

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA PROTEÍNA XAC0419(15020.1) DA BACTÉRIA *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Leandro Henrique de Paula Assis¹ e Ljubica Tasic²

INSTITUTO DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA, UNICAMP, P. O. Box 6154, CAMPINAS, 13083-970, SP, BRASIL

¹g062161@iqm.unicamp.br e ²ljubica@iqm.unicamp.br

INTRODUÇÃO

Palavras-Chave: Chaperone Secretória – Purificação de Proteínas – Dicroísmo Circular

O cancro cítrico é uma doença quarentenária comum em regiões de clima quente e úmido, sendo patogênica a todas as variedades de plantas cítricas. O agente bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), um fitopatógeno Gram-negativo, ocasiona severas lesões necróticas na planta hospedeira, gerando prejuízos para a citricultura brasileira. Apesar de se ter pouca informação a respeito dos mecanismos de virulência desta bactéria, acredita-se que chaperones secretórias participem no processo de translocação das proteínas de patogenidade e virulência para a célula infectada.

Nossos estudos consistem na expressão, purificação e caracterização da proteína XAC0419(15020.1), uma possível chaperone secretória do Tipo III. Esta possui 103 resíduos de aminoácidos em sua seqüência peptídica e massa molecular de aproximadamente 10,77 kDa e pI de 7,06. O Dicroísmo Circular tem seu uso na determinação da estrutura secundária da proteína alvo.



Figura 1: Imagens de lesões necróticas causadas pelo cancro cítrico em laranjas, seqüência de genes que codificam a proteína XAC0419(15020.1) e sua estrutura primária. Lesões (A) nos ramos, (B) nas folhas, (C) nos frutos e (D) genes envolvidos na codificação da proteína e respectiva seqüência de aminoácidos.

PARTE EXPERIMENTAL E DISCUSSÃO

A proteína XAC0419(15020.1) foi clonada em vetor pET23a utilizando-se amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) e transformação em cepa de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS. Sua expressão foi executada em meio rico Luria Broth utilizando-se ampicilina (50µg/mL) e cloranfenicol (50µg/mL), etapa conduzida a 37°C com agitação constante de 200 ciclos por minuto. A expressão da proteína alvo foi induzida adicionando-se isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) 1mmol/L em A₆₀₀ de aproximadamente 0,6-0,8.

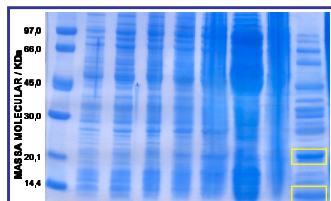


Figura 2: Mapa eletroforético em SDS-PAGE 15%. (A) padrão molecular de proteínas GE; (B) antes da adição de IPTG; (C), (D), (E) e (F) correspondem respectivamente a 1, 2, 3 e 16 horas após indução com IPTG, (G) e (H) sobrenadante e precipitado pós lise, respectivamente; (I) sobrenadante pós diálise. Em (I) banda da proteína monomérica abaixo do padrão de 14,4kDa e da dimerica (proveniente das ligações de dissulfeto devido as cisteínas presentes na cadeia) acima do padrão de 20,1kDa.

Depois de transcorridas 16 horas de indução, as bactérias foram lisadas com tampão-de-lise e ultra-som para promover o rompimento de sua parede celular.

O sobrenadante foi então dialisado com tampão acetato (100mmol/L, pH 5), sendo observado nesta etapa a precipitação de várias proteínas insolúveis neste.

Em função do tampão utilizado na diálise, a proteína de interesse apresentou-se carregada positivamente e por isso usou-se uma resina cromatográfica de troca catiônica (CM-Sepharose GE) para promover a purificação, onde a eluição da mesma está relacionada ao grau de interação desta com a fase estacionária polar.

Uma opção complementar é o uso de uma purificação cromatográfica por exclusão molecular (Superdex GE), onde as proteínas são eluídas segundo a sua massa molecular.

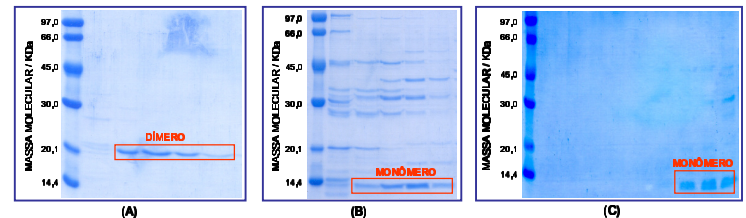


Figura 3 : (A) e (B) purificação em coluna cromatográfica de troca catiônica (CM-Sepharose GE) e (C) purificação em coluna cromatográfica por exclusão molecular (Superdex GE).

A quantificação do dímero pelo método de Bradford (Figura 4) resultou em uma pureza superior a 95% e a análise de uma solução de 50µmol/L deste por Dicroísmo Circular em uma estrutura secundária em α-hélice de 30%.

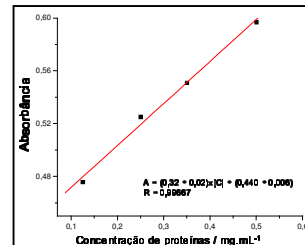


Figura 4: Curva analítica para a quantificação do dímero pelo método de Bradford.

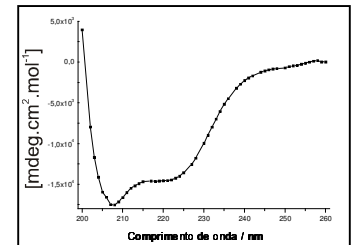


Figura 5: Caracterização do dímero por Dicroísmo Circular. Obtive-se um valor de 30% de α-hélice.

CONCLUSÃO

A proteína XAC0419(15020.1) teve a sua expressão e purificação em quantidades significativas que possibilitaram a análise de sua estrutura secundária e conteúdo de α-hélice (30%), fornecendo dados que guiarão posteriores análises da estrutura 3D desta possível chaperone secretória por Ressonância Magnética Nuclear e Cristalografia de Raios-X.

REFERÊNCIAS

- [1] Tasic, L.; Borin, P. F. L.; Khaler, L.; Ramos, C. H. I.; *Cloning and characterization of three hypothetical secretion chaperone proteins from Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Protein Expression and Purification* 2007, 53, 363-369.
- [2] Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C.; *Fundamentals of Biochemistry*, Wiley, 1998.
- [3] Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.
- [4] Chen, Y. H.; Yang, J. T.; Chau, K. H.; *Biochemistry* 1974, 13, 3350.

AGRADECIMENTOS

