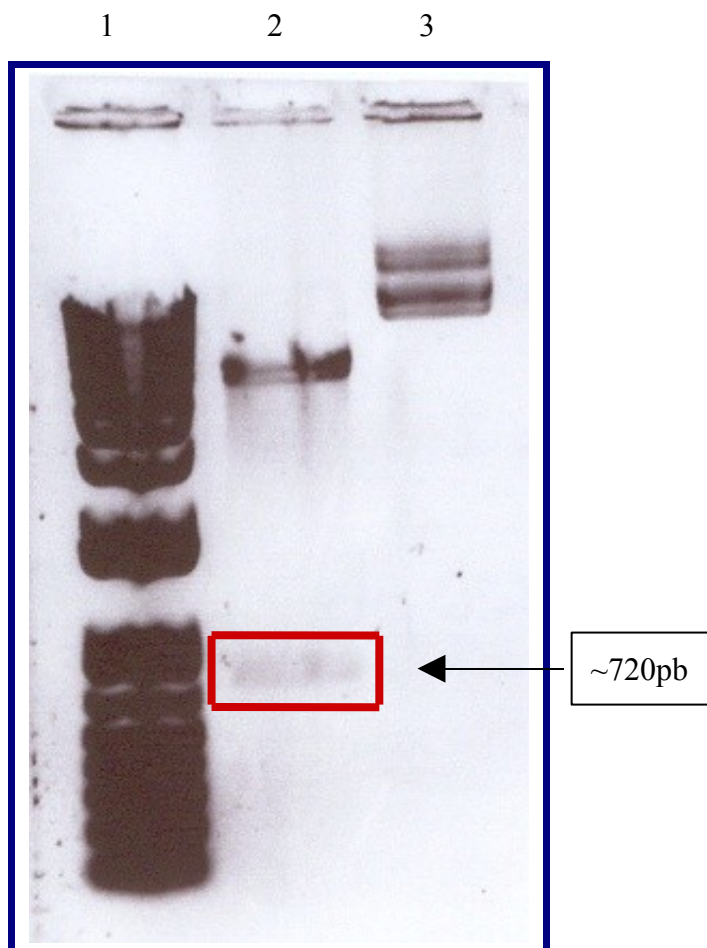


**Figura 9 - Análise de restrição do vetor pBluescriptSK contendo o gene MEHCV.** 1) vetor intacto; 2) Digestão com *NdeI/XhoI*; 3) Marcador 1kb DNA ladder (Promega).

Após a digestão do inserto com *NdeI/XhoI*, foi feita a purificação do inserto de ~720pb, utilizando o *kit Purelink Quick Gel Extration* (Invitrogen). Da mesma forma, o vetor pET-21a foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI/XhoI*. O inserto foi ligado ao vetor seguindo-se transformação de células de *E. coli* TOP10.

Após a transformação de células competentes *E. coli* Top 10, seis colônias isoladas foram inoculadas em meio LB mais ampicilina por 16 horas. Foi feita uma

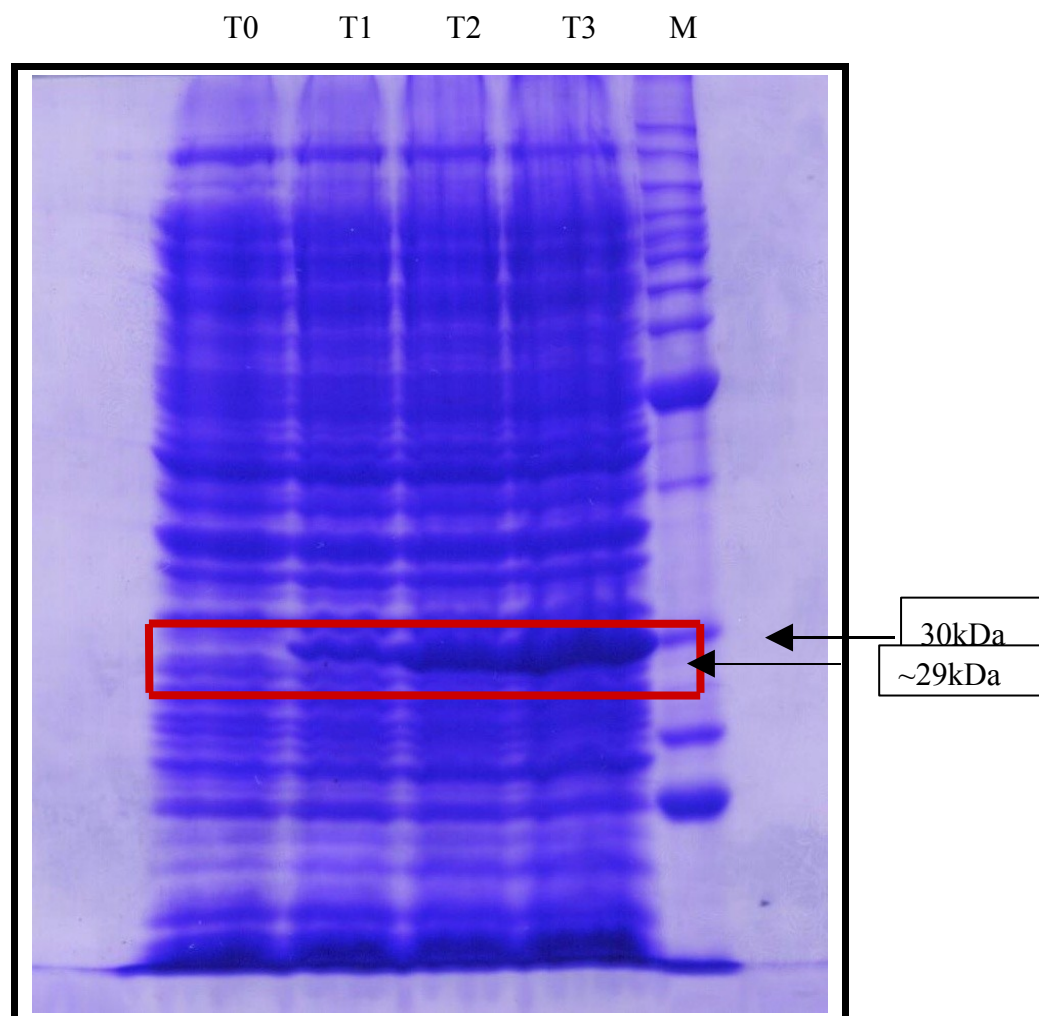
mini-prep destas culturas para obtenção do plasmídeo intacto (pETMEHCV), seguindo-se digestão deste com *NdeI* e *XhoI* para confirmação da presença do inserto. A Figura 10 mostra o resultado de uma dessas digestões que confirmam a clonagem.



