

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Produção e purificação do domínio de ligação ao receptor (RBD) wild type do SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Eleandro Fernandes Fouraux  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**ELEANDRO FERNANDES FOURAUX**

**Produção e purificação do domínio de ligação ao receptor (RBD) wild type do SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Oliveira de Paula

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Fouraux, Eleandro Fernandes, 1999-  
F773p Produção e purificação do domínio de ligação ao receptor  
2025 (RBD) wild type do SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21  
(DE3) / Eleandro Fernandes Fouraux. – Viçosa, MG, 2025.  
49 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2025.  
Referências bibliográficas: f.39-49.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.081>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. SARS-CoV-2. 2. Produção heteróloga. 3. *Escherichia coli*. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 616.91

**ELEANDRO FERNANDES FOURAUX**

**Produção e purificação do domínio de ligação ao receptor (RBD) wild type do SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2025.

Assentimento:

---

Eleandro Fernandes Fouraux  
Autor

---

Sergio Oliveira de Paula  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 16/03/2026 às 21:25:22 e pelo orientador em 17/03/2026 às 08:46:47. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **A994.OOT9.KZU7** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho à minha família, por todo apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por sempre ter me guiado e mostrado os melhores caminhos a serem seguidos.

À minha família, em especial ao meu pai, Eliseu Fouraux e à minha mãe, Andreia Fernandes Fouraux (*in memoriam*), por toda a ajuda, incentivo, carinho e por sempre torcer e vibrar comigo a cada vitória. Eu amo vocês!

À minha esposa, Andreia Dias, por toda a ajuda, companheirismo e paciência. Seu apoio foi fundamental para que esta conquista fosse alcançada.

A todos meus amigos por estarem ao meu lado quando precisei.

Ao meu orientador Dr. Sérgio Oliveira de Paula por abrir as portas do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM) e por ser sempre atencioso e disposto a ajudar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

FOURAUX, Eleandro Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2025. **Produção e purificação do domínio de ligação ao receptor (RBD) wild type do SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**. Orientador: Sergio Oliveira de Paula.

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, desencadeou uma pandemia de dimensões globais e estimulou o desenvolvimento de estudos voltados à caracterização de seus componentes estruturais, entre eles o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) da proteína Spike. O RBD desempenha papel central na interação com o receptor ACE2 e constitui um alvo prioritário em pesquisas diagnósticas, imunológicas e biotecnológicas. Nesse contexto, a produção heteróloga de proteínas em sistemas bacterianos representa uma estratégia eficiente, econômica e amplamente empregada na obtenção de antígenos virais, destacando-se a *Escherichia coli* BL21 (DE3) como um dos hospedeiros mais utilizados devido ao seu rápido crescimento, baixo custo e capacidade elevada de expressão recombinante. Este trabalho teve como objetivo produzir o RBD wild type do SARS-CoV-2 utilizando o sistema *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a, confirmando sua expressão por meio de SDS-PAGE e Western blotting. Inicialmente, a transformação da *E. coli* com o plasmídeo pET-28a contendo a sequência codificadora do RBD foi confirmada por PCR e eletroforese em gel de agarose, com amplificação específica de um fragmento de aproximadamente 300 pb e ausência de bandas no controle negativo, assegurando a integridade da construção gênica. Após a confirmação, procedeu-se à indução da expressão utilizando IPTG, seguida pelas etapas de lise celular, obtenção da fração solúvel e purificação por resina de afinidade para proteínas contendo cauda de histidina. A análise em SDS-PAGE revelou uma banda na altura de 25 kDa, compatível com o peso molecular esperado para o RBD. A identidade da proteína foi confirmada por dois ensaios de Western blotting: o primeiro utilizando anticorpo anti-His, que reconheceu especificamente a cauda de histidina adicionada ao RBD; e o segundo empregando anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, demonstrando que o RBD recombinante manteve epítomos reconhecíveis pelo sistema imune humano. Os resultados demonstram que o sistema *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a foi eficiente na produção do RBD recombinante, garantindo não apenas a expressão da proteína, mas também sua integridade estrutural mínima para reconhecimento imunológico. Dessa forma, o estudo evidencia que a plataforma utilizada é adequada para a obtenção do RBD, constituindo uma alternativa viável para estudos sorológicos, aplicações

diagnósticas e futuras investigações em biotecnologia voltadas ao entendimento e monitoramento de coronavírus.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; RBD; produção heteróloga; *Escherichia coli* BL21 (DE3).

## ABSTRACT

FOURAUX, Eleandro Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2025. **Production and purification of the wild-type receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 in *Escherichia coli* BL21 (DE3)**. Adviser: Sergio Oliveira de Paula.

SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, triggered a global pandemic and stimulated the development of studies focused on characterizing its structural components, including the Receptor-Binding Domain (RBD) of the Spike protein. The RBD plays a central role in the interaction with the ACE2 receptor and is a priority target in diagnostic, immunological, and biotechnological research. In this context, heterologous protein production in bacterial systems represents an efficient, economical, and widely used strategy for obtaining viral antigens, with *Escherichia coli* BL21 (DE3) standing out as one of the most used hosts due to its rapid growth, low cost, and high recombinant expression capacity. This work aimed to produce the wild-type RBD of SARS-CoV-2 using the *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a system, confirming its expression through SDS-PAGE and Western blotting. Initially, the transformation of *E. coli* with the pET-28a plasmid containing the RBD coding sequence was confirmed by PCR and agarose gel electrophoresis, with specific amplification of a fragment of approximately 300 bp and absence of bands in the negative control, ensuring the integrity of the gene construct. After confirmation, expression was induced using IPTG, followed by cell lysis, obtaining the soluble fraction, and purification by affinity resin for proteins containing histidine tails. SDS-PAGE analysis revealed a band at a height of 25 kDa, consistent with the expected molecular weight for the RBD. The protein's identity was confirmed by two Western blotting assays: the first using anti-His antibody, which specifically recognized the histidine tail added to the RBD; and the second employing antibodies present in the serum of patients infected with SARS-CoV-2, demonstrating that the bacterial RBD retained epitopes recognizable by the human immune system. The results demonstrate that the *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a system was efficient in producing recombinant RBD, ensuring not only protein expression but also its minimum structural integrity for immunological recognition. Thus, the study shows that the platform used is suitable for obtaining RBD constituting a viable alternative for serological studies, diagnostic applications, and future biotechnology investigations aimed at understanding and monitoring coronaviruses.

Keywords: SARS-CoV-2; RBD; heterologous production; *Escherichia coli* BL21 (DE3)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema do vírion do coronavírus SARS-CoV-2 mostrando suas proteínas estruturais e as funções desempenhadas por cada uma delas.....15
- Figura 2:** Plasmídeo pET-28a com a sequência codificadora do RBD de SARS-CoV-2..... 26
- Figura 3:** Produto da reação de PCR das bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET-28a contendo a sequência responsável pela produção do RBD do SARS-CoV-2. M: Marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder RTU (Kasvi®); A1-A5: Fragmentos de DNA das amostras de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas ; C+: Controle positivo (pET-28a com RBD) ; C-: Controle negativo (água pura estéril)..... 31
- Figura 4:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de SDS-PAGE. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG. A1: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.....32
- Figura 5:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de Western Blotting. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG, marcadas primeiramente pela adição de anticorpo primário anti cauda de histidina, e posteriormente pela adição de anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A1: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.....33
- Figura 6:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de Western Blotting. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual

Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG, marcadas primeiramente pela adição de anticorpo primário de soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2, anti RBD, e posteriormente pela adição de anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A1: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.....34

## LISTA DE SIGLAS

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro

**°C:** Graus Celsius

**%:** Porcentagem

**ACE2:** Angiotensin-Converting Enzyme 2 (Enzima conversora de angiotensina 2)

**BL21:** Linhagem bacteriana *Escherichia coli*

**BL21 (DE3):** Variante DE3 de *Escherichia coli* BL21

**BsLipA:** Lipase A de *Bacillus subtilis*

**BSA:** Bovine Serum Albumin (albumina sérica bovina)

**CTD:** Domínio C-Terminal

**COVID-19:** Coronavírus Disease 2019 (Doença do Coronavírus 2019)

**CoV: Coronavírus**

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico.

**DPP4:** Proteína dipeptidil-peptidase 4

**DAB:** 3,3'-Diaminobenzidine

**DO:** Densidade Óptica

**dNTPs:** Deoxynucleoside triphosphates (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**EUA:** Estados Unidos da América

**FP:** Peptídeo de fusão

**g/L:** Grama por litro

**His:** Histidina

**IL:** Interleucina

**IFN-γ:** Interferon gama

**IPTG:** Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside

**KanR:** Kanamycin Resistance (Gene de resistência à canamicina)

**kb:** Quilobase

**kDa:** Quilodalton

**LB:** Luria-Bertani medium

**MM:** Molar

**mM:** Milimolar

**mRNA:** RNA mensageiro

**mL:** Mililitros

**MERS-CoV:** Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

**nCoV:** Novel Coronavirus

**NaCl:** Cloreto de sódio

**Nsp:** Proteína não estrutural

**NTD:** Domínio N-Terminal

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**ORF:** Open Reading Frames (Janela aberta de leitura)

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

**PBS:** Phosphate-Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

**RBD:** Receptor binding domain (Domínio de ligação ao receptor)

**RBM:** Receptor binding motif (Motivo de ligação ao receptor)

**Rpm:** Rotação por minuto

**RNase:** Ribonuclease

**RNA:** Ácido ribonucleico

**S1:** Subunidade S1 da Proteína Spike

**S2:** subunidade S2 da Proteína Spike

**SARS-CoV:** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave)

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio

**T7:** Bacteriófago T7

**TBE:** Tampão Tris-Bórico-EDTA

**TCA:** Ácido Tricloroacético

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**TE:** Tris-EDTA

**Taq DNA polimerase:** DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

**UFV:** Universidade Federal de Viçosa

**UTR:** Untranslated Region (Região não traduzida)

## SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1) ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL E REPLICAÇÃO.....	14
1.2) PROTEÍNA SPIKE (S) E RECEPTOR BINDING DOMAIN (RBD).....	16
1.3) PANDEMIA 2019.....	18
1.4) PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS.....	20
<b>2) OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1) OBJETIVO GERAL.....	24
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3) METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
3.1) OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO.....	25
3.2) Escherichia coli BL21 (DE3).....	26
3.2.1) EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE ESCHERICHIA COLI BL21 (DE3).....	27
3.2.2) PCR.....	27
3.2.3) ELETROFORESE DE DNA.....	28
3.3) EXPRESSÃO DO RBD.....	28
3.4) OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	28
3.5) PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	29
3.6) CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	29
3.7) PRECIPITAÇÃO POR ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA).....	30
3.8) SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING.....	30
<b>4) RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5) DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6) CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7) REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1) INTRODUÇÃO

