



CLONAGEM DA PROTEÍNA TROCADOR DE SÓDIO E CÁLCIO (NCX1) DE *HOMO SAPIENS*.

Nicolas Martins Soares¹, Ivarne Luis dos Santos Tersariol², Wagner Alves de Souza Júdice³

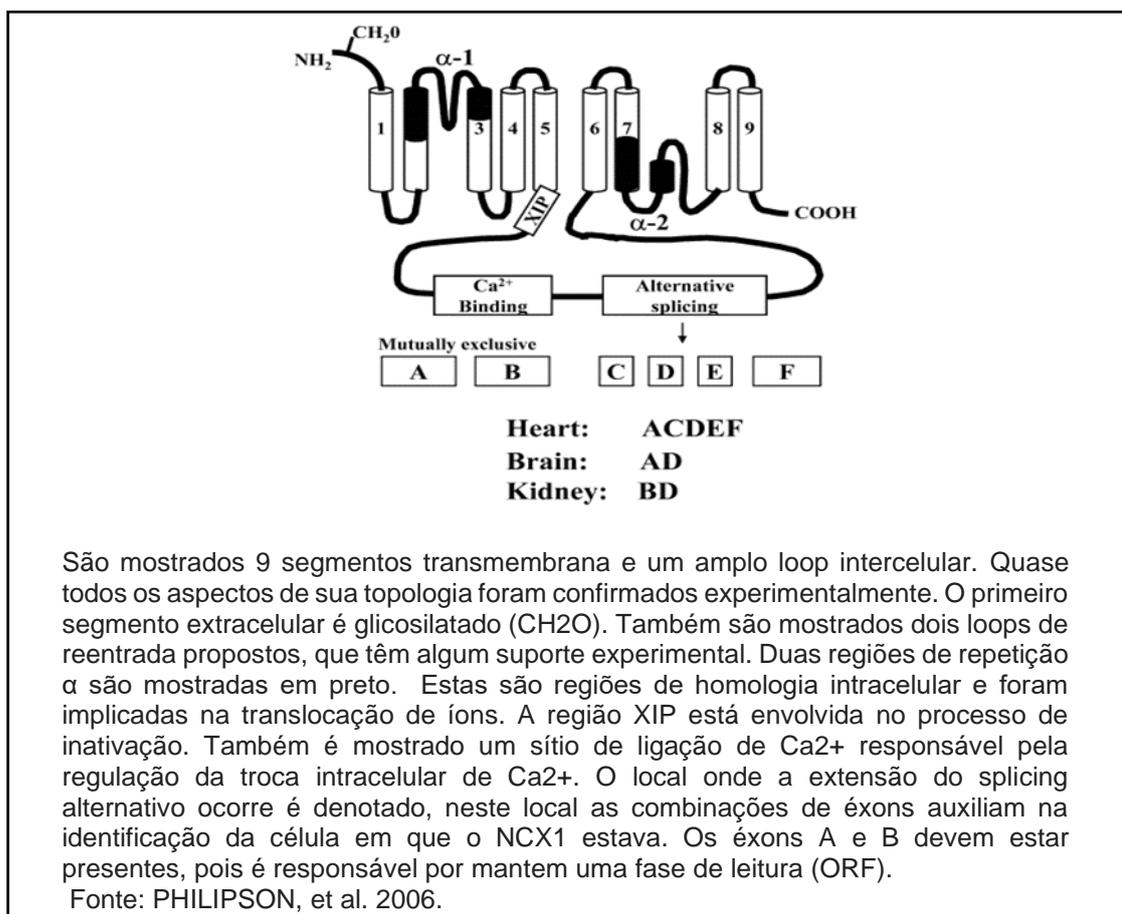
1. Estudante - curso de Biologia; e-mail: nicolasmartinssoares@hotmail.com;
2. Professor - UNIFESP; e-mail: ivarne.tersariol@gmail.com;
3. Professor - UMC; e-mail: wagneras@umc.br.

Área de conhecimento: Biologia Molecular.

