



XXXIII SIC SALÃO INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Evento	Salão UFRGS 2021: SIC - XXXIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2021
Local	Virtual
Título	Produção da enzima Transcriptase Reversa para realização do ensaio de RT-PCR
Autor	THAYANA COELHO MONTEIRO
Orientador	GUIDO LENZ

Autor: Thayana Coelho Monteiro Orientador: Guido Lenz Instituição: UFRGS

Produção da enzima Transcriptase Reversa para realização do ensaio de RT-PCR.

A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real – RT-PCR é uma técnica que teve sua utilização ampliada no mundo, sendo necessária para diversas aplicações médicas, em pesquisa e forense. Com o quadro atual pandêmico, a utilização da RT-PCR se fez muito necessária na detecção do vírus Sars-Cov-2. A transcriptase reversa é uma enzima essencial na realização de RT-PCR, sendo responsável por converter o RNA viral em DNA complementar. No entanto, o custo dessa enzima é bem elevado, e é em geral, é obtida por importação. Desta forma, o objetivo deste trabalho é realizar a produção da enzima transcriptase reversa para uso comercial com custo mais acessível.

Para a produção, realizamos a transformação de células bacterianas *Escherichia coli* com o plasmídeo pET23a-MMLV-RT (MMLV-RT: transcriptase reversa do vírus da leucemia Murina de Moloney). Após, essas células foram cultivadas em caldo LB com cloranfenicol e ampicilina a 37°C em um agitador orbital a 200 rpm *overnight*. Após foram inoculadas em meio LB a 37°C e 200 rpm com os mesmos antibióticos até alcançarem uma absorbância de 0,7 a 600nm, então a temperatura foi alterada para 20 °C e foi adicionado 1 mM de IPTG. Em seguida, elas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão contendo Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 300 mM de NaCl e 25 mM de imidazol e lisadas em um sonicador de ponta. Por fim, através de centrifugação se separou o sobrenadante que foi adicionado a uma coluna de afinidade à níquel equilibrado com 25 mM de imidazol seguida pelas concentrações de 80 e 500 mM de Imizadol.

Para quantificação, utilizamos o método de Bradford e analisamos as amostras por SDS-PAGE 10%. O resultado deste protocolo foi de uma proteína com atividade equivalente a comercial e com um rendimento de 9 mg/L.