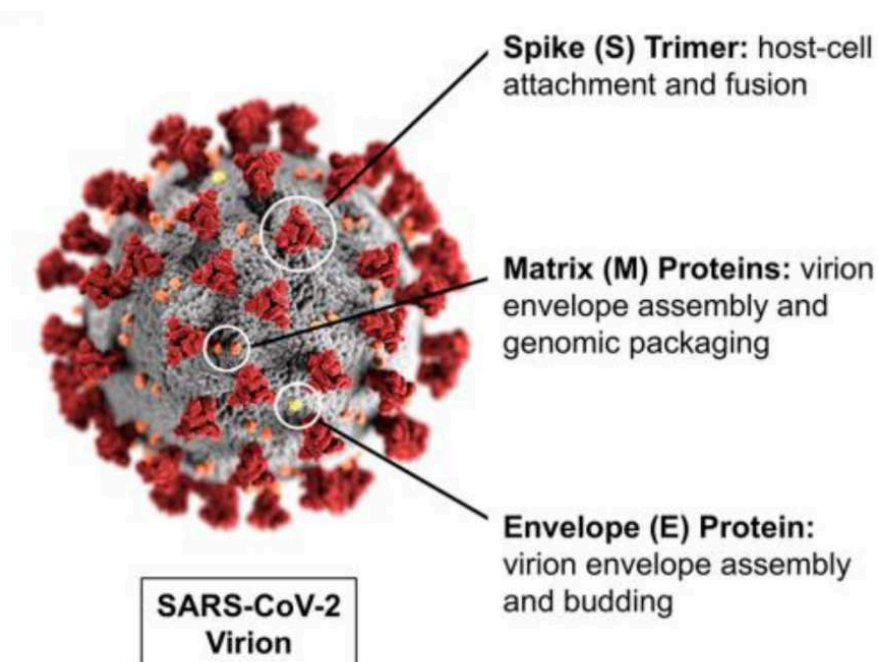
### 1.1) ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL E REPLICAÇÃO.

O coronavírus SARS-CoV-2, cujo nome foi definido em 2023 como *Betacoronavirus pandemicum*, responsável pela pandemia iniciada em 2019, pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *Betacoronavirus*, grupo que também inclui SARS-CoV e MERS-CoV. A família ainda é composta pelos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, cujos representantes têm capacidade de infectar ampla variedade de mamíferos e aves (ICTV 9th Report, 2011). Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados e apresentam um genoma de RNA fita simples, senso positivo, com aproximadamente 30 kb. A extremidade 5' desse RNA contém uma 7-metilguanossina (cap 5') e a extremidade 3' possui uma cauda poliadenilada, características que permitem ao genoma atuar diretamente como mRNA logo após a entrada do vírus na célula hospedeira. A região 5' ainda contém uma sequência líder e uma região não traduzida (UTR), importantes para a regulação dos processos de replicação e transcrição; essa UTR também está presente na extremidade 3' (Fehr and Perlman, 2015).

O genoma dos CoVs apresenta entre 6 e 10 ORFs. A primeira delas, a ORF1a/b, corresponde ao gene replicase, responsável pela codificação de 16 proteínas não estruturais e ocupando cerca de dois terços do genoma. Uma mudança de leitura de -1 entre as ORFs 1a e 1b resulta na produção das poliproteínas pp1a e pp1b. As demais ORFs, localizadas no terço final do genoma, codificam proteínas estruturais e acessórias. Essas regiões são transcritas como RNAs subgenômicos de polaridade negativa, os quais servem como molde para a formação de mRNAs subgenômicos. Além disso, apresentam sequências regulatórias de transcrição (TRRs), necessárias para a expressão desses genes (Chen; Liu; Guo, 2020).

A partícula viral possui formato esférico, com diâmetro entre 120–160 nm, e apresenta espículas distribuídas por sua superfície. No interior do envelope encontra-se o nucleocapsídeo helicoidal. As proteínas não estruturais (Nsps) compõem o complexo replicase-transcriptase e participam da regulação do ciclo viral, incluindo proteases, enzimas modificadoras de RNA, polimerase, primases e helicase; entretanto, algumas Nsps ainda não tiveram suas funções completamente esclarecidas. As quatro proteínas estruturais dos CoVs são: spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N) (Chen; Liu; Guo, 2020; Weiss; Leibowitz, 2011) (Figura 1).

Figura 1: Esquema do vírion do coronavírus SARS-CoV-2 mostrando suas proteínas estruturais e as funções desempenhadas por cada uma delas.



Fonte: Harrison, *et al.*, 2023.

A glicoproteína S, com aproximadamente 150 kDa, forma trímeros que constituem as espículas virais e é responsável pelo reconhecimento e ligação ao receptor celular. A proteína S é dividida nos domínios S1 e S2, sendo que S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) e S2 abriga o peptídeo de fusão, essencial para a entrada viral (Walls *et al.*, 2020). A proteína M (15–20 kDa) é a mais abundante no vírion, apresenta três domínios transmembrana e organiza-se em dímeros, sendo fundamental para a forma e curvatura da partícula, além de interagir com a proteína N durante a montagem viral (Fehr and Perlman, 2015).

A proteína E (8–12 kDa) também é transmembrana, participa da formação do envelope e atua na montagem e brotamento viral. Adicionalmente, funciona como canal iônico, estando relacionada à patogênese (Schoeman; Fielding, 2019). A proteína N, por sua vez, forma o nucleocapsídeo e contém três domínios (N-terminal, C-terminal e uma região espaçadora), todos com afinidade pelo RNA viral. N interage com M e com o complexo replicase-transcriptase por meio de sua ligação à nsp3, auxiliando no empacotamento do genoma. Além disso, atua como antagonista de interferon- $\beta$  e como supressora da resposta

antiviral mediada por RNA de interferência em células de mamíferos (McBride; Van Zyl; Fielding, 2014; Cui *et al.*, 2015).

O ciclo replicativo dos CoVs inicia-se com a ligação do RBD do domínio S1 ao receptor da célula hospedeira. Em humanos, foi demonstrado que SARS-CoV e SARS-CoV-2 utilizam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), uma metalopeptidase, como receptor de entrada (Walls *et al.*, 2020), enquanto o MERS-CoV utiliza a proteína dipeptidil-peptidase 4 (DPP4) (Cui *et al.*, 2019).

Após a adsorção, o vírus entra na célula via endocitose, onde as proteases endossomais expõem o peptídeo de fusão do domínio S2, processo facilitado pela acidificação endossomal. A fusão entre o envelope viral e a membrana celular libera o RNA genômico no citoplasma, que é imediatamente traduzido, originando as poliproteínas pp1a e pp1b e, posteriormente, o complexo replicase-transcriptase. O RNA genômico e os RNAs subgenômicos são sintetizados, estes últimos funcionam como mRNAs para a tradução das proteínas estruturais. As proteínas S, M e E seguem pela via secretora (retículo endoplasmático e complexo de Golgi), enquanto a proteína N se associa ao RNA genômico formando o nucleocapsídeo e interage com a proteína M na montagem dos vírions. Com a incorporação da proteína S, as novas partículas são transportadas até a superfície celular e liberadas por exocitose. A proteína S também pode migrar para a membrana da célula infectada, promovendo fusão entre células vizinhas e gerando sincícios, mecanismo que facilita a propagação viral (Ou *et al.*, 2020; Fehr and Perlman, 2015).

## **1.2) PROTEÍNA SPIKE (S) E RECEPTOR BINDING DOMAIN (RBD)**

A proteína S (Spike) constitui um dos componentes estruturais mais relevantes dos coronavírus e exerce papel central na etapa inicial do ciclo infeccioso, sendo responsável tanto pelo reconhecimento do receptor da célula hospedeira quanto pelos mecanismos subsequentes de fusão de membranas (Minigulov *et al.*, 2024). Trata-se de uma glicoproteína de superfície pertencente à classe das proteínas virais de fusão tipo I, compondo, juntamente com as proteínas E, M e N, o conjunto de proteínas estruturais que integram a partícula viral (Yu *et al.*, 2023). Localizada na superfície do vírion, a proteína S se organiza em forma de grandes projeções que conferem ao coronavírus o aspecto de coroa (Hoffmann; Kleine-Weber; Pöhlmann, 2020). Essas projeções correspondem a homotrímeros formados por três protômeros idênticos, cada um apresentando peso molecular aproximado entre 180 e

200 kDa quando totalmente glicosilado (Obeng; Fianu; Danquah, 2022) . A proteína S é uma proteína transmembrana do tipo I formada por um ectodomínio exposto, um domínio transmembrana que ancora o trímero à membrana viral e uma curta região citoplasmática (Li et al., 2022). Destaca-se por apresentar extensiva glicosilação, com múltiplos sítios de N- e O-glicosilação que atuam como um escudo contra o sistema imune do hospedeiro, contribuindo para a virulência, imunogenicidade e capacidade de evasão imunológica (Burkova; Bakhno, 2025). Além disso, a presença de sítios de S-palmitoilação, que aumentam a hidrofobicidade do complexo, é essencial para sua correta integração na membrana plasmática e para a infectividade viral (Wu *et al.*, 2021).