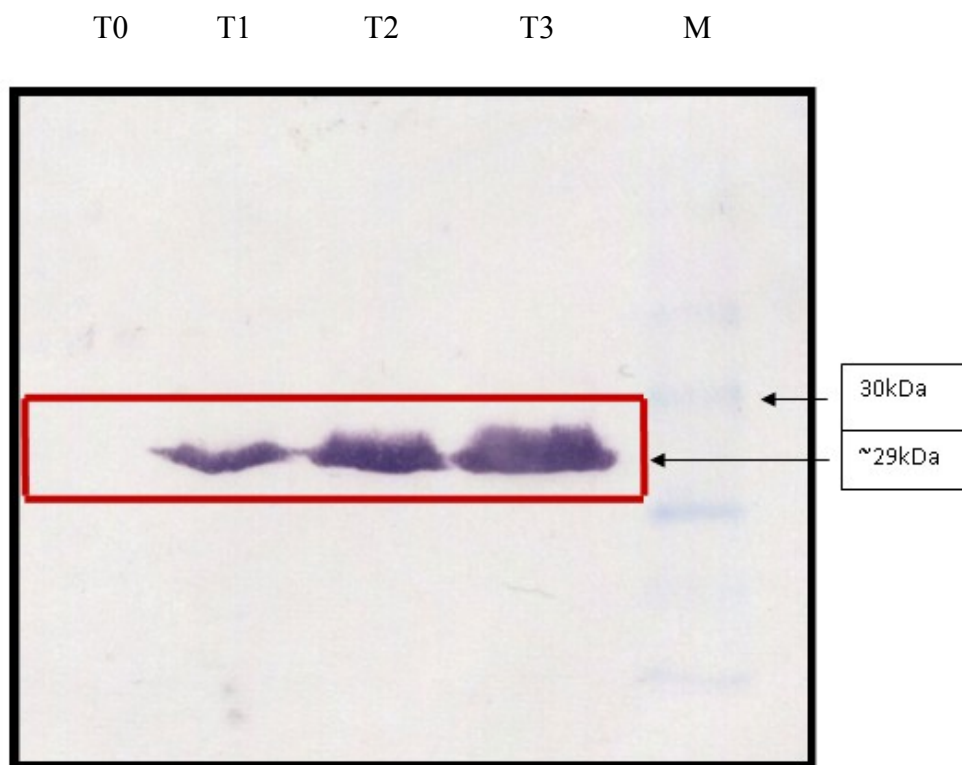
**Figura 10 – Análise de restrição do vetor pET MEHCV.** 1) Marcador 1kb ladder plus (Invitrogen); 2) Digestão com *NdeI/XhoI* para confirmação da ligação do inserto como vetor pET21a (~720pb) e 3) Plasmídeo intacto.

#### 4.2 Indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*

O vetor pETMEHCV foi utilizado para transformar a linhagem hospedeira para expressão em *E. coli* BL21 DE3 (pLysS). Esta célula possui o gene da T7 DNA polimerase clonado no genoma sob repressão do operador lac. Uma vez adicionado o agente indutor, IPTG, a expressão da T7 polimerase, assim como do gene heterólogo, são ativadas. Como mostrado na Figura 11, observou-se uma banda de indução com uma massa molecular de ~29kDa. Para confirmação da indução, foi feito um *Western blot* (Figura 12).



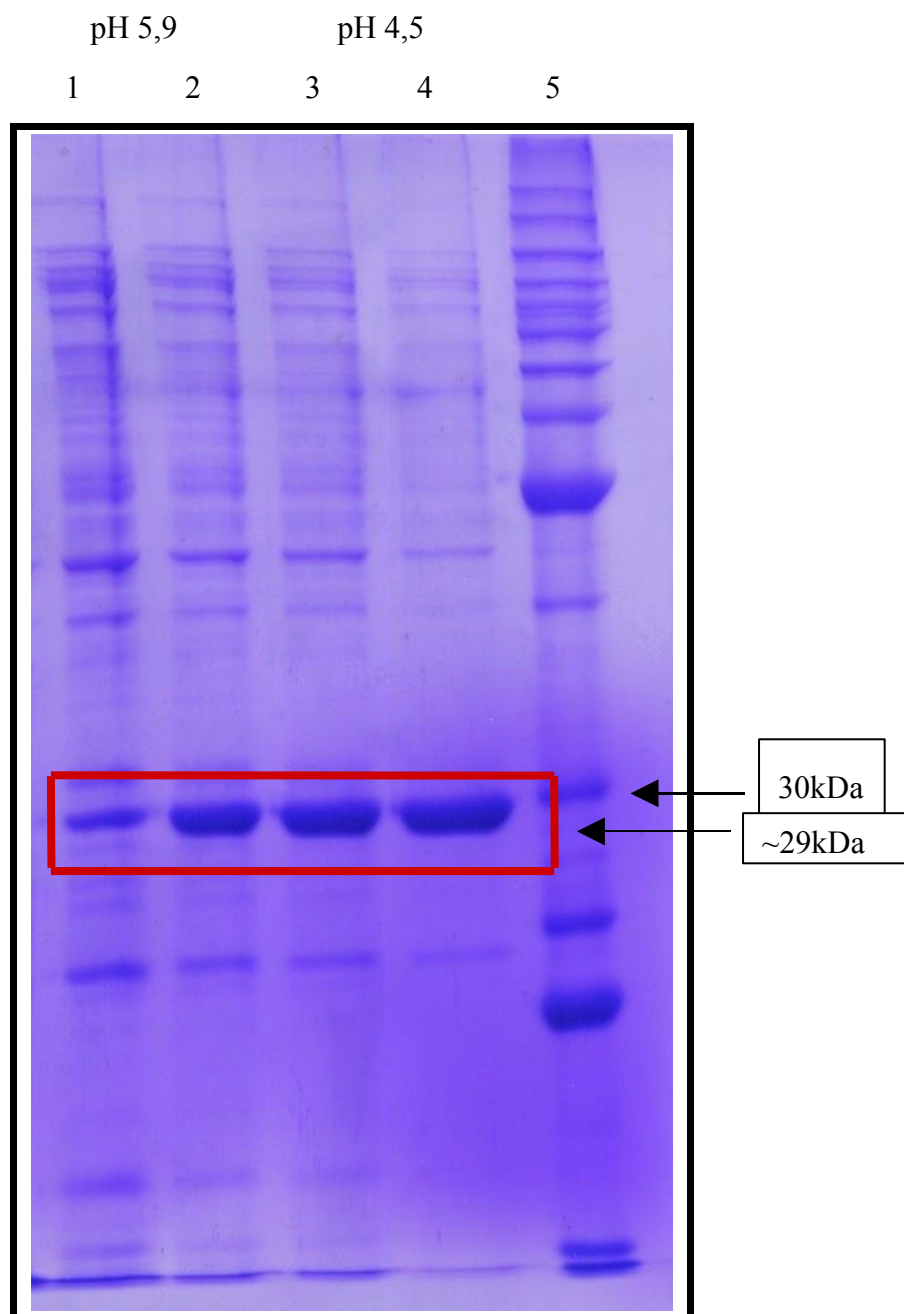
**Figura 11 - Indução da expressão da proteína MEHCV em *E. coli*.** Amostras da cultura foram coletadas em diversos tempos, 0 (poço 1), 1 hora (poço 2), 2 horas (poço 3) e 3 horas (poço 4), e analisadas em gel SDS-PAGE 12%. O poço 5 representa o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder).



