

AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA FACILITADORA TRANSMEMBRANA (MFTP) DE *Stenotrophomonas maltophilia*



JULIANA BOTH ENGEL¹, JEVERSON FRAZZON²
1. Autora, Engenharia de Alimentos, UFRGS;
2. Orientador;



INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma importante enzima capaz de sintetizar moléculas cíclicas, conhecidas como ciclodextrinas (CD), a partir do amido. Tais moléculas são amplamente usadas na indústria de alimentos, pois têm a capacidade de melhorar a estabilidade de aromas, vitaminas e gorduras insaturadas presentes nos alimentos, aumentando a vida de prateleira dos mesmos. Da *Stenotrophomonas maltophilia*, que é um microrganismo isolado do solo e identificado como patógeno hospitalar, foi isolada, clonada e expressa uma CGTase. Entretanto, esta enzima recombinante não pôde ser caracterizada, pois permaneceu no meio intracelular.

OBJETIVOS

Os objetivos do seguinte trabalho foram identificar, isolar e sequenciar o gene codificador da proteína MFTP, que é uma proteína cuja atividade está relacionada ao transporte de outras proteínas para fora da célula, bem como desenvolver um sistema de co-expressão dos genes codificantes das proteínas CGTase e MFTP recombinantes, para que a CGTase possa ser expressa no meio extracelular.

METODOLOGIA E RESULTADOS



Utilizaram-se oligonucleotídeos sintéticos, que foram baseados no genoma completo da *S. maltophilia*.

PRIMERS $\left\{ \begin{array}{l} 5' \text{ NdeI} \\ 3' \text{ XhoI} \end{array} \right\}$ enzimas de restrição

2. Purificação do produto da PCR com Kit

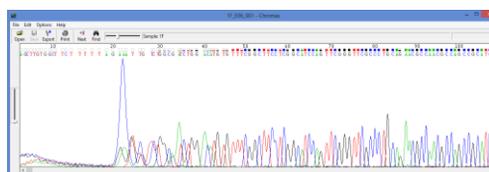
Em seguida foi feito um gel de agarose e o tamanho do fragmento foi confirmado.

3. Sequenciamento do DNA

Utilizou-se o BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit.

4. Análise dos fragmentos

Com o sequenciador ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer automático.



5. Análises de sequência e comparação

Com o programa CLUSTAL W.

6. Pesquisa de homologia

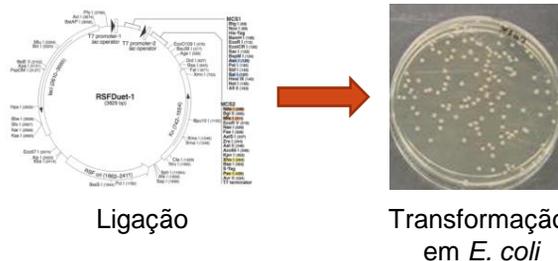
Usando algoritmo de pesquisa BLAST.

CONCLUSÃO

O gene *mft* foi isolado e identificado a partir das técnicas descritas, confirmando um fragmento de 1.485 pares de bases com homologia esperada ao gene presente no DNA da *S. maltophilia*.

PERSPECTIVAS

Clonagem utilizando o plasmídeo DUET e desenvolvimento de um sistema de co-expressão em *Escherichia coli* (BL21DE3).



REFERÊNCIAS

- CHENG, J., WU, D., CHEN, S., CHEN, J., WU, J. High-level extracellular production of α -cyclodextrin glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 59, p. 3797–3802, 2011.
- FOLKERS, G.E., LEVY, N., LIEU, V., OWENS, R.J., PELEG, Y., PINAGLIA, C., QUEVILLON-CHERUEL, S., SALIM, L., SCHEICH, C., VINCENTELLI, R., BUSSO, D. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallography*, v. 62, p. 1218-1226, 2006.