A proteína S é clivada em duas subunidades funcionalmente distintas, S1 e S2. A subunidade S1, localizada na região N-terminal, é responsável pelo reconhecimento do receptor celular e constitui a porção menos conservada da molécula, variando amplamente entre diferentes coronavírus (Li, *et al.*, 2022). Estruturalmente, S1 é composta por um Domínio N-Terminal (NTD) e um Domínio C-Terminal (CTD), sendo este último o local típico onde se encontra o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) (Obeng; Fianu; Danquah, 2022). O NTD pode estabelecer interações com glicanos ou ácido siálico em determinados coronavírus, enquanto a função principal de S1 é atuar como uma chaperona que mantém S2 na conformação de pré-fusão, evitando sua ativação prematura (Si *et al.*, 2024). A subunidade S2 contém o elemento estrutural essencial para a fusão de membranas: o peptídeo de fusão (FP) (Hills; Geoghegan; Bostina, 2025). A maquinaria de fusão presente em S2 funciona como um mecanismo de aproximação, que após ativação proteolítica, sofre uma extensa reconfiguração conformacional, aproximando as membranas viral e celular até que a fusão seja completada (Yu *et al.*, 2023).

O RBD, localizado dentro da subunidade S1, desempenha papel determinante na especificidade de tropismo viral (Si *et al.*, 2024). Com cerca de 200 aminoácidos e aproximadamente 25 kDa, o domínio é dividido entre um núcleo estrutural e subdomínios externos que incluem o Motivo de Ligação ao Receptor (RBM), responsável pelo contato direto com o receptor celular (Li *et al.*, 2022). Esse domínio pode alternar entre duas conformações: a forma “fechada”, na qual o RBD permanece retraído e parcialmente oculto no trímero, dificultando o reconhecimento pelo hospedeiro; e a forma “aberta”, que expõe o sítio de ligação e permite a interação direta com receptores como o ACE2 em coronavírus relacionados ao SARS (Wolf; Kwan; Kamil, 2022). Há uma grande variabilidade entre os RBDs de diferentes coronavírus, por exemplo, entre SARS-CoV e SARS-CoV-2, o que

acarreta em diferenças na afinidade e especificidade de ligação, influenciando diretamente a gama de hospedeiros e o tropismo celular (Zeng *et al.*, 2022).

O processo de adsorção e entrada do vírus na célula mediado pela proteína S envolve uma série de eventos coordenados. Primeiramente, a subunidade S1 reconhece e se liga ao receptor do hospedeiro por meio do RBD (Li *et al.*, 2023). A proteína S é inicialmente produzida como um único polipeptídeo e sofre clivagens em dois sítios distintos, S1/S2 e S2', catalisadas por proteases da célula hospedeira (Whittaker; Daniel; Millet, 2021). O sítio S1/S2 é fundamental para a pré-ativação da proteína e para a abertura do RBD (Belouzard; Chu; Whittaker, 2009). A clivagem subsequente em S2' expõe o peptídeo de fusão, que se insere na membrana da célula hospedeira. A seguir, acontece a aproximação entre a membrana viral e a celular, culminando na fusão e na liberação do genoma viral no citoplasma (Yu *et al.*, 2023).

Além de mediar a entrada, a proteína S influencia diretamente a patogênese por meio da capacidade de induzir sincícios, resultantes da fusão entre células infectadas e células vizinhas que expressam o receptor viral (Burkova; Bakhno, 2025). Esses sincícios são considerados efeitos citopáticos e contribuem para o dano tecidual, especialmente no tecido pulmonar (Rajah *et al.*, 2022). Devido ao seu papel central no processo infectivo, na especificidade de hospedeiro e na virulência, a proteína S é um dos principais alvos de estratégias terapêuticas e constitui a base molecular para o desenvolvimento de grande parte das vacinas e de agentes antivirais que visam bloquear a entrada viral (Minigulov *et al.*, 2024).

### **1.3) PANDEMIA 2019**

A pandemia do COVID-19 constituiu um marco sanitário global sem precedentes na história recente, com repercussões que ultrapassaram o campo da saúde e atingiram dimensões sociais e econômicas em escala mundial (Chen; Ding, 2023). Os primeiros casos associados à doença foram registrados em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, quando um surto de pneumonia de etiologia desconhecida chamou a atenção das autoridades de saúde (Panati *et al.*, 2022; Harrison *et al.*, 2023). Esses casos iniciais estavam relacionados ao Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan, identificado como o provável epicentro dos primeiros registros da infecção (Hoenigsperger; Sivarajan; Sparrer, 2024). A partir da coleta de fluido de lavagem broncoalveolar de um paciente de 41 anos internado em Wuhan, isolou-se um novo agente viral, inicialmente denominado *Novel Coronavirus (2019-nCoV)*, cuja origem foi posteriormente atribuída a um

coronavírus zoonótico transmitido de animais para humanos, sendo fortemente relacionados à morcegos e pangolins (Harrison *et al.*, 2023; 2023; Chen;Ding, 2023). Diante da rápida expansão dos casos e da ausência de conhecimento prévio sobre o novo patógeno, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou em 30 de janeiro de 2020 que o surto constituía uma emergência de saúde pública de interesse global (Katre *et al.*, 2022). Poucos meses depois, já em março de 2020, a doença foi oficialmente reconhecida como pandemia, em razão de sua ampla e veloz disseminação internacional (Hao-Nan *et al.*, 2020).

Ao longo de sua evolução, a COVID-19 se apresentou como uma enfermidade de curso clínico bastante variável, podendo se manifestar de forma assintomática ou progredir para quadros graves e potencialmente fatais (Bean *et al.*, 2021). O período de incubação geralmente variava entre 2 a 14 dias, sendo comuns sintomas como febre, tosse seca, cansaço e dispneia, além de dor de garganta, congestão nasal, coriza, mialgias e diarreia (Ollarves-Carrero *et al.*, 2020; Panati *et al.*, 2022). A perda de olfato e paladar também foi amplamente descrita entre os pacientes infectados (Ollarves-Carrero *et al.*, 2020). A maior parte dos indivíduos (cerca de 80%) apresenta recuperação espontânea sem necessidade de intervenções hospitalares, porém, aqueles com comprometimentos imunológicos ou comorbidades prévias demonstram maior risco de evolução para insuficiência respiratória (Huang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Em casos graves, os achados pulmonares incluem dano alveolar, formação de membranas hialinas, exsudatos celulares e edema, características semelhantes às observadas em infecções por SARS-CoV e MERS-CoV (Ozmen *et al.*, 2020). Um aspecto fisiopatológico crítico identificado em pacientes severamente afetados é a chamada tempestade de citocinas, marcada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios como IL-2, IL-6, IL-7, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , resultando em inflamação sistêmica e predispondo ao desenvolvimento de síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (Dai *et al.*, 2022). Além disso, foi constatado aumento expressivo do risco de trombose e o surgimento de manifestações neurológicas, ainda que a doença se mantenha predominantemente respiratória (Walton *et al.*, 2021).

Conforme a pandemia avançou, o SARS-CoV-2 passou por um processo acelerado de evolução genética, marcado pela ocorrência de mutações, especialmente na proteína spike. Esse fenômeno culminou no surgimento de distintas Variantes de Preocupação (VOC), como Alpha, Beta, Gamma e Delta (Mascola; Graham; Fauci, 2021). Dentre elas, a variante Delta, inicialmente identificada na Índia, destacou-se por sua maior taxa de transmissão e capacidade de escape imunológico, tornando-se dominante em diversas regiões do mundo no final de

2021 (Monajjemi; Kandemirli; Mollaamin, 2021). Em novembro de 2021 emergiu a variante Ômicron, que rapidamente substituiu Delta devido ao elevado número de mutações associadas à sua notável transmissibilidade. Suas diversas sub linhagens passaram a circular amplamente e, desde então, constituem as variantes predominantes globalmente (Kumar *et al.*, 2022).

A dimensão global da pandemia pode ser observada nos dados epidemiológicos registrados pela OMS. Em 4 de outubro de 2022, contabilizavam-se aproximadamente 620 milhões de casos confirmados e cerca de 6,5 milhões de mortes em âmbito mundial, números que, em estimativas de dezembro do mesmo ano, já ultrapassavam 652 milhões de casos e 6,6 milhões de óbitos (Harrison *et al.*, 2023). Atualmente, já são 779 milhões de casos detectados (OMS- 2026). A necessidade urgente da contenção da transmissão impulsionou a adoção de medidas rigorosas de saúde pública, incluindo quarentenas, isolamento social, suspensão de grandes eventos, rastreamento de contatos e restrições de viagem, bem como ações de segurança pública para garantir o cumprimento dessas determinações (Madonsela *et al.*, 2023). Paralelamente, a pandemia trouxe consequências econômicas significativas, repercutindo no mercado de trabalho, no comércio internacional e no setor de turismo, além de provocar impacto psicológico generalizado decorrente da incerteza, do medo e das perdas humanas acumuladas ao longo desse período (Ahmad; Chahal; Rais, 2022).

A experiência global com a COVID-19 evidenciou a vulnerabilidade das sociedades a eventos epidemiológicos emergentes e reforçou a importância de abordagens integradas entre saúde humana, saúde animal e meio ambiente (Faustino *et al.*, 2022). Esse fato demonstrou a necessidade do fortalecimento dos sistemas de vigilância, de planejamento para emergências sanitárias, de cooperação científica e institucional, para reduzir vulnerabilidades e mitigar futuras ameaças à saúde pública (Farag *et al.*, 2019).

#### **1.4) PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS**

A produção heteróloga de proteínas constitui uma das bases centrais da biotecnologia moderna e consiste na expressão de uma proteína em um organismo hospedeiro que naturalmente não a produz (Jiang *et al.*, 2024). Antes da consolidação das ferramentas de engenharia genética e da tecnologia do DNA recombinante, o estudo de proteínas era limitado pela necessidade de obtê-las a partir de fontes naturais, muitas vezes em baixíssimas concentrações, o que dificultava a purificação e restringia severamente a quantidade de material disponível para análises estruturais, funcionais ou aplicações tecnológicas

(Ferrer-Miralles; Garcia-Fruitós, 2024). O advento da clonagem molecular e da expressão recombinante permitiu superar essas limitações, possibilitando a produção controlada, eficiente e em larga escala de proteínas de interesse para pesquisa, diagnóstico, desenvolvimento farmacêutico, biossíntese de produtos naturais e aplicações industriais (Rong *et al.*, 2023).