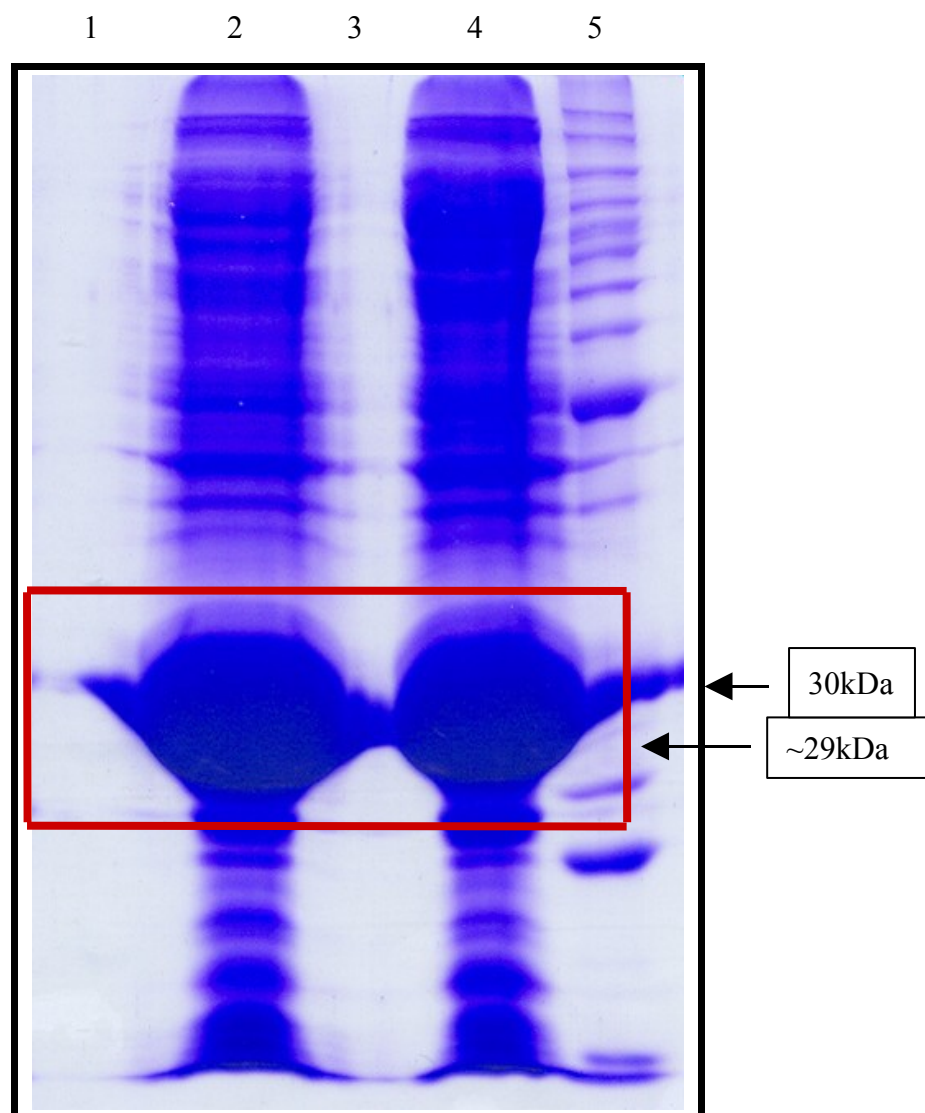
**Figura 12 - Western blot da indução da expressão da proteína MEHCV em *E.coli*.** Tempo 0 (poço 1), 1 hora (poço 2), 2 horas (poço 3) e 3 horas (poço 4). O poço 5 representa o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder).

### 4.3 Purificação do MEHCV

Após clonagem no vetor pET-21a, a proteína produzida passou a ter 6 histidinas no C-terminal, o que permitiu a purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel. Sendo que, para esta purificação, a proteína MEHCV foi solubilizada com Guanidina HCl 6M pH 8,0 e eluída com Uréia 8M pH 5,9 e pH 4,5 (Figura 13). O restante do sistema, eluído com tampão 3, foi submetido à diálise contra o mesmo tampão em membrana de nitrocelulose. Como houve precipitação, o material foi centrifugado e a análise do sobrenadante e do *pellet* foi feita em gel SDS-PAGE (Figura 14).



