

Clonagem do gene que codifica a enzima lipase de *Staphylococcus warneri* EX17

Victória F. Migliavacca^{1,2}, Bruna C. de Andrade^{2,3}, Matheus L. V. Ferreira^{2,4}, Gaby Renard^{2,3}, Jocelei M. Chies², Marco Antônio Z. Ayub⁵ (coorientador) e Giandra Volpato⁴ (orientadora)

¹Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

²Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda, Porto Alegre, RS

³Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

victoriafmig@hotmail.com, giandra.volpato@poa.ifrs.edu.br

A lipase é uma enzima que apresenta importantes aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, também podendo ser aplicada na obtenção de biodiesel e na indústria do papel. A obtenção da enzima recombinante possibilita a obtenção de maiores quantidades de lipase com um custo menos elevado, otimizando o processo produtivo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi clonar o gene da enzima lipase de *Staphylococcus warneri* EX17. Para realizar o crescimento da cepa de *S. warneri* EX17, foi preparado um inóculo em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (cloreto de sódio (NaCl) 10 g/L, triptona 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L), mantido sob agitação orbital de 150 rpm, 37°C, por aproximadamente 18 h. Após o crescimento obteve-se a quantidade necessária de microrganismos para realizar a extração do seu DNA genômico, utilizando o kit de extração DNeasy Blood and Tissue Kit, da QIAGEN, seguido por uma etapa de quantificação do DNA por Fluorometria. Após a extração e quantificação do DNA, realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a amplificação do gene de interesse, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos e a enzima *Pfu* DNA polimerase. Na etapa de PCR foram realizados testes utilizando diferentes temperaturas de anelamento (55 e 60°C) e diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (0%, 2,5%, 5% e 10%). O resultado da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2%. O fragmento de DNA amplificado foi ligado a um vetor de clonagem (pCR[®]-Blunt), utilizando a enzima T4 DNA ligase. Células de *Escherichia coli* (DH10B) foram transformadas por eletroporação com o DNA de interesse ligado ao vetor de clonagem. As células transformadas foram cultivadas em ágar LB, na presença do antibiótico canamicina (50 µg/mL) e as colônias obtidas foram inoculadas individualmente no meio LB líquido, também na presença de canamicina, com agitação orbital de 150 rpm, 37°C por aproximadamente 18 h. Realizou-se o processo de extração do DNA plasmidial, utilizando o kit QIAGEN- QIAprep Miniprep. O DNA obtido foi clivado com as enzimas de restrição *Nhe* e *BamHI*, retirando a sequência de interesse do vetor de clonagem. Foi possível amplificar o gene da lipase utilizando a temperatura de anelamento de 55°C e a concentração de 5% de DMSO. Com os resultados obtidos, pretende-se ligar o gene da lipase ao vetor de expressão pET 23 a (+) e realizar testes de condições de cultivo para a superexpressão da enzima lipase recombinante de *S. warneri* EX17 em diferentes cepas de *E. coli*.

Palavras-chave: Lipase, recombinante, clonagem.

Apoio Financeiro: CNPq, Fapergs