Dentro desse contexto, a bactéria *Escherichia coli* se consolidou como a plataforma de expressão heteróloga amplamente utilizada (Cabal; Wu, 2022). Sua linhagem BL21 (DE3), derivada da cepa B834, tornou-se um dos hospedeiros mais empregados graças ao seu uso consolidado no sistema de expressão baseado no promotor T7 (Zafar *et al.*, 2024). A adoção dessa linhagem decorre de características que favorecem o acúmulo da proteína recombinante, como a ausência das proteases Lon e OmpT, responsáveis pela degradação de proteínas no citoplasma (Phillips; Vanbogelen; Neidhardt, 1984; Yaghoobizadeh *et al.*, 2023). Além disso, a *E. coli* apresenta rápido crescimento, baixo custo de cultivo, facilidade de manipulação genética e alta produtividade, características que historicamente permitiram sua aplicação desde a produção da primeira proteína recombinante funcional, a insulina humana, em 1977 (Rivera-de-torre *et al.*, 2022). Em ambientes acadêmicos e industriais, a BL21 (DE3) é frequentemente descrita como uma “fábrica celular de proteínas”, característica que justifica sua ampla adoção em pesquisas relacionadas à produção de proteínas quiméricas, enzimas industriais, anticorpos recombinantes e peptídeos bioativos (Pouresmaeil; Azizi-Dargahlou, 2023).

Estudos recentes ilustram a versatilidade dessa linhagem. Em pesquisas com proteínas multi antigênicas, a BL21 Star foi utilizada para elevar o rendimento da proteína quimérica TgAGS/BsT de *Toxoplasma gondii*, enquanto a BL21 (DE3) possibilitou a obtenção e purificação bem sucedida de anticorpos recombinantes scFv anti-RBD do SARS-CoV-2 (Matias *et al.*, 2023; Yaghoobizadeh *et al.*, 2023). No campo das enzimas de uso industrial, a BL21 (DE3) foi fundamental para a expressão heteróloga da lipase BsLipA de *Bacillus subtilis* (Jiang *et al.*, 2025). Em proteínas de difícil expressão, como o componente nitrogenase AvNifH de *Azotobacter vinelandii*, sua expressão com fatores de maturação permitiu a síntese de uma proteína plenamente ativa, contendo altos níveis de FeS (Solomon *et al.*, 2023). Além disso, a BL21 (DE3) tem sido usada na expressão solúvel de peptídeos antimicrobianos, como a defensina vegetal SmD1, demonstrando sua adaptabilidade a proteínas de naturezas diversas (Qiu; Song, 2025).

Apesar de suas vantagens, a produção heteróloga em *E. coli* enfrenta desafios intrínsecos, entre eles a formação de corpos de inclusão, resultado comum da superexpressão e da incapacidade do citoplasma de acomodar a proteína na forma solúvel (Rong *et al.*, 2023). Outro obstáculo é a formação de pontes dissulfeto, uma vez que o ambiente citoplasmático é redutor e desfavorece a estabilização dessas ligações essenciais à conformação nativa de muitas proteínas complexas (Ferrer-Miralles; Garcia-Fruitós, 2024). Estratégias desenvolvidas para superar essas limitações incluem o uso de linhagens modificadas derivadas da BL21, como Origami e SHuffle, além da aplicação do sistema CyDisCo, projetado para permitir a formação eficiente de pontes dissulfeto no citoplasma da BL21 (DE3) (Makino; Skretas; Georgiou, 2011; López-Cano *et al.*, 2022). Em casos nos quais a proteína alvo apresenta toxicidade para a célula hospedeira, o controle rigoroso da expressão se torna fundamental, sendo o sistema T7 induzível por IPTG a abordagem mais frequentemente utilizada (Jiang *et al.*, 2024).

O indutor IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) desempenha um papel central nesse sistema de expressão de proteínas, funcionando como um gatilho molecular para iniciar a expressão do gene de interesse (Karyolimos *et al.*, 2019). Como um análogo não metabolizável da alolactose, o IPTG ativa o operon *lac* e, especificamente nos sistemas baseados na polimerase T7, promove a transcrição do gene que codifica essa polimerase, regulado pelo promotor *lacUV5* presente no genoma da BL21 (DE3) (Chan *et al.*, 2011; Yaghoobzadeh *et al.*, 2023). Após sua ativação, a polimerase T7 reconhece o promotor T7 presente no plasmídeo recombinante e conduz a transcrição em alto nível do gene alvo (Greenwich; Alakavuklar; Fuqua, 2023). Embora altamente eficiente, o IPTG tem efeitos citotóxicos e sua concentração excessiva pode suprimir o crescimento celular, induzir estresse metabólico, comprometer a estabilidade do plasmídeo e aumentar a formação de corpos de inclusão, dessa forma, tanto a concentração quanto o momento de indução são fatores determinantes para o sucesso da expressão (Jiang *et al.*, 2025).

A literatura mostra que diferentes proteínas requerem concentrações específicas de IPTG para atingir um bom rendimento (Matias *et al.*, 2023). Atividades máximas foram obtidas com 0,4 mM para a lipase BsLipA, 0,6 mM para a defensina vegetal SmD1 e aproximadamente 1,0 mM em culturas expressando TgAGS/BsT (Matias *et al.*, 2023; Qiu; Song, 2025). Para a neuraminidase, a otimização apontou 1,82 mM como concentração ideal (Lipničánová *et al.*, 2022). A determinação do momento de indução também é crítica, a indução precoce pode inibir o crescimento, enquanto a indução tardia reduz o metabolismo necessário para a

expressão ocorrer de forma eficiente (Jiang *et al.*, 2025). Em alguns estudos, a indução após seis horas de cultura, ou na Densidade Óptica (DO) de 0,6 à 0,8, resultou em níveis superiores de expressão (Qiu; Song, 2025). Estratégias de alimentação contínua de IPTG (fed-batch) têm se mostrado eficazes para evitar efeitos de toxicidade associados às altas concentrações, reduzindo choques metabólicos e prolongando a fase de produção da proteína (Jiang *et al.*, 2025).

A produção heteróloga de proteínas, portanto, desempenha papel fundamental para o avanço científico, tecnológico e farmacêutico (Jiang *et al.*, 2024). O sistema permite a obtenção de quantidades elevadas e controladas de proteínas normalmente difíceis de isolar, sendo indispensável para o desenvolvimento de biofármacos, vacinas, ferramentas diagnósticas, estudos estruturais e aplicações industriais que empregam enzimas de alto valor agregado (Rong *et al.*, 2023). A capacidade de expressar proteínas complexas em hospedeiros geneticamente manipuláveis como a *E. coli* representa uma plataforma essencial para investigar mecanismos biossintéticos, elucidar funções moleculares e viabilizar processos biotecnológicos que são importantes para o desenvolvimento de pesquisas (Cabal; Wu, 2022; Pouresmaeil; Azizi-Dargahlou, 2023) .

## 2) OBJETIVOS

### 2.1) OBJETIVO GERAL

- Produzir em sistema heterólogo bacteriano, o RBD de SARS-CoV-2 em *Escherichia coli* BL21 (DE3).

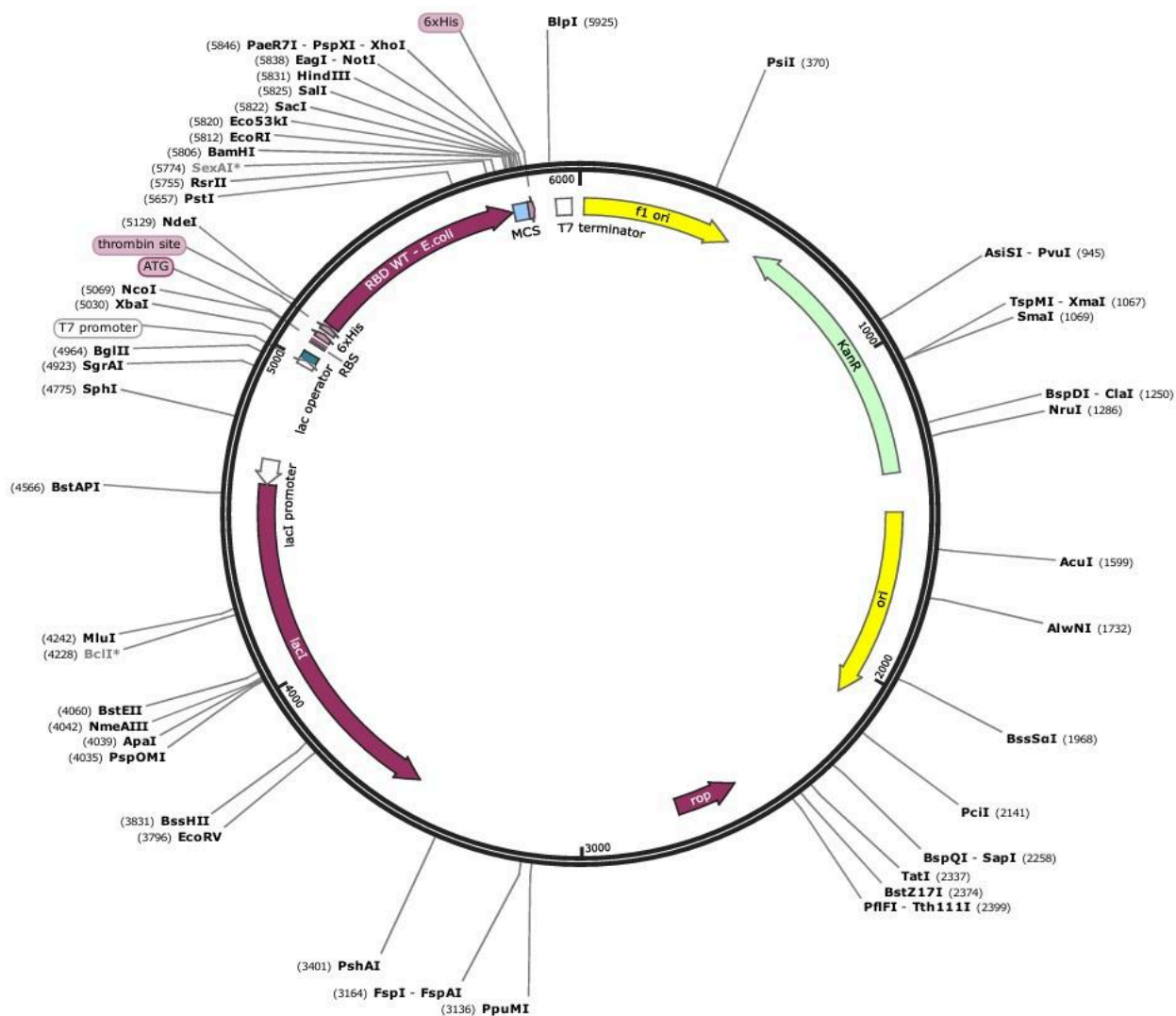
### 2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar através de PCR, a transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo pET-28a com a sequência de interesse para a produção do RBD do tipo selvagem (Wild type) de SARS-CoV-2.
- Produzir e purificar o RBD (wild type) do SARS-CoV-2.
- Confirmar por meio de SDS-PAGE e Western Blotting a produção do RBD de interesse.

