

Avaliação de protocolos para clonagem, expressão e produção de proteína do plasma seminal bovino

Isabella Ester Pires Ribeiro, Tayná Bolsam da Silva, Geniana da Silva Gomes, Ana Carolina Marta Trindade,
Thanyanne Rafaela de Moraes Ferreira, Mariana Machado-Neves.

Introdução

A criopreservação de sêmen ainda representa um desafio significativo para a reprodução de diversas espécies de interesse zootécnico. Esta dificuldade está relacionada a diferenças naturais na crioresistência dos gametas masculinos, que podem responder de diferentes maneiras aos efeitos desse processo. O plasma seminal, componente crucial do ejaculado, desempenha funções essenciais na fertilidade animal e pode influenciar o potencial de criotolerância dos espermatozoides. Dentre seus constituintes, destacam-se as proteínas, que desempenham um papel fundamental na proteção espermática contra os danos provocados pelas variações de temperatura no congelamento e descongelamento. Entre elas, a Binder of Sperm Protein 5 (BSP5) do plasma seminal de bovinos, tem se destacado como potencial biomarcador de alta fertilidade.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi produzir, expressar e purificar a proteína recombinante BSP5 do plasma seminal de bovinos.

Materiais e Métodos

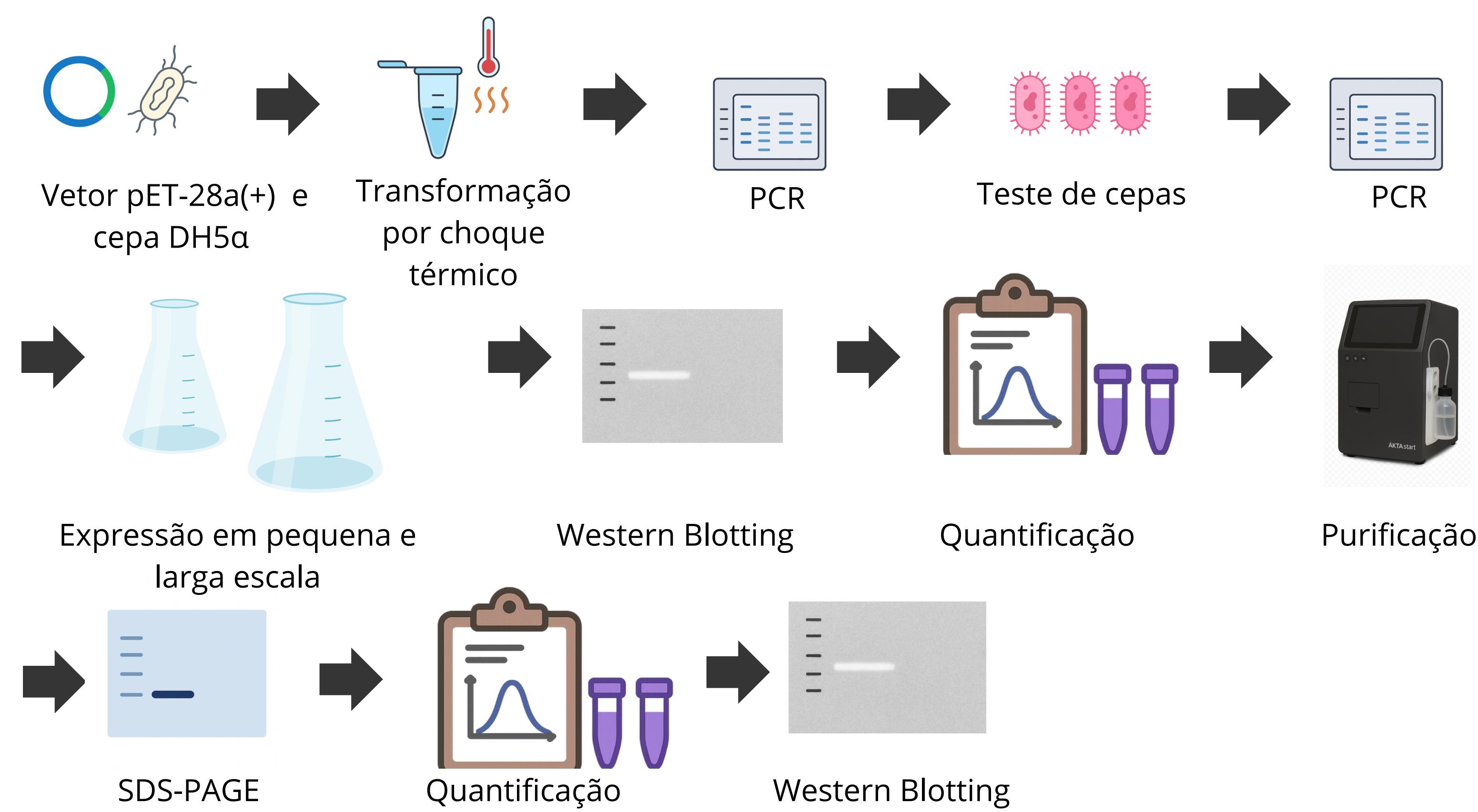


Fig.1. O clone recombinante da proteína-alvo foi introduzido em *E coli* cepa DH5α por transformação por choque térmico, e a clonagem confirmada por PCR. Em seguida, foi realizado o teste de cepas, que incluía a BL21(DE3), SHuffle® T7 e Arctic Express, avaliadas por PCR. A cepa Arctic Express demonstrou ser a mais promissora. Foram realizadas expressões em pequena e larga escala, com identificação da proteína por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e confirmação por imunodetecção por Western blotting. A concentração da proteína recombinante pós expressão foi determinada pelo método de Bradford. Posteriormente, foi realizada a purificação utilizando o sistema ÄKTA Start, por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC). A pureza da proteína foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, a concentração determinada pelo método Qubit, e a identidade confirmada por Western blotting.

