



Ligação da defensina recombinante de *Vigna unguiculata* L. Walp. (rVu-Def1) à proteína verde fluorescente

Yan Luiz Nunes, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho.

Peptídeos antimicrobiano (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são pequenos grupos proteicos que podem ser encontrados em todos os seres vivos participando do sistema imune inato. Por apresentarem ampla atividade antimicrobiana lhes garante um grande interesse para a área da biologia e saúde no combate a determinados patógenos. Os AMPs também fazem parte do sistema imune de plantas. De acordo com o banco de dados de AMPs de plantas, PhytAmp (<http://phytamp.pfba-lab-tun.org/>), estes podem ser caracterizados por serem ricos em glicina e cisteína, sendo que esses últimos se ligam aos pares formando pontes dissulfeto, o que garante grande estabilidade físico-química, são anfipáticos, e também apresentam carga positiva em pH neutro. Os AMPs de plantas são classificados, dependendo da sua estrutura primária, em famílias como as snakinas, ciclotídeos, proteínas de transferência de lipídeos, tioninas e defensinas. Em particular as defensinas, que são objeto de estudo desse projeto, são AMPs de aproximadamente 6 kDa, apresentam de 45 a 55 resíduos de aminoácidos, a estrutura tridimensional apresenta três fitas- β e uma α -hélice e possuem forte atividade antimicrobiana. O objetivo desta etapa do projeto foi fusionar a proteína verde fluorescente (GFP) a defensina de *Vigna unguiculata* L. Walp. (Vu-Def1), que é conhecido como feijão-de-corda. Para isso os fragmentos codificantes da Vu-Def1 e GFP foram amplificados por PCR usando iniciadores específicos (Life Technologies), sendo que em todos eles foram adicionados o sítio de restrição da enzima *Bam* HI. Os iniciadores foram desenhados para se ligar os fragmentos em duas conformações, com GFP no N-terminal e no C-terminal da Vu-Def1, respectivamente. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, sendo usados marcadores de massa molecular em pb (DNA Ladder ,Life Technologies). Os fragmentos obtidos foram tratados com a enzima de restrição *Bam* HI (NEB Technologies). Após a digestão com a *Bam* HI, estes foram purificados com kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) e então foram reunidos de acordo com cada estratégia e ligados com a enzima T4 DNA ligase (Life Technologies). Os resultados desta parte foram analisados em gel de agarose 1% e confirmou, pelo aumento na massa molecular, que a estratégia de digestão e ligação foram bem sucedida. As próximas etapas espera-se ligar os fragmentos preparados como descrito acima ao vetor de expressão para poder realizar os testes de expressão.

Palavras-chave: AMPs, Mecanismos de Ação, Biologia Molecular.

Instituição de fomento: CNPq, FAPERJ, UENF.



INSTITUTO FEDERAL
FLUMINENSE



UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro



uff
Universidade Federal Fluminense