### 3) METODOLOGIA

#### 3.1) OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO.

O plasmídeo pET-28a (**Figura 1**) foi geneticamente modificado através da adição da sequência codificadora do RBD (Wild type) do SARS-CoV-2, procedimento realizado pela empresa GenOne Biotechnologies (EUA). Este vetor de expressão contém o promotor T7, e como citado anteriormente, na presença de IPTG, esse promotor garante a alta expressão do gene alvo, promovendo a produção da proteína de interesse (Chan et al., 2011), assim como também o gene que confere resistência ao antibiótico Canamicina (KanR) e a sequência de nucleotídeos que garantirá que a proteína de interesse seja sintetizada com uma sequência de 6 aminoácidos histidina, o que facilitará no processo de obtenção, purificação e detecção das proteínas, dado à afinidade da sequência de histidina ao níquel presente no kit de purificação utilizado.



**Figura 2:** Plasmídeo pET-28a com a sequência codificadora do RBD (Wild type) de SARS-CoV-2.

### 3.2) *Escherichia coli* BL21 (DE3).

A bactéria utilizada no presente trabalho foi a *Escherichia coli* BL21 (DE3), e esta já se encontrava transformada com o vetor de expressão pET-28a no Laboratório de Imunovirologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para confirmar se a *Escherichia coli* realmente estava com o plasmídeo e que este continha a sequência

codificadora do RBD (Wild type) de SARS-CoV-2, precisou-se realizar um PCR cujo alvo era a sequência do RBD no plasmídeo.

### 3.2.1) EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DE *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3).

Para tal processo, as amostras da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) transformadas contendo a sequência de interesse foram cultivadas em 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g/L de peptona bacteriológica, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, pH 7) com Canamicina (100 µg/mL) à 37 °C, por 18 horas, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, foi realizado o método de lise alcalina para promover a extração do DNA plasmidial, onde primeiramente as células foram centrifugadas por 4 minutos a 10.000 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em 200 µL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), transferidas para um eppendorf mL, e foi adicionado 300 µL de solução II ( NaOH 2M, SDS 10%). A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 300 µL de solução III (Acetato de Potássio 5M, Ácido acético glacial 100%) e incubou-se no gelo por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf , onde foi adicionado 750 µL de isopropanol 100% e centrifugou-se por 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 200 µL de Tampão TE + RNase (100µg/mL), em seguida incubou-se a 37 °C por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado Acetato de Amônia 7,5 M, e posteriormente a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf e adicionou-se 750 µL de etanol 100%, centrifugou-se à 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 750 µL de etanol 70%, e após essa etapa realizou-se a centrifugação final à 10.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi seco e suspenso em água pura estéril.

### 3.2.2) PCR

Após essas etapas para a obtenção do DNA plasmidial, foi realizado o PCR, e para o PCR, utilizou-se: 2 µL do precipitado de DNA, Buffer Go Taq 1 X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de primer sense (5'-CCCGCGAAATTAATACGACT-3') e antisense

(5'-CGCAGAGTTATACAGAACGG-3'), para a região do RBD do plasmídeo pET-28a e 1,25U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Para as amplificações, realizou-se: 1 ciclo de aquecimento a 95° C por 5 minutos; 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 35 ciclos a 55 °C por 1 minuto, 35 ciclos a 72 °C por 1 minuto, 1 ciclo a 72 °C por 5 minutos. Para controle positivo foi utilizado uma alíquota do plasmídeo pET-28a com o RBD obtido da empresa, e para o negativo foi utilizado água pura estéril.

### **3.2.3) ELETROFORESE DE DNA**

Após o PCR, foi realizada uma eletroforese em um gel de agarose a fim de comprovar que realmente existia a sequência de interesse no plasmídeo, e que a bactéria realmente estava transformada. Foi utilizado um gel de agarose 1 % (0,55 g de Agarose, 55 mL de TBE 1X, 0,6 µL de Brometo de Etídio). Em seguida, correram-se as amostras sob a voltagem de 100 V por cerca de 50 minutos. Logo após, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta utilizando o Transiluminador e o programa Quantum-Capt®.

### **3.3) EXPRESSÃO DO RBD**

Para a expressão do RBD de SARS-CoV-2, primeiramente a *E. coli* BL21 (DE3) foi cultivada em 15 mL de meio LB líquido (10 g/L de peptona bacteriológica, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, pH 7) com Canamicina (100 µg/mL) à 37 °C, por 16 horas, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, foi feita uma diluição de 1:50 desse pré-inóculo em 200 mL de meio LB e deixado sob agitação de 200 rpm, 37 °C até atingir DO (densidade óptica) entre 0,4 e 0,6, no comprimento de onda de 600 nanômetros. Depois que atingiu essa DO, adicionou-se o IPTG (indutor) na concentração de 0,4 mM, sob agitação de 100 rpm, a 18 °C por 20h.

### **3.4) OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS**

Após o período de incubação com o indutor, o meio LB contendo as bactérias é coletado e centrifugado a 8000 rpm, 4 °C por 10 minutos. Terminado a centrifugação de todo o meio com as bactérias, esse meio foi descartado e o pellet de células suspenso em 20 mL de tampão A (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM de NaCl, pH 8,0). Depois de adicionado o tampão, a amostra é submetida à sonicação com a seguinte programação: 4 segundos OFF, 1 segundo ON, 30% de amplitude por 8 minutos. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação à 11000 rpm, 4 °C por 20 minutos, onde o sobrenadante é fração solúvel com as proteínas na conformação nativa.

### **3.5) PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

Para a purificação das proteínas, foi utilizado o kit “cOmplete His-Tag Purification Resin” (Roche, Basileia, Suíça). Este kit é adequado para purificar proteínas que foram produzidas contendo uma sequência de aminoácidos Histidina (His), conhecido como “cauda de histidina”, como é o caso do RBD produzido usando este sistema de expressão. Ao utilizar a coluna de Níquel presente neste kit, a cauda de histidina presente nas proteínas se liga à coluna, permitindo dessa maneira a obtenção das proteínas que contenham essa sequência de aminoácidos. Após a passagem da amostra com as proteínas, o sobrenadante é descartado e o próximo passo é a lavagem da coluna com um tampão chamado “Tampão B” (50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM de NaCl, 250 mM de imidazol, pH 8,0). O Imidazol presente neste tampão faz com as proteínas se desliguem da coluna de Níquel (processo de eluição) e dessa forma possam ser coletadas.

### **3.6) CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

Após a etapa da purificação das proteínas, o próximo passo foi a concentração dessas proteínas em um volume menor. Para isso, as proteínas foram submetidas à um processo de centrifugação à 4200 xG por 25 minutos, utilizando amicon (Ultracel-10K, Merck Millipore). Terminada a centrifugação, as proteínas foram suspensas em PBS (10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM de NaCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2) e armazenadas à -20 °C.

### **3.7) PRECIPITAÇÃO POR ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)**

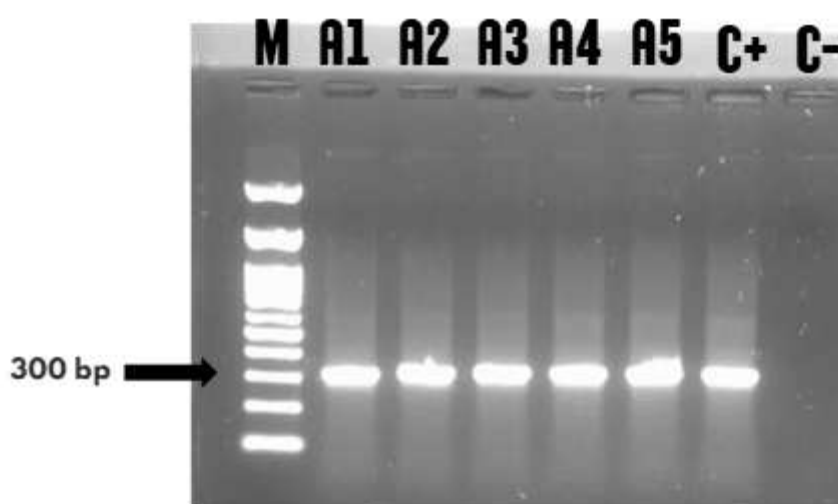
Com o objetivo de obter melhores resultados na detecção das proteínas, uma parte das amostras armazenadas à -20 °C foram submetidas à precipitação por TCA. Nesse processo, foi utilizado 125 µL de ácido tricloroacético para cada 1 mL de amostra utilizadas. Posteriormente, a amostra foi incubada no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugada à 10.000 rpm por 15 minutos à temperatura de 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em tampão 70 µL Tris-HCL (150 µM, pH 8,8).