ODS9

Pesquisa

Resultados

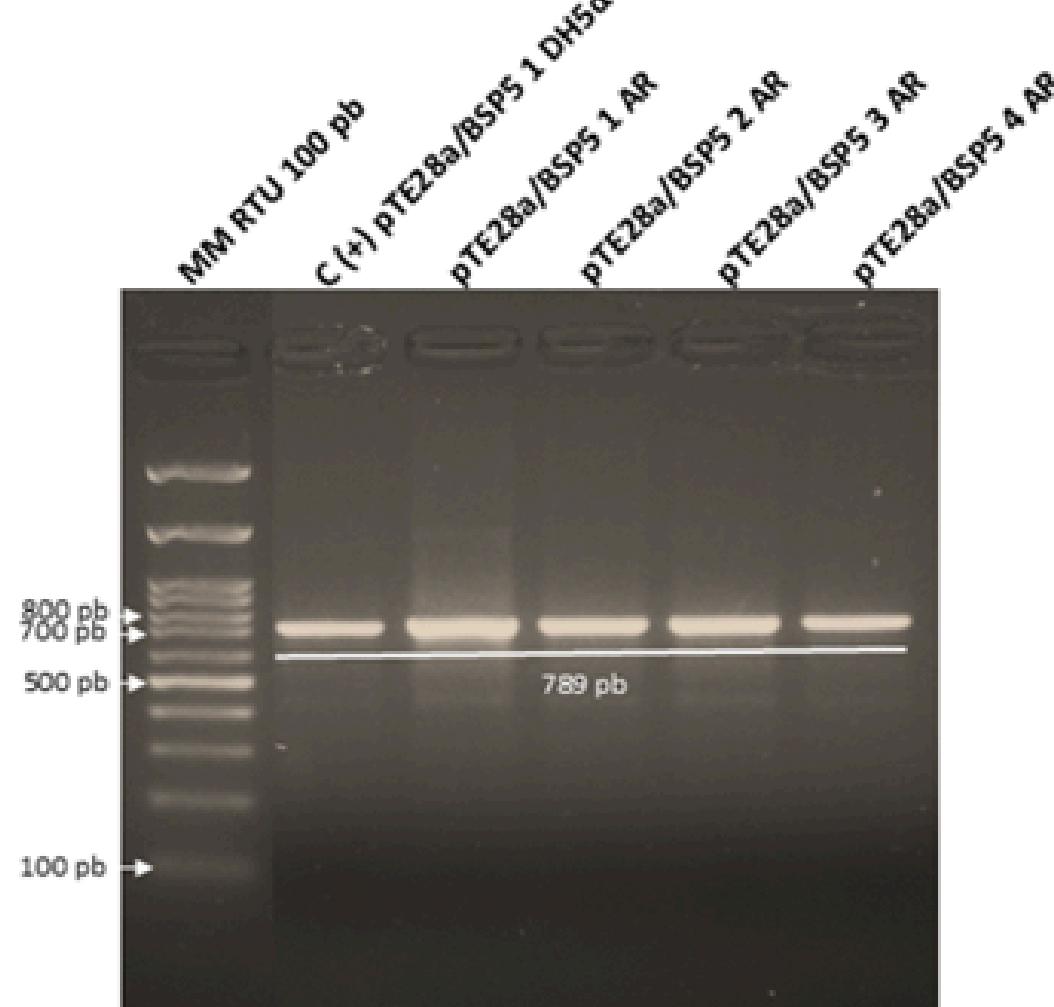


Fig.2. Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os produtos de PCR do gene de pET28a/BSP5-1 transformado na cepa de expressão *E. coli* Arctic Express (1 a 4). Bandas de 789 pb são referentes aos clones 1 a 4 de pET28a/BSP5-1 transformados.

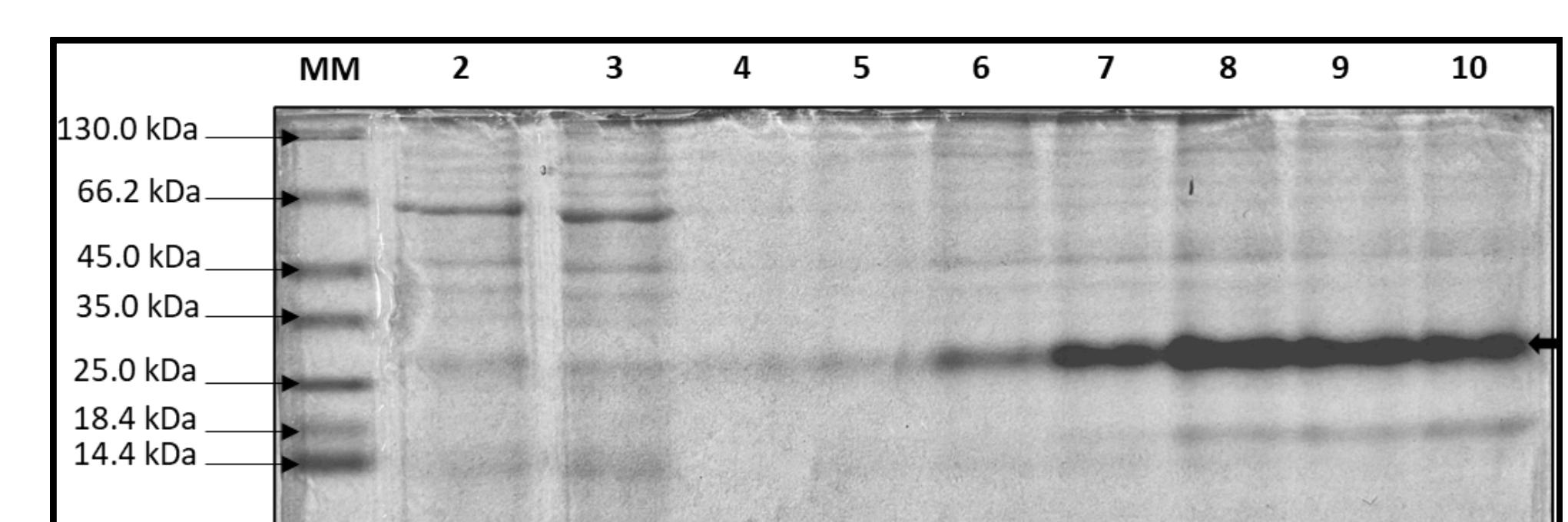


Fig.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 14 % pós purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão. Canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: proteínas filtradas sem purificação; canaleta 3: proteínas não ligadas; canaleta 4: fração de lavagem; canaleta 5: fração 6; canaleta 6: fração 7; canaleta 7: fração 8; canaleta 8: fração 9; canaleta 9: fração 10; canaleta 10: fração 11. MM: Marcador molecular com intervalo de 14,4 a 130 kDa. A seta indica as bandas de BSP5, com peso molecular esperado de aproximadamente 21,07 kDa.