**Figura 13 - Purificação da proteína MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 12%.** Os poços 1 e 2 representam as frações obtidas a partir da eluição com uréia 8M pH 5,9; os poços 3 e 4 as frações da eluição com uréia 8M pH 4,5 e o poço 5 representa o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder).



**Figura 14 – Diálise da purificação contra tampão 3 (pH 4,5) após centrifugação.** Os poços 1 e 3 representam o sobrenadante; os poços 2 e 4 o *pellet* com a proteína e o poço 5 representa o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder).

Para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA, a proteína MEHCV foi solubilizada com Guanidina HCl 6M pH 8,0 e eluída com Uréia 8M pH 5,9 e pH 4,5 (dado não mostrado).

## 5 DISCUSSÃO

Na população mundial, o HCV apresenta uma alta heterogeneidade e uma distribuição geográfica diferenciada quanto aos seus subtipos, o que pode influenciar alguns aspectos relativos à patogenicidade, infecção e uma baixa resposta terapêutica. No Brasil, em recente estudo realizado em 1688 indivíduos infectados pelo HCV, foi verificada a seguinte frequência: 64,9% para o genótipo 1; 4,6% para genótipo 2; 30,2% para genótipo 3; 0,2% para genótipo 4 e 0,1% para genótipo 5, encontrando-se diferenças regionais para esta distribuição (Campiotto *et al.*, 2005).

No trabalho de Martins *et al.* (2006), foram determinados os genótipos do HCV circulantes na Região Centro-Oeste do Brasil em amostras de 250 doadores de sangue anti-HCV positivos. Em 205 destas foi confirmada a positividade para anti-HCV e em 165 foi detectado o RNA-HCV, as quais foram genotipadas. Os tipos 1, 2 e 3 do HCV foram encontrados em 67,9%; 3% e 29,1% dos doadores, respectivamente. No Estado de Mato Grosso do Sul, os subtipos 1a e 1b foram igualmente detectados (36,8%), seguidos por 3a (21,1%), enquanto no Distrito Federal, o subtipo 3a (39%) foi mais frequente que 1a (31,7%), sendo o restante (29,3%) identificado como subtipo 1b. Em Goiás e Mato Grosso, o mais prevalente foi o subtipo 1a com 50%, seguido pelos subtipos 3a (30,9%) e 1b (29,5%), respectivamente. Desse modo, a escolha das seqüências imunodominantes dos genótipos do HCV foi fundamentada na maior frequência encontrada na região no momento do início deste trabalho.

Baseado na abordagem de Dipti *et al.* (2006), o gene sintético MEHCV foi desenhado semelhante à proteína multiepitopo indiana (HCVFMPEP), mas com a inclusão de seqüências imunodominantes dos mais prevalentes sorotipos presentes no Brasil (sorotipos **1a** e **3a**) e uma *His-tag* na região C-terminal para facilitar a purificação da proteína recombinante expressa em bactéria. A escolha dos epítomos foi baseada em vários estudos, onde esses deveriam ser imunodominantes, lineares, filogeneticamente conservados na maioria dos genótipos do HCV, espalhados em diferentes partes do mundo e apresentar anticorpos específicos para anti-HCV (Khudyakova *et al.*, 1995; Sailberg *et al.*, 1992; Dipti *et al.*, 2006). Foram selecionados os epítomos representando as seguintes proteínas do HCV dos genótipos 1a e 3a: core (1a), core (3a), NS3 (1a), NS4A (1a), NS4B (1a) e NS5 (1a), cujas seqüências foram obtidas a partir do site da European Hepatitis C Virus Database - <http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/>.

O uso de uma proteína multiepitopo foi devido a uma considerável redução nos custos de produção dos *kits* de detecção do HCV, pois essa substitui as diversas proteínas recombinantes e peptídeos que compõem estes *kits*. Dipti *et al.* (2006), recentemente, expressou com sucesso uma proteína multiepitopo consistindo de vários epítopos imunodominantes lineares de proteínas estruturais e não-estruturais do principal sorotipo HCV presente na Índia. O gene sintético foi expresso com sucesso em *E. coli* e a proteína recombinante purificada foi eficientemente testada em um *kit* de diagnóstico para hepatite C.

A clonagem do gene MEHCV no vetor de expressão bacteriano pET-21a foi obtida com sucesso, pois o gene possui sítios de restrição que também estão presentes no vetor de expressão. O plasmídeo pET-21a é comercializado pela Novagen e é um típico vetor de expressão induzida intracelular para *E. coli*. Neste vetor, a transcrição do gene heterólogo é controlada pelo forte promotor viral T7 e este é reprimido pela região operadora *lac* onde se liga o repressor *lac*. Para utilizar este vetor é preciso transformá-lo em uma célula que possua o gene da T7 RNA polimerase no cromossomo, como é o caso da *E. coli* BL21 DE3 (pLysS).

A expressão de proteínas heterólogas, geralmente, é realizada utilizando-se cepas de *E. coli* como célula hospedeira. Este emprego é amplamente difundido por causa da facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli*, e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que se produz (Huang *et al.*, 2004). O DNA deve ser clonado de maneira que sua fase de leitura (*ORF*) fique em orientação com o códon de iniciação ATG. Além disso, um vetor para expressão em *E. coli* deve apresentar as seguintes características: origem de replicação, região promotora, sítio múltiplo de clonagem (*Polylinker*), gene de resistência a antibióticos e um ATG iniciador (Maranhão *et al.*, 2003). Um sinal de terminação da tradução (códon de terminação) também deve estar presente no vetor ou ser adicionado no inserto. Uma vez construído, o vetor de expressão contendo a seqüência codificadora da proteína de interesse é utilizado para a transformação bacteriana.