### **3.8) SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING**

A caracterização do RBD foi conduzida empregando-se a técnica de SDS-PAGE e Western blotting , sendo realizado aqui dois Western Blotting (um deles sendo o alvo para os anticorpos a cauda de histidina e outro possíveis epítomos no RBD, utilizando para isso anticorpo primário de soro de paciente infectado com SARS-CoV-2). Dessa forma, 15 µL de amostras de RBD precipitadas e não precipitadas com TCA foram inicialmente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e corado com Azul de Comassie (SDS-PAGE). Em seguida, para a parte do Western Blotting os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose de 0,20 µm utilizando tampão Tris-Glicina pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol), mantido a 4 °C, por 2 h, sob corrente constante de 200 mA. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio composta por 4% de BSA em PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween (PBS-T), sob agitação contínua por 1 h. Posteriormente, foram lavadas em PBS-T e incubadas, de forma independente, com um anticorpo monoclonal anti-histidina (Sigma, 05-949), diluído 1:3000 em PBS-T, e com um pool de 30 amostras de soro humano de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 (FIOCRUZ, Recife-PE, Brasil), diluído 1:500 em PBS-T, permanecendo sob agitação constante por 20 horas. Na etapa subsequente, as membranas receberam anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Sigma, P 8375) por 2 h. A visualização das bandas foi realizada utilizando o 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma, D4293), e as bandas obtidas foram comparadas ao marcador molecular Precision Plus Dual Color Protein Standards (Bio-Rad).

#### 4) RESULTADOS

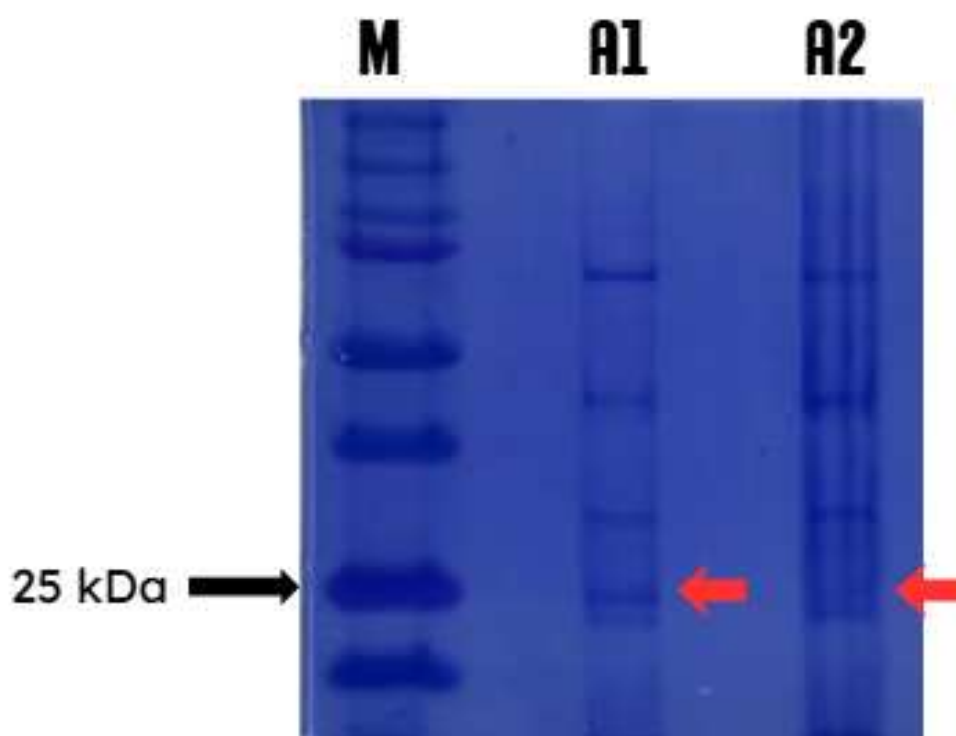
O primeiro passo, que foi crucial para o andamento deste projeto, foi a confirmação da transformação das bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo pET-28a portando a sequência responsável pela produção do RBD de SARS-CoV-2. Este foi realizado por meio de PCR das amostras das bactérias e posteriormente por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para essa amplificação, empregaram-se primers específicos da região do RBD presentes no plasmídeo pET-28a inserido nas bactérias *E.coli* BL21 (DE3). A análise do gel permitiu confirmar a transformação das bactérias, evidenciada pela visualização de bandas na altura aproximada de 300 pares de bases, correspondente ao controle positivo utilizado (pET-28a RBD) (**Figura 3**). Além do marcador de peso molecular e do controle positivo, a ausência de amplificação na amostra do controle negativo (água deionizada, autoclavada 2x) reforçou a confiabilidade dos resultados obtidos.



**Figura 3:** Produto de PCR das bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas com PET28a RBD do SARS-CoV-2. M: Marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder RTU (Kasvi®); A1-A5: Fragmentos de DNA das amostras de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas ; C+: Controle positivo (pET-28a RBD) ; C-: Controle negativo (água deionizada estéril).

Após a confirmação da transformação das bactérias com o plasmídeo de interesse, iniciou-se o processo de indução para a produção do RBD, utilizando como indutor o IPTG. Finalizado o processo de indução, seguiu-se para as etapas de obtenção, purificação e

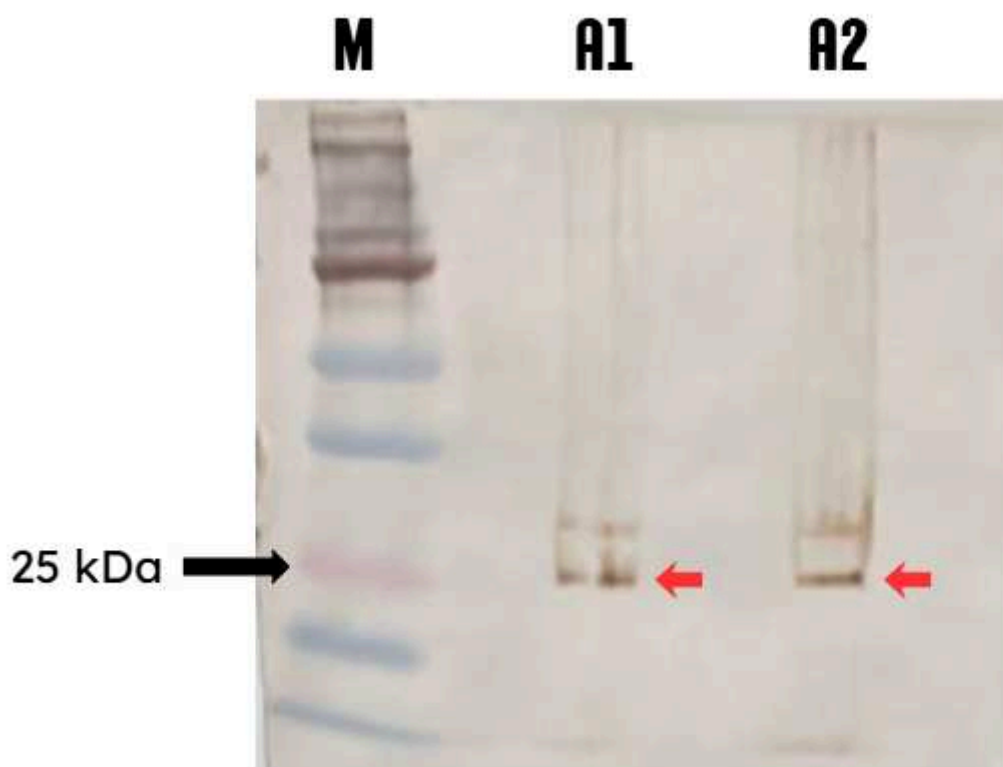
confirmação da produção do RBD. Para isso, utilizou o kit “cOmplete His-Tag Purification Resin” (Roche, Basileia, Suíça), e para a confirmação da produção o SDS-PAGE e Western Blotting. Com a realização do SDS-PAGE foi possível observar uma banda na altura de 25 kDa, compatível com o tamanho do RBD de SARS-CoV-2, como pode ser observado na **figura 4**.



**Figura 4:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de SDS-PAGE. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG. A1: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.

Para confirmar que a banda que apareceu no SDS-PAGE na altura correta do RBD realmente era o RBD almejado, realizou-se dois ensaios de Western Blotting. No primeiro

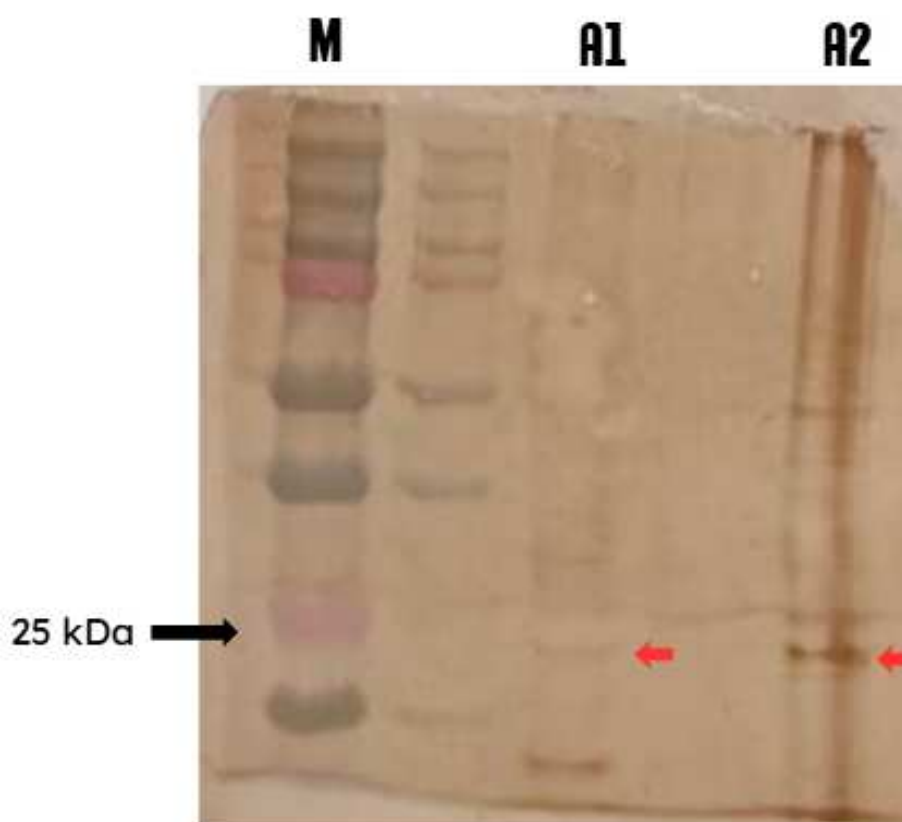
ensaio foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo anti-cauda de histidina, que marcaria a cauda de histidina sintetizada junto ao RBD. Ao analisar o resultado desse primeiro Western Blotting, foi possível observar uma banda na altura de 25 kDa (**Figura 5**), mesmo padrão observado no SDS.