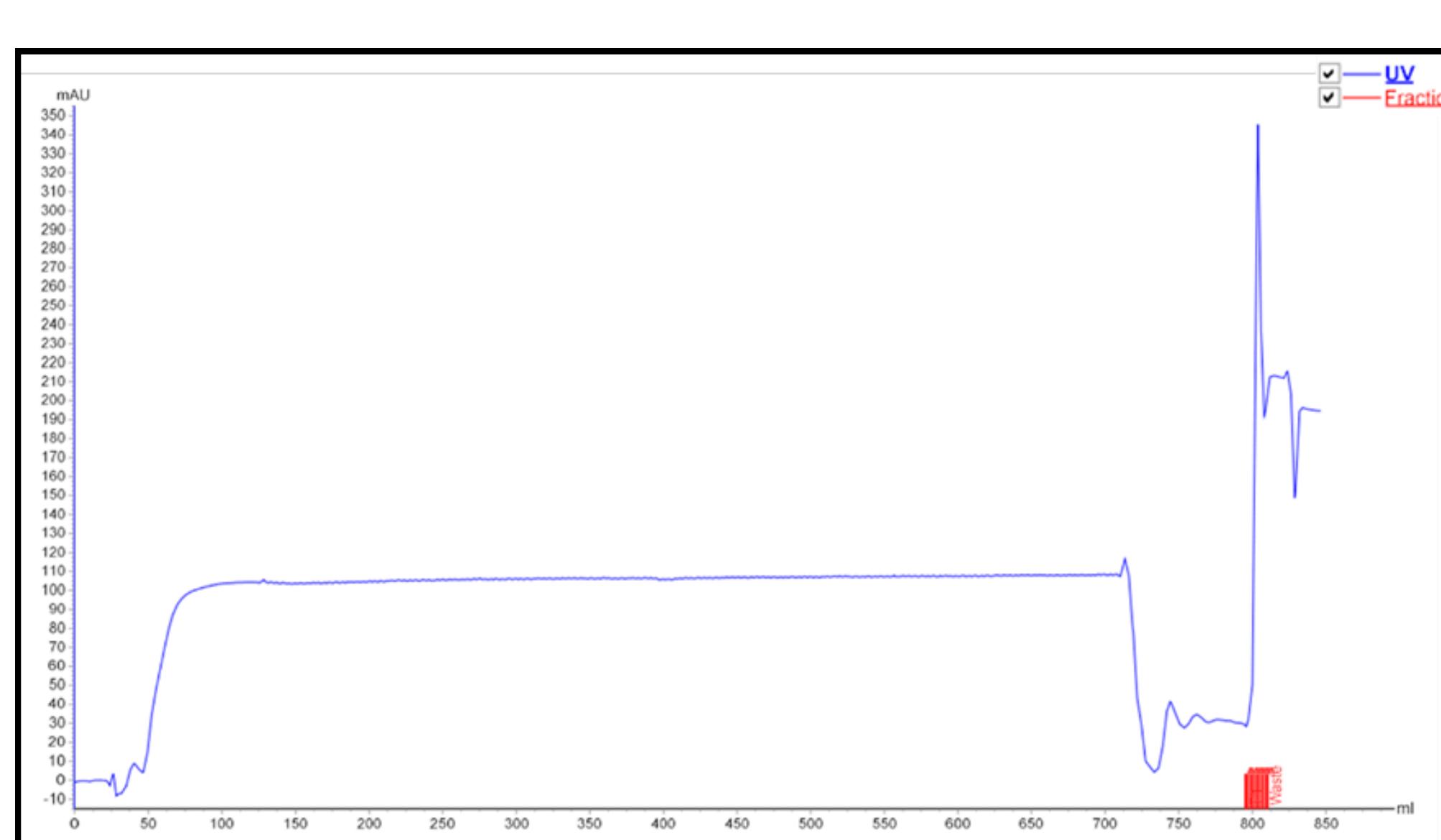


Fig.4. Purificação por cromatografia de afinidade do corpo de inclusão de BSP5, com início do pico na fração 6 e final na fração 15.