Palavras-chave: Trocador Na⁺/Ca²⁺,

INTRODUÇÃO

Presente na membrana plasmática da maioria das células animais e membro da família do gene SLC8 está o trocador de Na⁺/Ca²⁺ que é um sistema de transporte de Ca²⁺, que opera em paralelo com os canais seletivos de Ca²⁺ e Bombas de Ca²⁺ acionadas por ATP. A família de proteínas trocadoras de Na⁺/Ca²⁺ (NCX) faz parte da superfamília dos trocadores de cátion/Ca²⁺. O trocador Na⁺/Ca²⁺ pode mover o Ca²⁺ para dentro ou para fora das células, dependendo da força motriz eletroquímica líquida no permutador. Esta força motriz e, portanto, o Ca²⁺ movimentado pelo trocador, que pode mudar de direção durante o ciclo de atividade de uma célula, quando o potencial de membrana varia e/ou quando a concentração de Na⁺ no citosol ou Ca²⁺ é alterada (CHAPTAL, et al, 2007). O trocador Na⁺/Ca²⁺ (FIGURA 1) é uma das proteínas baixa afinidade com Ca²⁺, mas a taxa de rotatividade é muito superior a taxa de rotatividade das outras Bombas Ca²⁺. Uma característica incomum da regulação de Ca²⁺ das células é a abundância aparente dos sistemas de transporte de membrana plasmática de Ca²⁺, já que o trocador Na⁺/Ca²⁺ opera em paralelo tanto com os canais seletivos para Ca²⁺ quanto com as bombas. No entanto, o trocador tem várias características únicas que podem ajudar a explicar a necessidade de estar em redundância, assim como a utilidade do trocador (ROBERTS, MATSUDA e BOSE, 2012).

Figura 1: Estrutura proposta do trocador de Na⁺/Ca²⁺.

No caso desta proteína é de grande relevância que sua atividade esteja em congruência com a demanda fisiológica. É descrito que algumas moléculas possuem a capacidade de modular a atividade desta proteína. Algumas formas de regulação utilizam de outras proteínas multifuncionais de detecção de Ca²⁺ para controlar a atividade, alterando e retransmitindo os sinais de Ca²⁺, e ligando-se às proteínas alvo, neste caso a NCX1 (CHOU, JU, PAN, 2015).

OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi realizar a clonagem do vetor de expressão em bactérias competentes DH5- α .

METODOLOGIAS

Realizou-se a transformação bacteriana utilizando células competentes *E. coli* DH5- α . Foi utilizado plasmídeo comercial contendo o inserto da proteína NCX1 (trocador sódio-cálcio). Para a transformação foi utilizado o método de choque térmico o que permite aumentando a permeabilidade da membrana célula e conseqüentemente a entrada do plasmídeo. Bactérias



transformadas foram plaqueadas em meio LB suplementado com ampicilina e incubadas por 18hs a 37°C. Colônias foram selecionadas da placa e submetidas a amplificação por PCR da região correspondente ao gene utilizando os primers forward 5'-CGCAGAGGTGGTGATT-3' e reverse 5'-AATGAGTTTGTCCACAGTAC-3'. Material proveniente da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose. Colônias positivas foram amplificadas em meio LB, o plasmídeo foi purificado e submetido à digestão pelas enzimas de restrição BamHI (Cellco) e XbaI (Jena Bioscience), para clivagem de sequências específicas de DNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a **FIGURA 2A**, foi possível obter colônias em meio de cultura sólido suplementado com antibiótico indicando que houve transformação bacteriana com o plasmídeo comercial contendo o gene da NCX1. A eletroforese em gel de agarose do produto da PCR em colônia (**FIGURA 2B**) utilizando primers específicos para o inserto permitiu a amplificar de segmento do inserto comprovando que as bactérias foram corretamente transformadas carregando o plasmídeo que contém o gene da NCX1.

Figura 2: Resultado da transformação bacteriana (A) e PCR de colônias (B).