**Figura 5:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de Western Blotting. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG, marcadas primeiramente pela adição de anticorpo primário anti cauda de histidina, e posteriormente pela adição de anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A1: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.

No segundo Western Blotting, no qual foi utilizado anticorpos de soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2 como anticorpo primário, também foi possível observar uma

banda na altura de 25 kDa, como pode ser observado na **Figura 6**, confirmando assim a produção do RBD.



**Figura 6:** Análise da expressão de proteínas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) por meio de Western Blotting. M: Marcador molecular (Precision Plus Protein Standards- Dual Color, BIO-RAD). A1 e A2: amostras de Domínio de ligação ao receptor (RBD) produzidas pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3), sob indução por IPTG, marcadas primeiramente pela adição de anticorpo primário de soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2, anti RBD, e posteriormente pela adição de anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A1: amostra de RBD não precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). A2: amostra de RBD precipitada por Ácido tricloroacético (TCA). Setas vermelhas indicando as bandas da amostra A1 e A2, na altura de 25kDa.

## 5) DISCUSSÃO

A confirmação bem sucedida da transformação das bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo pET-28a contendo a sequência codificante do RBD do SARS-CoV-2 constituiu uma etapa fundamental e determinante para o andamento deste trabalho, uma vez que todos os experimentos subsequentes, desde a indução até a purificação e a caracterização da proteína recombinante, depende diretamente da inserção correta e da estabilidade do plasmídeo no hospedeiro bacteriano (Zhao *et al.*, 2023). A validação desta etapa inicial não apenas assegura que o material genético de interesse está presente nas células transformadas, como também garante que estas possuem o potencial necessário para responder ao sistema de indução por IPTG baseado na polimerase T7 (Li *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a amplificação por PCR das amostras bacterianas, seguida da visualização dos produtos por eletroforese em gel de agarose a 1%, permitiu identificar um fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, correspondente à região do RBD presente no plasmídeo pET-28a, o que confirmou a transformação das bactérias (Meenakshi; Suvetha; Ramadevi, 2025). A presença da banda exclusivamente nas amostras transformadas, aliada à ausência de amplificação no controle negativo (água autoclavada), reforça a especificidade do par de primers utilizado e demonstra que não houve contaminação ou amplificação inespecífica. Do ponto de vista metodológico, esse conjunto de resultados é crucial, pois descarta falsos positivos e fornece evidências sólidas de que as amostras selecionadas eram, de fato, portadoras da construção gênica adequada para prosseguir às etapas de expressão do RBD (Wild Type).

Com essa etapa confirmatória concluída, deu-se início ao processo de indução da expressão do RBD, utilizando IPTG como indutor (Chen *et al.*, 2005; Alrseetmiwe *et al.*, 2020). A utilização desse composto é amplamente difundida em sistemas heterólogos baseados em *E. coli*, especialmente em linhagens como a BL21 (DE3), que possuem o gene da RNA polimerase T7 inserido em seu genoma, sob controle do promotor *lacUV5* (Yaghoobizadeh *et al.*, 2023; Du *et al.*, 2021). A adição do IPTG, portanto, desencadeia a expressão dessa polimerase, que por sua vez reconhece o promotor T7 presente no plasmídeo pET-28a, promovendo altos níveis de transcrição do gene de interesse (Ghaderi *et al.*, 2024; Rao, 2014; Ting; Tan; Ng, 2020). Após o período de indução, as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE, técnica que permite a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular,

possibilitando uma primeira análise da expressão proteica (Rahbar *et al.*, 2022). A detecção de uma banda na altura de aproximadamente 25 kDa (compatível com o tamanho estimado para o RBD do SARS-CoV-2) constitui um indicativo inicial de que a proteína recombinante foi sintetizada pelas bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas (Tobón *et al.*, 2025). A observação dessa banda tanto na amostra precipitada por TCA quanto na amostra não precipitada sugere que o RBD foi produzido de maneira consistente e em quantidade suficiente para ser visualizado (Tan *et al.*, 2021; Gromova *et al.*, 2023).

A observação de uma banda no SDS-PAGE, no entanto, não fornece garantia absoluta quanto à identidade da proteína expressa, visto que proteínas bacterianas endógenas podem apresentar pesos moleculares semelhantes à nossa proteína de interesse. Por esse motivo, a realização dos ensaios de Western blotting foi essencial para a confirmação definitiva que a proteína expressa era realmente a proteína de interesse (Meenakshi; Suvetha; Ramadevi, 2025). No primeiro ensaio, foi utilizado um anticorpo anti-cauda de histidina, que reconhece especificamente a cauda His adicionada ao RBD na construção plasmidial, assim como mostra o trabalho de Jadidi *et al.*, 2025 e Schmitt; Hess; Stunnenberg, 1993. A detecção de uma banda na mesma altura observada no SDS-PAGE confirma que a proteína visualizada possuía a cauda de histidina, característica indispensável para sua purificação utilizando a metodologia aplicada (Coluna de Níquel) (Vijayrajratnam *et al.*, 2025). Esse achado é particularmente relevante, pois indica que a proteína recombinante não apenas foi expressa, como também manteve a integridade estrutural da região necessária para a etapa subsequente de purificação por resina de níquel (Adomako *et al.*, 2025).

No segundo Western blotting, ao invés de anticorpos primários anti cauda de histidina, foram utilizados anticorpos presentes em amostras de soro de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, assim como no trabalho de Hsiao *et al.*, 2022, onde foi utilizado a mesma estratégia de detecção, com esses anticorpos de soro de pacientes, e também conseguiram detectar antígenos do SARS-CoV-2. A detecção de bandas nas amostras testadas demonstra que a proteína produzida foi reconhecida pelos anticorpos anti-RBD, indicando que os epítomos relevantes do domínio foram preservados (Garcia-Cordero *et al.*, 2021). Esse resultado possui importância significativa, pois sugere que mesmo sendo expressa em um sistema bacteriano que não realiza modificações pós-traducionais da mesma forma que eucariotos, a proteína manteve ao menos parte de sua conformação, o que foi suficiente para apresentar antigenicidade detectável (Yaghoobizadeh *et al.*, 2023). A preservação desses epítomos é imprescindível para aplicações de interesse biotecnológico, como estudos

sorológicos, desenvolvimento de kits diagnósticos ou avaliações da resposta imune humoral (Tantiwivat *et al.*, 2023).

De maneira geral, o conjunto de resultados obtidos nesta etapa (a confirmação da transformação, a identificação da banda correspondente ao RBD no SDS-PAGE e o reconhecimento específico da proteína pelos dois tipos de anticorpos utilizados nos Western blotting) demonstram de forma clara e consistente que o sistema *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a foi eficiente para a expressão do RBD, resultados condizentes com Ghaderi *et al.*, 2024; Tobón *et al.*, 2025 e Biswas *et al.*, 2025. A concordância dos dados obtidos por técnicas distintas reforça a veracidade das evidências e demonstra que a metodologia utilizada foi adequada para atingir os objetivos propostos, como foi observado também em Gonçalves *et al.*, 2024. Além disso, o sucesso na expressão do RBD em *E. coli* destaca as vantagens inerentes a esse sistema, como rapidez, baixo custo operacional e facilidade de cultivo, características que tornam esse modelo particularmente útil em contextos de pesquisa que não exigem glicosilação igual à de células eucariotas ou estruturas altamente complexas (Bellone *et al.*, 2021; Maltoni *et al.*, 2022; Rivera-De-Torre *et al.*, 2022; Yaghoobizadeh *et al.*, 2023).

Assim, pode-se afirmar que esta etapa constituiu um marco essencial dentro do desenvolvimento do projeto, estabelecendo as bases para os procedimentos posteriores de caracterização e aplicação da proteína recombinante tanto em testes diagnósticos, assim como também em vacinas (Biswas *et al.*, 2025; Tungekar; Recacha; Ruddock, 2023).

## 6) CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram de forma clara que o sistema de expressão heteróloga baseado na linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3), associado ao vetor pET-28a, mostrou-se eficiente para a produção do RBD (wild type) de SARS-CoV-2. A confirmação da transformação bacteriana, a indução bem sucedida da expressão e a visualização de uma banda compatível com aproximadamente 25 kDa no SDS-PAGE constituíram evidências iniciais da síntese da proteína recombinante. A especificidade desses achados foi posteriormente reforçada pelos ensaios de Western blotting, nos quais o RBD foi reconhecido tanto pelo anticorpo anti-cauda de histidina quanto pelos anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, indicando preservação de epítomos relevantes. Dessa forma, o presente estudo comprova que a plataforma utilizada é adequada para a obtenção do RBD, oferecendo uma alternativa viável, econômica e escalonável para aplicações em estudos sorológicos, desenvolvimento de testes diagnósticos e futuras investigações biotecnológicas envolvendo antígenos derivados de Coronavírus.

## 7) REFERÊNCIAS

ADOMAKO, Richmond A. et al. Alternative zinc binding peptides as potential tags for recombinant protein purification. *Journal of Inorganic Biochemistry*, p. 112981, 2025.

AHMAD, Wasim; CHAHAL, Rishman Jot Kaur; RAIS, Shirin. Understanding the impact of the coronavirus outbreak on the economic integration of ASEAN countries. *Asia and the Global Economy*, v. 2, n. 2, p. 100040, 2022.

ALRSEETMIWE, D. S. et al. Escherichia coli strain bl21: cloning and expression of an optimized interferon alpha 2b (DE3). *Journal of Life Science and Applied Research*, v. 1, n. 2, p. 42–48, 2020.

BEAN, David J. et al. Family matters for coronavirus disease and vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 131, n. 24, 2021.