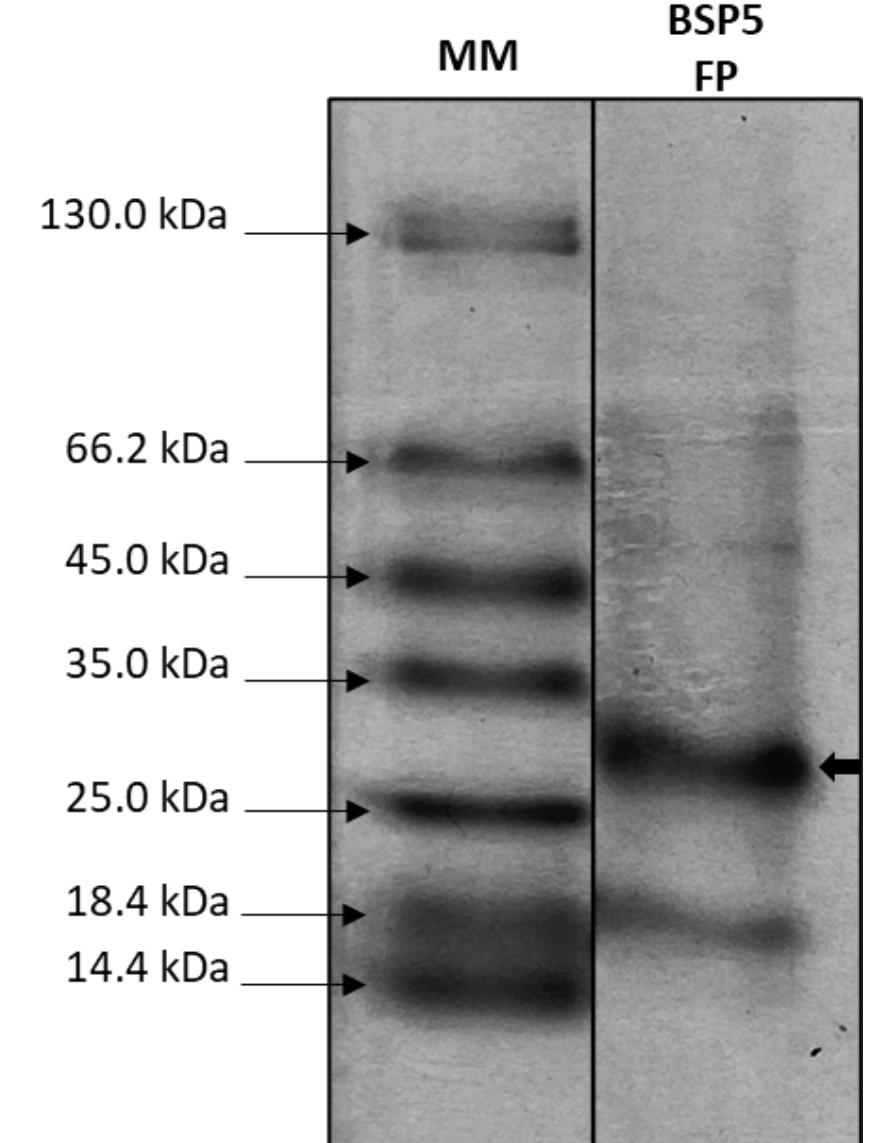


Fig.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida 14 % pós purificação do corpo de inclusão de BSP5. FP: frações de pico unidas de F7 a F15. A seta indica a banda de BSP5.

Conclusões

As estratégias de clonagem, expressão e purificação de BSP5 foram eficientes, apresentando múltiplos picos de eluição, mas mantendo boa estabilidade e pureza, reforçando a viabilidade da metodologia empregada. As concentrações finais obtidas da proteína recombinante foram satisfatórias e promissoras.

Apoio Financeiro