

IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA CALCIUM/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE KINASE 2 BETA ATRAVÉS DE BIBLIOTECAS DE TOXINAS NA PLATAFORMA DE PHAGE DISPLAY

Robson Martins¹, Gustavo Felipe da Silva²

¹ Acadêmico do Curso de Agronomia - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

² Orientador, Departamento de Engenharia Florestal - CAV – gustavo.silva@udesc.br.

Palavras-chave: Rounds de seleção. Glifosato. Detecção.

O presente trabalho tem como objetivo ser útil como parte de um kit para detecção de glifosato, e também auxiliar a fiscalização em torno desse produto que é prejudicial a saúde humana. Foram realizados 3 rounds de seleção, após cada round para amplificar os fagos, o eluído foi utilizado para infectar novas bactérias, os rounds de seleção foram feitos a partir da inoculação da bactéria *E. coli* XL1 Blue em 25 ml de meio LB com tetraciclina e sua infecção com 100 µl da biblioteca (com aproximadamente 9×10^6 fagos/µl), após 1 hora foi adicionado ao meio ampicilina (100 µg/ml), após 2 horas foi adicionado 100 µl do *helper phage* e deixado por mais uma hora, e por fim foi adicionada kanamicina e o meio foi deixado em crescimento por uma noite. No dia seguinte o meio de cultura foi centrifugado a 6500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido de tubo; os fagos foram precipitados com 3% de cloreto de sódio (NaCl) e 4% de PEG, após, foi mantido a 37°C por 15 min para solubilização dos sólidos e então deixado em gelo por 1 hora. Em seguida foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, os fagos foram ressuspensos em 1 ml de PBT, foi obtido o round 1 in. Estes foram multiplicados em um novo meio de cultura; os fagos recuperados do meio de crescimento foram amplificados em poços e foi feita a lavagem para descarte de fagos não ligantes, os fagos ligantes foram eluídos, obteve-se o round 1 out, utilizou-se os mesmos procedimentos para os rounds 2 in, 2 out, 3 in e 3 out. Após cada round foram feitas diluições seriadas e plaqueadas em meio LB ágar contendo tetraciclina e ampicilina, para quantificar os fagos recuperados. Para preparação dos rounds 2 e 3 os fagos foram multiplicados em uma placa de 96 poços de afinidade de ligação média, foi ligado 0,2 µg/poço de streptavidina e deixado a 4 °C durante a noite. No dia seguinte foram feitas 3 lavagens com PBST. Cada poço foi bloqueado com 200 µl de PBS + 1% de BSA e deixado por 2 horas, após, foram feitas 5 lavagens com PBST. Para realizar a ligação da enzima alvo foi adicionado CaMKKII em PBS e deixado por 1 hora em seguida foram realizadas 5 lavagens com PBST, adicionou-se biotina em PBST por 20 minutos, foram realizadas 3 lavagens com PBST para então adicionar a biblioteca e deixar em repouso por 1 hora, após, foram realizadas 10 lavagens com PBST. Os fagos ligantes foram eluídos com 87,5 µl de HCl 100 mM por 5 minutos e a reação foi inativada com tampão Tris base de pH 11. No terceiro round foi feita uma contra seleção contra outra enzima cinase adicionando a enzima 30 minutos antes de ser adicionados na placa, foram feitas 10 lavagens com PBST, em seguida adicionado o Anti M-13 + HRP, foi

deixado por 1 hora e foram feitas 3 lavagens, foi adicionado TMB e deixado por 15 minutos para ser inativado com H_2SO_4 e foi lido a 450 nm, com o objetivo de testar a eficiência da biblioteca.