Na indução foram utilizadas células competentes de *E. coli* BL21 DE3 (pLysS), porque esta célula possui o gene da T7 DNA polimerase clonado no genoma sob repressão do operador *lac* e uma vez adicionado o IPTG, ocorre a expressão da T7 polimerase, que, por sua vez, transcreve o gene heterólogo. O pLysS, presente na célula hospedeira, possui o gene da T7 lisozima que inativa a T7 RNA polimerase, impedindo a expressão do gene. Quando o IPTG é adicionado, a quantidade de T7 lisozima é



inferior a da T7 RNA polimerase produzida. Conseqüentemente, esta polimerase se liga ao T7 promotor presente no vetor pET, ativando a expressão do gene heterólogo. A imunodectecção de proteína em membrana de nitrocelulose (*Western blot*) foi realizada para confirmar a presença da *His-tag*. Esta técnica consiste na detecção de pequenas quantidades de proteínas adsorvidas em uma membrana de nitrocelulose pela reação com anticorpos específicos desenvolvidos para reconhecer o polipeptídeo que está sendo analisado (Brígido *et al.*, 2003).

A purificação do MEHCV foi realizada por cromatografia de afinidade em resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Amershan Biosciences). Esta resina é ideal para uma rápida e reprodutível purificação de proteínas com cauda de *His*, pois tem uma alta capacidade de ligação a estas proteínas. Além disso, ela é pré-carregada com íons Níquel e é compatível com grande variedade de agentes redutores, detergentes e outros aditivos comuns utilizados no processo de obtenção e purificação de proteínas recombinantes.

Como a purificação da proteína multiepítopo não foi total, uma nova purificação desta proteína, por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA (Hitrap Chelating HP – Amershan Biosciences) foi realizada. Esta coluna é específica para a purificação de proteínas com cauda de *His*, usando diferentes íons metais, ou seja, aperfeiçoa a purificação da proteína mesmo quando os íons Níquel (muitas vezes utilizados na purificação de proteínas recombinantes com cauda *His-tag*) não forem a melhor escolha de íon metais. No entanto, não houve esta purificação devido à presença de proteínas celulares. Sendo assim, na tentativa de alcançar a purificação total desta proteína multiepítopo, seria interessante a utilização de um novo protocolo, com a extração dos corpos de inclusão (proteína no interior da célula), onde todas as proteínas celulares solúveis seriam retiradas da solução.

## 6 CONCLUSÕES

- 6.1 O desenho do gene sintético (MEHCV), a sub-clonagem deste em vetor de expressão de *E.coli*, a expressão dos genes clonados em *E. coli* e a purificação da proteína multiepítipo expressa foram obtidos com sucesso. Entretanto, a purificação da proteína, por cromatografia de afinidade em resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Amershan Biosciences), não foi total.
- 6.2 A purificação por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA (Hitrap Chelating HP – Amershan Biosciences) não foi alcançada, devido a presença de proteínas celulares na solução.
- 6.3 Na tentativa de alcançar a purificação total desta proteína multiepítipo seria interessante a utilização de um novo protocolo, com a extração dos corpos de inclusão, onde todas as proteínas celulares solúveis seriam retiradas da solução.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberti A. & Benvegnù L. Management of hepatitis C. *J Hepat* 2003;38(suppl. 1):104-118.

Alter HJ. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 1995;85(7):1681-1695.

Amorim RMS, Oliveira CP, Wyant PS, Cerqueira DM, Câmara GNL, Flores LS, *et al.* Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(8):895-897.

Bartenschlager R, Ahlborn LL, Mous J, Jacobsen H. Non-structural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 1993;67(7):3835-3844.

Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81(7):1631-1648.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C pseudo particles containing functional E1 e E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.

Behrens SE, Tomei L, DeFrancesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996;15:12-22.

Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J virol* 2005;79(17):11353-11365.

Brandão ABM, Fuchs SC, Silva MAA, Emer LF. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. *Ver Panam Salud Publica /Pan Am J Public Health* 2001;9(3):161-166.

Brígido MM. *Western blot*: imunodeteção de proteínas em membrana de nitrocelulose. In: Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT, editores. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. 1ª edição. Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2003. p. 187-201.

Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liv Dis* 1995a;15:41-63.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(1):41-49.

Cha TA, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, *et al.* At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(15):7144–7148.

Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J Gen Virol* 1997;78(6):1341–1347.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Procl Natl Acad Sci USA* 1991;88(6):2451-2455.

Damen M, Zaaijer HL, Cuypers HTM, Vrieling H, Van Der Poel CL, Reesink HM, Lelie PN. Reability of the third generation immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion* 1995;35:745-749.

Di Bisceglie AM. Hepatitis C virology and future antiviral targets. *Am J Med* 1999;107:45-48.

Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis I: recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroent* 1983;85:439-462.

Dipti CA, Jain SK, Navin K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. *Prot Expr Purif* 2006;47(1):319-328.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, *et al.* Mutations in the nonstructural protein 5<sup>a</sup> gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334(2):77-81.

Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7(4):473-487.

Gale MJ, Blakely SM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dosset M, Tang NM, *et al.* Control of PKR protein Kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of Kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998;18(9):5208-5218.

Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993;67(5):2832-2843.

Gretch DR, Wilson JJ, Carithers Jr RL, Rosa C, Han JH, Corey L. Detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):289-291.

Gretch DR, Corazon dela Rosa MT, Carithers Jr RL, Wilson RA, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: Correlations and clinical implications. *Ann Inter Med* 1995; 123(5):321-329.

Gretch DR. Use and interpretation of HCV diagnosis tests in the clinical setting. *Clin Liv Dis* 1997;1:543-558.

Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, *et al.* The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535(1):34-38.

Griffin SD, Harvey R, Clerke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004;85(2):451-461.

Huang L, Sineva EV, Hargittai MRS, Sharma SD, Suthar M, Raney KD, *et al.* Purification and characterization of hepatitis C virus non-structural protein 5A expressed in *Escherichia coli*. *Prot Expr Purif* 2004;37:144-153.

Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000;5:129-151.

Khudyakova EYu, Khudyakova SN, Jue LD, Fang S, Fields AH. Linear B-cell epitopes of the NS3-NS4-NS5 proteins of the hepatitis C virus as modeled with synthetic peptides. *Virology* 1995;206:666-672.

Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:160-166.

Koretz RL, Brezina M, Polito AJ. Non-A, non-B postransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology* 1993;17(3):361-365.

Lai MM, Ware CF. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:117-134.

Lau JYN, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, *et al.* Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996;124(10):868-876.

Lauer GM, Walker BD. Medical Progress: Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.

Lohmann V, Körner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 1997;71(11):8416-8428.