A) Placa de ágar sólido suplementada com antibiótico com crescimento de colônias. B) Resolução eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Coluna 1: Marcador de Peso Molecular "High Ladder"; Coluna 2, 3, 4, 5, 6: clones contendo o inserto; Coluna 7: clone com baixa concentração do inserto.

A aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi baseada no design de primers que corresponderam exatamente a uma sequência alvo específica presente no gene da NCX1. A especificidade do primer foi modulada pelo seu comprimento e percentual das bases nitrogenadas, guanina e citosina. O comprimento do produto da PCR tem impacto na eficiência da replicação, sendo necessária modular o tamanho a ser replicado. A Reação em Cadeia da Polimerase é uma forma de amplificar uma região específica do gene alvo, sendo utilizada de forma a identificar e quantificar, embora a forma quantitativa utilize de variações desta técnica para obter o resultado preciso. A forma tradicional da PCR requer a utilização da eletroforese para que seja observado o resultado, ou seja, é necessária uma técnica complementar (HOSSAIN, 2018; SITTA, 2014).



Figura 3: Resultado da Digestão Molecular do plasmídeo comercial em gel de agarose.



Resolução eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Coluna 1: Marcador de Peso Molecular "High Ladder"; Coluna 2, 3 e 4 demonstram: A) presença do material não clivado, B) inserto separado do plasmídeo comercial, C) plasmídeo sem inserto; Coluna 5, 6 e 7: Apresentam apenas o plasmídeo completo (material não clivado).

Na **Figura 3** é possível visualizar o resultado da Digestão Molecular por enzimas de restrição. São possíveis identificar três bandas; banda a) próxima a 5.3Kpb, indica a presença do plasmídeo comercial com o gene da proteína NCX1 inteiro, ou seja, se refere ao material que não foi clivado pelas enzimas de restrição BamHI e XbaI; banda b) próxima a 3Kpb, mostra a presença do gene da proteína NCX1 separada do plasmídeo comercial, sendo este o material-alvo a ser purificado; banda c) próxima de 2,3Kpb, é o restante do plasmídeo comercial.

CONCLUSÃO

A NCX1 possui grande importância para estudos da fisiologia celular e a cada ano são publicados novos estudos explicando mais sobre suas interações. Os primers Forward e Reverse, desenhados para a identificação do gene de NCX1 por PCR foram efetivos e funcionaram de forma congruente com a aplicação de seu protocolo. As enzimas BamHI e XbaI, cortaram corretamente as regiões selecionadas para a separação do inserto do plasmídeo comercial, quando utilizadas na digestão dupla, embora o tempo de incubação tenha sido ajustado para 10 horas. Devido aos acontecimentos dos anos de 2020 e 2021, grande parte do projeto foi trabalhada de forma a apenas revisar e complementar a metodologia que seria aplicada, a perda de materiais e o período para aplicação dos experimentos impactaram diretamente nos resultados do projeto.

REFERÊNCIAS

CHAPTAL V, BESSERER GM, OTTOLIA M, NICOLL DA, CASCIO D, PHILIPSON KD, ABRAMSON J. How does regulatory Ca²⁺ regulate the Na⁺-Ca²⁺ exchanger? **Channels** (Austin). 2007; 1(3), 397–399.

CHOU AC, JU YT, PAN CY. Calmodulin Interacts with the Sodium/Calcium Exchanger NCX1 to Regulate Activity. **PLOS ONE**, 2015; 10(9), 1-19.



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

HOSSAIN ZZ et al. Quantitative Analysis of Nucleic Acid Extraction Methods for *Vibrio cholerae* Using Real-time PCR and Conventional PCR. **Mymensingh Med J.** 2018; 27(2), 327-335.

PHILIPSON KD et al. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. **Ann N Y Acad Sci.** 2006; 976, 1-10.

ROBERTS, D. E; MATSUDA, T; BOSE, R. Molecular and Functional Characterization of the Human Platelet Na⁺ /Ca²⁺ Exchangers. **Br J Pharmacol**, 2012; 165, 922-936.

SITTA RB et al. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, 2014; 141(5). 716-721.