

## **Clonagem e subclonagem do gene que codifica a enzima $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces* sp.**

Matheus Loch Ferreira<sup>1</sup>, Victória Furtado Migliavacca<sup>1</sup>, Juliane Carraro Nunes<sup>1</sup>,  
Joclei Maria Chies<sup>1</sup>, Gaby Renard<sup>1</sup>, Bruna Coelho de Andrade<sup>1</sup>, Giandra Volpato<sup>1\*</sup>  
\*Orientadora

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS) -  
*Campus* Porto Alegre. Porto Alegre, RS

A  $\beta$ -galactosidase, é uma enzima responsável pela hidrólise da lactose, utilizada principalmente na obtenção de leite e derivados com baixo teor de lactose, com grande importância para a indústria farmacêutica e de alimentos. As  $\beta$ -galactosidases utilizadas na indústria são produzidas principalmente por microrganismos. Por meio da técnica do DNA recombinante, a expressão em *Escherichia coli* da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. surge como uma alternativa de otimização do processo produtivo. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi clonar o gene da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces* sp. contendo cauda de histidina em *E. coli* e subclonar o gene em vetor de expressão. Após o DNA genômico da levedura ser extraído, o gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase foi amplificado em uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para o gene da  $\beta$ -galactosidase contendo cauda de histidina na região N-Terminal. Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento na reação de amplificação do DNA (50, 55, 58 e 60 °C), onde foram utilizados 2,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e a enzima Pfu DNA polimerase. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1,2%, o DNA foi purificado a partir do gel e quantificado por fluorimetria. O fragmento de DNA purificado foi ligado no vetor de clonagem pCR®-Blunt, utilizando a enzima T4 DNA ligase, a reação foi mantida a temperatura ambiente por 16 hs. Células de *E. coli* DH10B foram transformadas por eletroporação com o vetor de clonagem, contendo o gene de interesse. As células foram cultivadas em ágar Luria Bertani (LB), contendo 50  $\mu$ g/mL do antibiótico canamicina, as placas foram mantidas em estufa por aproximadamente 18 h, a temperatura de 37 °C. Cresceram várias colônias, e destas, dez (10) foram inoculadas individualmente em 5 mL de LB líquido, também na presença de canamicina, com agitação orbital de 180 rpm, a temperatura de 37° C, por aproximadamente 18 hs. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep e quantificado. O DNA do clone que apresentou a maior concentração (51,8 ng/ $\mu$ L) foi clivado com as enzimas de restrição NdeI e XhoI, purificado a partir do gel de agarose e ligado ao vetor de expressão pET30a(+) utilizando a enzima T4 DNA ligase. Células de expressão *E. coli* BL21(DE3) serão transformadas com a construção pET30a(+): $\beta$ -galactosidase e crescidas em meio LB contendo canamicina. Como perspectivas, pretende-se realizar testes de expressão utilizando diferentes indutores (IPTG e lactose) em diferentes concentrações.

**Palavras-chave:** Cauda de Histidina. Clonagem.  $\beta$ -galactosidase.