Lok A SF, Gunaratnam NT. Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):48S-56S.

Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Munekata E, Tanaka T, Akhane Y, *et al.* Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies direct to the putative core protein. *Hepatology* 1992;16(4):886-891.

Maranhão AQ. Transformação bacteriana. In: Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT, editores. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. 1ª edição. Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2003. p. 129-141.

Martin P, Fabrizi F, Dixit V, Quan S, Brezina M, Kaufman E, *et al.* Automated RIBA hepatitis C virus (HCV) strip immunoblot assay for reproducible HCV diagnosis. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):387-390.

Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto FJD, Mussi A, *et al.* Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006;48(1):53-55.

McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14.

Medina M, Schiff ER. Hepatitis C: diagnostic assays. *Sem Liver Dis* 1995; 15(1):33-40.

Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, *et al.* The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):6104-6108.

Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett* 2004;557(1):99-103.

Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol* 1998;143(12):2493-2503.

Roingard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 2004;96(2):103-108.

Rosemberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C. *J Mol Biol* 2001;313(3):451-464.

Sáez-Alquézar A, Bassit L, Sabino EC. Hepatites virais. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 2001. p. 74-91.

Sailberg M, Rudden U, Wharen B, Magnus O. Immune response to a single peptide containing an immunodominant region of hepatitis C virus core protein: the isotypes and the recognition site. *Immunol Lett* 1992;33:27-34.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, *et al.* The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(20):11646-11651.

Schiff ER, de Medina M, Kahn R. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999 (19 Suppl 1);19:3–15.



Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74(11):2391-2399.

Simmonds P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut* 1997;40:291-293.

Souto FJD, Ribeiro LC, Perazolo GF, Fortes HM, Saldanha AA. Imunoblot como teste suplementar para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C em doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(1):69-71.

Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(1):69-82.

Suzich JA, Tamura JK, Palmer HL, Warrener P, Grakoui A, Rice CM, *et al.* Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993;67(10):6152-6158.

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght, Van Heuverswyn H, *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74(6):1093-1102.

Stuyver L, Wyseur A, Van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2259-2266.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991;65(3):1105-1113.

Taylor DR, Shi ST, Lai MM. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes Infect* 2000;2(14):1743-1756.

Tomei L, Failla C, Santolini E, DeFrancesco R, LaMonica N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 1993;67(7):4017-4026.

Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995;332(22):1463-1466.

Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, *et al.* Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 2002;76(18):9335-9344.

Van Doorn LJ, Kleter B, Pike I, Quint W. Analysis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1784-1787.

World Health Organization. Hepatitis C: Global prevalence. Update. *Wkly Epidemiol Rec* 1997;72(46):341–344.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(2):223-235.

## ANEXO

### Protocolo Geral

#### 1. Clonagem dos genes

##### 1.1 Digestão do vetor pBluescript SK contendo a seqüência MEHCV

10 $\mu$ L do vetor pBluescript SK foram digeridos com 1,5 $\mu$ L de *Nde*I e 1,5 $\mu$ L de *Xho*I (enzimas de restrição), juntamente com 3 $\mu$ L de tampão NEB 4 mais 14 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada, para liberação do inserto. A análise desta digestão foi feita em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (solução uso: 0,1-0,5 $\mu$ g/mL), utilizando o marcador 1kb DNA ladder (Promega).

##### 1.2 Purificação do inserto após digestão

A purificação do inserto foi feita com o kit da Invitrogen, *Purelink Quick Gel Extration kit*, de acordo com as recomendações do fabricante.

##### 1.3 Digestão do vetor pET-21a

10 $\mu$ L do vetor pET-21a foram digeridos com 1,5  $\mu$ L de *Nde*I e 1,5  $\mu$ L de *Xho*I, juntamente com 3 $\mu$ L de tampão NEB 4 mais 14 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada, para sub-clonagem do inserto.

##### 1.4 Sub-clonagem (ligação) do inserto no vetor pET-21a

2 $\mu$ L do inserto foram sub-clonados em 2 $\mu$ L do vetor pET-21a, juntamente com 1 $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase (USB) mais 1 $\mu$ L de tampão 10x (USB) e 4 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mili-Q. Este sistema de ligação foi incubado na câmara fria em banho-maria 16°C *overnight*.

## 1.5 Transformação da ligação em célula hospedeira *E. coli* Top 10

5µL do sistema de ligação foram inoculados em 100µL de célula competente *E. coli* Top 10 e incubado no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi aplicado um choque térmico a 42°C por 90 segundos seguindo-se uma rápida incubação no gelo por mais 2 minutos. Em tubo *Falcon* 15mL, foi adicionado 1mL de meio LB (extrato de levedura 0,5%; peptona de caseína 1%; cloreto de sódio 1%; [pH 7,2]) mais as células transformadas. O crescimento da cultura foi realizado sob agitação de 250rpm por 1 hora a 37°C. A seguir, o sistema foi plaqueado em duas placas contendo LB ágar mais 100µg/mL de ampicilina: uma placa com 100µL do sistema de transformação e outra com o restante das células após breve centrifugação para concentração do sistema. As placas foram incubadas em estufa à 37°C *overnight*.

Após a transformação, seis colônias isoladas foram inoculadas em 15mL de meio LB com 100µg/mL de ampicilina. As culturas foram crescidas sob agitação de 250rpm a 37°C *overnight*. Foram realizadas mini-preparações de plasmídeos por lise alcalina (Mini-Prep) destas seis culturas para obtenção do plasmídeo intacto, por meio das seguintes etapas:

- Coleta de 1,5mL da cultura em tubos tipo *ependorf* por centrifugação à 10.000x g/ 2minutos;
- Descarte do sobrenadante e adição de mais 1,5mL de cultura ao mesmo tubo e repetir a centrifugação nas mesmas condições;
- Descarte do sobrenadante, re-suspensão das células em 200µL de solução I (tris-HCl 25mM, [pH 8,0]; EDTA 10mM, [pH 8,0] e glicose 50mM);
- Adição de 400µL de solução II (hidróxido de sódio 0,2M e SDS 1%) preparada na hora, lentas inversões do tubo para misturar bem e incubação no à temperatura ambiente por no máximo 5 minutos. Nesta etapa, a solução deve ficar mais viscosa em razão da lise das células;
- Adição de 300µL de solução III (acetato de potássio 5M-60mL; ácido acético glacial 11,5mL; H<sub>2</sub>O qsp 100mL; [pH 4,8-5,0]), inversões do tubo e incubação no gelo por 5 minutos. Deve ser observada a formação de um precipitado branco correspondente ao DNA cromossomal;
- Centrifugação a 10.000x g/ 5minutos;
- Transferência do sobrenadante para outro tubo tipo *ependorf*, adição de 750µL de isopropanol e inversão do tubo por várias vezes;

