

Clonagem molecular do gene *ruv-1* de *Neurospora crassa* em vetor de expressão para a produção da proteína RUV-1::GFP

Jonatas E. M. Campanella¹ (IC), Fernanda Zanolli Freitas¹(PQ), Maria Célia Bertolini¹(PQ)*.

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araraquara, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos.

Palavras Chave: *Neurospora crassa*, RUV-1, GFP, localização subcelular.

Introdução

O gene *ruv-1* (ORF NCU03482) encontra-se anotado no banco de dados de *N. crassa* como codificando uma proteína do tipo RuvB-like helicase 1, dependente de ATP (Fig. 1). Essas proteínas possuem sinais de localização nuclear clássico (cNLS), sugerindo a localização nuclear e podem ser componentes de grandes complexos proteicos que atuam no processo de remodelagem de cromatina.¹⁻²

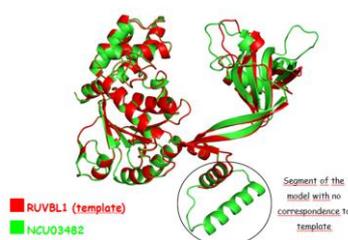


Figura 1. Sobreposição estrutural da proteína RUV-1 de *N. crassa* com a RuvB-1 humana³.

Resultados e Discussão

Foi usado o vetor de expressão pTSL91-A (Fig. 2B), o qual permite a expressão da proteína RUV-1 fusionada à proteína fluorescente GFP versão *superfolder* (sfGFP), na sua extremidade C-terminal. A expressão constitutiva da proteína estará sob o controle do promotor do gene constitutivo de *N. crassa ccg-1*. O gene *ruv-1* foi amplificado por uma reação de polimerase em cadeia (PCR) e digerido com endonucleases de restrição e ligado no vetor de expressão no MCS (*Multiple Cloning Site*) (Fig. 2A).

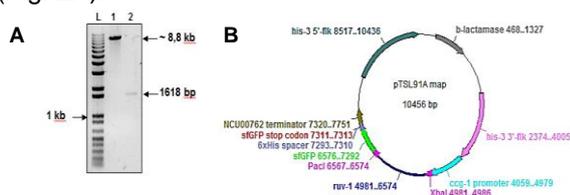


Figura 2. **A.** gene *ruv-1* foi amplificado e digerido com endonucleases de restrição e o vetor foi linearizado no MCS pelas mesmas enzimas. **B.** Construção plasmidial contendo o gene *ruv-1* fusionado ao gene *sfGFP*.

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

A construção plasmidial contendo o gene *ruv-1* foi usada para transformar uma linhagem de *N. crassa* deficiente na produção de histidina. A análise morfológica da linhagem transformante mostrou um retardo no crescimento após 24h/25°C, mas um crescimento normalizado após 48h/25°C, quando comparada com a linhagem mutante (WT) (Fig. 3A). Também foi realizada uma análise de crescimento em frasco Erlenmeyer a 72h/30°C e a microscopia da extremidade das hifas, repetindo o resultado obtido no crescimento das placas (Fig. 3B)

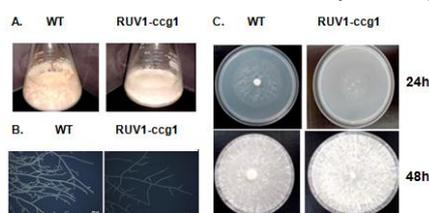


Figura 3. **A.** Crescimento a 30°C/72h. **B.** Análise das extremidades das hifas após 24h. **C.** Análise em placas a 25°C/24h e 48h.

A fluorescência foi visualizada com a excitação e emissão nos comprimentos de onda de 490 e 525 nm (filtro FITC), respectivamente (Fig. 4).

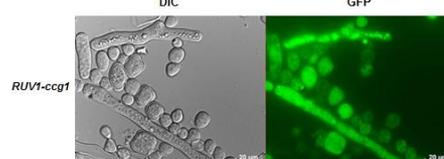


Figura 4. Análise de microscopia de fluorescência da linhagem mutante.

Conclusões

Foi possível visualizar a produção da proteína fusionada à GFP. A linhagem do fungo produzindo a proteína fluorescente será utilizada nos ensaios de localização celular.

Agradecimentos



¹Izumi, N., Yamashita, A., Ohno, S. (2012) *Nucleus* 3: 29-43

²Freitas, F. Z., Chapeaurouge, A., Perales, J., Bertolini, M. C. (2008) *Proteomics* 8: 2052-2061

³Matias, P. M., Gorynia, S., Donner, P., Carrondo, M. A. (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 38918-38929