- Centrifugação a 10.000x g/ 5 minutos;
- Descarte do sobrenadante e re-suspensão do precipitado em 200µL de TE (tris-HCl 10mM, [pH 8,0]; EDTA 1mM, [pH 8,0]);
- Adição de 110µL de acetato de amônio 7,5M e vigorosa homogeneização (vortex);
- Centrifugação a 10.000x g/ 10 minutos;
- Transferência do sobrenadante para outro tubo tipo *ependorf*, adição de 750µL de etanol 100% e inversão do tubo por várias vezes;
- Centrifugação a 10.000x g/ 5 minutos;
- Descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado com etanol 70%;
- Centrifugação a 10.000x g/ 2 minutos;
- Descarte do sobrenadante e secagem do precipitado;
- Re-suspensão do precipitado em H<sub>2</sub>O mais RNase 4mg/mL.

Após a mini-prep, foi feita uma digestão de 4µL do plasmídeo intacto (pETMEHCV) com 0,5µL de *NdeI* e 0,5µL de *XhoI*, juntamente com 1µL de tampão NEB 4 mais 4µL de H<sub>2</sub>O, para confirmação da presença do inserto. A análise desta digestão foi feita em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo, utilizando o marcador 1kb ladder plus (Invitrogen).

## 2. Preparo de células competentes *E. coli* BL21 DE3 (pLysS)

- Inoculação de BL21 DE3 (pLysS) em placa de meio LB e incubação em estufa a 37°C *overnight*;
- Escolha de uma colônia isolada para fazer o pré-inóculo em 5mL de meio LB sob agitação de 250rpm a 37°C *overnight*;
- Inóculo com 2mL do pré-inóculo em 30mL de meio LB sob agitação de 250rpm a 37°C *overnight*;
- Verificação da densidade óptica (OD<sub>600</sub>) até atingir 0.3 (± 1 hora e 40 minutos);
- Centrifugação por 10 minutos a 3000rpm e 4°C;
- Ressuspensão do *pellet* em 10mL de CaCl<sub>2</sub> 100mM a 4°C;
- Centrifugação por 10 minutos a 3000rpm e 4°C;
- Ressuspensão do *pellet* em 1mL de CaCl<sub>2</sub> 100mM (4°C);

Em 100µL de células competentes BL21 DE3 (pLysS) recém-preparadas foram inoculados 3µL do plasmídeo intacto pETMEHCV e incubado no gelo por 30 minutos. A partir desse momento, foi feito o processo de transformação como descrito anteriormente.

## 2.1 Indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*

Após a transformação, foi feito um pré-inóculo em tubos estéreis de 50mL, com 20mL de meio LB mais ampicilina inoculado com um clone isolado da placa de transformação. A cultura foi crescida sob agitação de 250rpm a 37°C *overnight*. Foram inoculados 10mL do pré-inóculo em 200mL de meio LB mais ampicilina seguindo-se incubação sob agitação de 250rpm a 37°C por 30 minutos. Em seguida, o crescimento celular foi acompanhado até atingir OD<sub>600nm</sub> igual a 0,6. Neste momento, foi retirada uma alíquota de 1,5mL (tempo zero), que foi centrifugada por 2 minutos a 12.000rpm, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em 50µL de tampão de amostra 2x SDS-PAGE (tris-HCl 200mM, [pH 6,8]; SDS 4%; β-mercaptoetanol 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,1%). No restante da cultura foi adicionado IPTG 1mM e incubou-se sob agitação de 250rpm a 37°C por 1 hora. Alíquotas de células (1mL cada) foram retiradas de uma em uma hora para análise em SDS-PAGE. Cada alíquota coletada foi centrifugada por 2 minutos a 12.000rpm, descartando o sobrenadante e resuspendendo o *pellet* em 50µL de tampão de amostra 2x SDS-PAGE. As alíquotas dos tempos 0, 1, 2 e 3 foram incubadas por 5 minutos a 100°C e, em seguida, foram analisadas em 2 géis por SDS-PAGE (Gel concentrador 5% e Separador 12%), utilizando o marcador de massa molecular (Invitrogen-BenchMark Protein Ladder). Após a corrida, o primeiro gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%; metanol 30% e ácido acético glacial 7% por uma hora, descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7%, por duas lavagens de 1 hora cada e observado através de um transiluminador.

O segundo gel foi utilizado para imunodeteção da proteína em membrana de nitrocelulose (*Western blot*). Primeiramente, o gel foi incubado em tampão de transferência (trizma base 5,8g; glicina-HCl 2,9g; SDS 0,37g; Metanol 200mL e H<sub>2</sub>O qsp 1000mL) por 5 minutos. Enquanto isso foram recortados doze pedaços de filtro *Whatmann* e um pedaço do filtro de nitrocelulose (usando luvas e pinças ao manipular a

nitrocelulose) do tamanho do gel a ser transferido. Em seguida, estes filtros e a membrana foram encharcados com o mesmo tampão de transferência.

Sobre o eletrodo de grafite da cuba de transferência, foi montado o sanduíche de transferência na seguinte ordem: eletrodo positivo, seis pedaços de filtro *Whatmann*, nitrocelulose, gel, seis pedaços de filtro *Whatmann*, eletrodo negativo. Para evitar defeitos na transferência, foi passado um bastão de vidro sobre a nitrocelulose para remover eventuais bolhas. A transferência foi iniciada, conectando-se a cuba à fonte de alimentação, com uma corrente constante a  $5.5\text{mA}/\text{cm}^2$  do minigel e uma voltagem de 10V por 30 minutos. Após, a membrana foi corada com Ponceau'S 1x por 5 minutos sob agitação, descorada com H<sub>2</sub>O destilada e lavada por três vezes de 5 minutos cada, com PBS (cloreto de sódio 150mM, fosfato de sódio monobásico 10mM, nitrito de sódio 0,05%; [pH 7,4]) sob agitação. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5g de leite desnatado mais 100mL de PBST (PBS com 0,1% Tween 20) e incubada por 1 hora a temperatura ambiente no agitador. Após a incubação, a membrana foi lavada por três vezes de 5 minutos cada, com PBS, sob agitação. O anticorpo *His-tag* (1:1000) conjugado da Sigma foi colocado sobre a membrana e incubado por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada por três vezes de 5 minutos cada, com PBS, sob agitação e revelada com 1mL de NBT (nitrozultetrazólio mais dimetil formamida a 70%) e 1mL de BCIP (fosfato de bromo cloroindolil) por 2 minutos. E antes que o fundo da membrana começasse a ficar colorido, a reação foi finalizada lavando a membrana com H<sub>2</sub>O destilada. A membrana foi secada e guardada em papel de filtro à temperatura ambiente.

### 3. Purificação do MEHCV

Após a indução de 200mL de cultura de células expressando MEHCV, as células foram coletadas por centrifugação usando-se o rotor R10A3 (Hitachi), por 20 minutos a 6000rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi reservado para a purificação da proteína. A purificação foi iniciada com a solubilização do *pellet* em 5mL do tampão de lise (6M de guanidina HCl; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de tris-HCl [pH 8,0]), seguindo com 6 pulsos de sonicação por 10 segundos cada (sonicador *Ultrasonic Processor/80-100 tune for minimum*) e incubação a 4°C por 16 horas.

O material lisado foi centrifugado por 30 minutos a 8000rpm e o sobrenadante (4mL) foi transferido para um novo tubo *Falcon* de 15mL contendo 4mL de resina *Ni*

*Sepharose 6 Fast Flow* (Amershan Biosciences) pré-equilibrada com tampão de lise (2 vezes o volume da resina). O sistema foi incubado sob agitação orbital por 1 hora a 16°C. A seguir, foi feita uma centrifugação por 2 minutos a 2000rpm e coletado o sobrenadante (*flow-through*). O sistema foi lavado extensivamente com tampão 1 (8M de uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de tris-HCl [pH 6,3]), por 5 vezes com 6mL do tampão 1 e eluída com tampão 2 (8M de uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de tris-HCl [pH 5,9]), por 4 vezes com 1mL do tampão 2 e novamente eluída com tampão 3 (8M de uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de tris-HCl [pH 4,5]), por 4 vezes com 1mL do tampão 3. Após cada lavagem, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para análise posterior em gel desnaturante. A seguir, foram separados 16µL de cada alíquota e acrescentado 4µL de tampão de amostra 2x SDS-PAGE e incubados por 5 minutos a 100°C. A análise destas frações foi feita em SDS-PAGE que foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%; metanol 30% e ácido acético glacial 7% por uma hora, descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7%, por duas lavagens de 1 hora cada e observado através de um transiluminador.

O restante do sistema foi submetido à diálise contra tampão 3 (pH 4,5) em membrana de celulose *overnight* na câmara fria. Como houve precipitação do sistema, o material foi centrifugado. Em 15µL do sobrenadante foram adicionados 15µL de tampão de amostra 2x SDS-PAGE e no *pellet* 25µL de tampão, incubando por 5 minutos a 100°C. A seguir, fez-se um novo gel de poliacrilamida corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%; metanol 30% e ácido acético glacial 7% por uma hora, descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7%, por duas lavagens de 1 hora cada e observado através de um transiluminador, para confirmar que a proteína recombinante estava no *pellet*. Sendo assim, todas alíquotas com o *pellet* foram solubilizadas com 25µL de bicarbonato de amônio 50mM (pH 6,5).

A seguir foi feita a dosagem da concentração desta proteína pelo método de *Bradford*. A leitura de 10µL da amostra juntamente com 90µL de água destilada mais 1mL do reagente de *Bradford* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*, etanol 95% e ácido fosfórico 85%), foi feita em espectrofotômetro (595nm) após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, onde foi observada uma concentração de 2,5mg de proteína por mL. O restante das alíquotas foram armazenadas a 4°C.

Para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna com resina Ni-NTA (Hitrap Chelating HP, 1mL - Amershan Biosciences), foi realizada uma nova indução, como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas por



centrifugação usando-se o rotor R10A3 (Hitachi), por 20 minutos a 6000rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi reservado para a purificação. Esta foi iniciada com a solubilização do *pellet* em 5mL do tampão de lise (6M de Guanidina HCl; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 8,0]), seguindo com 6 pulsos de sonicação por 10 segundos cada (sonicador *Ultrasonic Processor*) e incubação a 4°C por 16 horas.

O material lisado foi centrifugado por 30 minutos a 8000rpm e o sobrenadante (3mL) foi transferido para a coluna com resina Ni-NTA, lavada (utilizando uma seringa) com 5mL de H<sub>2</sub>O destilada; em seguida; 0,5mL de 0,1M de sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) e por último, 3mL de H<sub>2</sub>O destilada; e pré-equilibrada com 5mL de tampão de lise. Após todo material passar pela coluna (1mL por minuto), esta foi lavada extensivamente com tampão 1 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 6,3]), por 5 vezes com 1mL do tampão 1; eluída com tampão 2 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 5,9]), por 4 vezes com 1mL do tampão 2 e novamente eluída, com tampão 3 (8M de Uréia; 0,1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01M de Tris HCl [pH 4,5]), por 4 vezes com 1mL do tampão 3. Após cada lavagem (1mL por minuto), foram coletadas alíquotas para análise posterior em gel desnaturante. A seguir, foram separados 16µL de cada alíquota e acrescentado 4µL de tampão de amostra 2x SDS-PAGE e incubados por 5 minutos a 100°C. A análise destas frações foi feita em gel SDS-PAGE, que foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%; metanol 30% e ácido acético glacial 7% por uma hora, descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7% por duas lavagens de 1 hora cada e observado, através de um transiluminador.