BELLONE, Maria Laura et al. Production in Escherichia coli of recombinant COVID-19 spike protein fragments fused to CRM197. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 558, p. 79-85, 2021.

BELOUZARD, Sandrine; CHU, Victor C.; WHITTAKER, Gary R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 14, p. 5871-5876, 2009.

BISWAS, Anamika et al. Expression, purification, and refolding of an optimized SARS-CoV-2 receptor binding domain in E. coli. *Plasmid*, v. 134, p. 102760, 2025.

BURKOVA, Evgeniya E.; BAKHNO, Irina A. Sequences in the Cytoplasmic Tail Contribute to the Intracellular Trafficking and the Cell Surface Localization of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Biomolecules*, v. 15, n. 2, p. 280, 2025.

CABAL, Ace Bryan Sotelo; WU, Tzong-Yuan. Recombinant protein technology in the challenging era of coronaviruses. *Processes*, v. 10, n. 5, p. 946, 2022.

CHAN, Conrad EZ et al. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *Journal of immunological methods*, v. 373, n. 1-2, p. 79-88, 2011.

CHEN, Jiaxin; DING, Zuoqi. Advances in natural product anti-coronavirus research (2002-2022). *Chinese Medicine*, v. 18, n. 1, p. 13, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13020-023-00715-x>

CHEN, Jing et al. Receptor-binding domain of SARS-Cov spike protein: soluble expression in *E. coli*, purification and functional characterization. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 11, n. 39, p. 6159, 2005.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, v. 92, n. 4, p. 418-423, 2020.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews microbiology*, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

CUI, Lei et al. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *Journal of virology*, v. 89, n. 17, p. 9029-9043, 2015.

DAI, Jun et al. Coronavirus infection and cholesterol metabolism. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 791267, 2022.

DU, Fei et al. Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial cell factories*, v. 20, n. 1, p. 189, 2021.

FARAG, Elmoubasher Abu Baker et al. Survey on implementation of one health approach for MERS-CoV preparedness and control in Gulf Cooperation Council and Middle East Countries. *Emerging infectious diseases*, v. 25, n. 3, p. e171702, 2019.

FAUSTINO, Ricardo et al. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of coronavirus: One health approach for a global strategy. *One Health*, v. 14, p. 100383, 2022.

FEHR, Anthony R.; PERLMAN, Stanley. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses: methods and protocols*, p. 1-23, 2015.

FERRER-MIRALLES, Neus; GARCIA-FRUITÓS, Elena. Heterologous expression of difficult to produce proteins in bacterial systems. *International journal of molecular sciences*, v. 25, n. 2, p. 822, 2024.

GARCIA-CORDERO, Julio et al. Recombinant protein expression and purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from mammalian cells and their potential applications. *Diagnostics*, v. 11, n. 10, p. 1808, 2021.

GHADERI, Hajarossadat et al. Expression and purification of SARS-CoV-2 receptor binding domain in *Escherichia coli* for diagnostic and therapeutic purposes. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 19, n. 5, p. 500-508, 2024.

GONÇALVES, Ana Alice Maia et al. Recombinant multiepitope proteins expressed in *Escherichia coli* cells and their potential for immunodiagnosis. *Microbial Cell Factories*, v. 23, n. 1, p. 145, 2024.

GREENWICH, Jennifer L.; ALAKAVUKLAR, Melene A.; FUQUA, Clay. An Inducible T7 Polymerase System for High-Level Protein Expression in Diverse Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Resource Announcements*, v. 12, n. 2, p. e01119-22, 2023.

GROMOVA, M. S. et al. Recombinant RBD of the SARS-CoV-2 spike protein: production in *Escherichia coli* cells, binding to antibodies, and antiviral activity. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, v. 38, n. 2, p. 86-94, 2023.

HAO-NAN, W. A. N. G. et al. Isochlorogenic acid (ICGA): natural medicine with potentials in pharmaceutical developments. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 18, n. 11, p. 860-871, 2020.

HARRISON, Cameron M. et al. Evaluating the virology and evolution of seasonal human coronaviruses associated with the common cold in the COVID-19 era. *Microorganisms*, v. 11, n. 2, p. 445, 2023.

HILLS, Francesca R.; GEOGHEGAN, Jemma L.; BOSTINA, Mihnea. Architects of infection: A structural overview of SARS-related coronavirus spike glycoproteins. *Virology*, p. 110383, 2025.

HOENIGSPERGER, Helene; SIVARAJAN, Rinu; SPARRER, Konstantin MJ. Differences and similarities between innate immune evasion strategies of human coronaviruses. *Current Opinion in Microbiology*, v. 79, p. 102466, 2024.

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; PÖHLMANN, Stefan. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular cell*, v. 78, n. 4, p. 779-784. e5, 2020.

HSIAO, Chia-Chun et al. Simultaneous detection of antibody responses to multiple SARS-CoV-2 antigens by a Western blot serological assay. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106, n. 24, p. 8183-8194, 2022.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUSSEIN, Nahla A. et al. Assessment of specific human antibodies against SARS-CoV-2 receptor binding domain by rapid in-house ELISA. *Human Antibodies*, v. 30, n. 2, p. 105-115, 2022.

ICTV – **International Committee on Taxonomy of Viruses**. *ICTV 9th Report*. 2011. Disponível em: [https://ictv.global/report\\_9th](https://ictv.global/report_9th). Acesso em: 09 dez. 2025.)

JADIDI, Mohammad Javad et al. Development of an enzymatic aptasensor for monitoring recombinant His-tagged proteins in microbial biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 185, p. 110603, 2025.

JIANG, Ruizhao et al. Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, v. 75, p. 108417, 2024.

JIANG, Lun et al. IPTG feeding induction strategy enhances the expression of lipase A in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, p. 1-16, 2025.

KARYOLAIMOS, Alexandros et al. Enhancing recombinant protein yields in the *E. coli* periplasm by combining signal peptide and production rate screening. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 1511, 2019.

KATRE, Soumya Gulab et al. Review on development of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (MPro). *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 36, 2022.

KUMAR, Naveen et al. Bayesian molecular dating analyses combined with mutational profiling suggest an independent origin and evolution of SARS-CoV-2 Omicron BA. 1 and BA. 2 Sub-Lineages. *Viruses*, v. 14, n. 12, p. 2764, 2022.

LI, Shuzhen et al. Efficient heterologous expression of cellobiose 2-epimerase gene in *Escherichia coli* under the control of T7 lac promoter without addition of IPTG and lactose. *Protein Expression and Purification*, v. 223, p. 106558, 2024.

LI, Yajuan et al. Structural requirements and plasticity of receptor-binding domain in human coronavirus spike. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 930931, 2022.

LI, Xinyu et al. Spike protein mediated membrane fusion during SARS-CoV-2 infection. *Journal of medical virology*, v. 95, n. 1, p. e28212, 2023.

LIPNIČANOVÁ, Sabina et al. Optimization of an inclusion body-based production of the influenza virus neuraminidase in *Escherichia coli*. *Biomolecules*, v. 12, n. 2, p. 331, 2022.

LÓPEZ-CANO, Adrià et al. Exploring the impact of the recombinant *Escherichia coli* strain on defensins antimicrobial activity: BL21 versus Origami strain. *Microbial cell factories*, v. 21, n. 1, p. 77, 2022.

MASCOLA, John R.; GRAHAM, Barney S.; FAUCI, Anthony S. SARS-CoV-2 viral variants—tackling a moving target. *Jama*, v. 325, n. 13, p. 1261-1262, 2021.

MADONSELA, Nontobeko et al. Radiography students' lived experiences during the coronavirus pandemic: A letter to our peers. *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences*, v. 54, n. 2, p. S3-S5, 2023.

MALTONI, Giulia et al. High-yield production in *Escherichia coli* and convenient purification of a candidate vaccine against SARS-CoV-2. *Biotechnology Letters*, v. 44, n. 11, p. 1313-1322, 2022.

MCBRIDE, Ruth; VAN ZYL, Marjorie; FIELDING, Burtram C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, v. 6, n. 8, p. 2991-3018, 2014.

MAKINO, Tomohiro; SKRETAS, Georgios; GEORGIU, George. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial cell factories*, v. 10, n. 1, p. 32, 2011.

MATIAS, Stephanie Caroline Bivar et al. Enhancing the expression of multi-antigen chimeric TGAGS/BST protein from *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli* BL 21 Star during batch cultivation. *Protein Expression and Purification*, v. 201, p. 106173, 2023.

MEENAKSHI, Shanmugaraja; SUVETHA, R.; RAMADEVI, S. *Escherichia coli* Nissle 1917 efficiently expresses the RBD domain of SARS-CoV-2 spike protein without codon optimization. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 15670, 2025.

MINIGULOV, Nail et al. Structural proteins of human coronaviruses: what makes them different?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, p. 1458383, 2024.

MONAJJEMI, Majid; KANDEMIRLI, Fatma; MOLLAAMIN, Fatemeh. Delta variant of covid-19 study, and why it is a concern: An overview. *Delta*, v. 614, n. Q677H, p. F888L, 2021.

SCHMITT, Jacky; HESS, Heike; STUNNENBERG, Hendrik G. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular biology reports*, v. 18, n. 3, p. 223-230, 1993.

SI, Fusheng et al. Towards a safer future: enhancing vaccine development to combat animal coronaviruses. *Vaccines*, v. 12, n. 3, p. 330, 2024.

SOLOMON, Joseph B. et al. Heterologous expression of a fully active *Azotobacter vinelandii* nitrogenase Fe protein in *Escherichia coli*. *Mbio*, v. 14, n. 6, p. e02572-23, 2023.

OBENG, Eugene M.; FIANU, Isaac; DANQUAH, Michael K. Multivalent ACE2 engineering—A promising pathway for advanced coronavirus nanomedicine development. *Nano today*, v. 46, p. 101580, 2022.

OLLARVES-CARRERO, Maria Fernanda et al. Anosmia in a healthcare worker with COVID-19 in Madrid, Spain. *Travel medicine and infectious disease*, v. 35, p. 101666, 2020.

World Health Organization WHO Covid-19 Data Dashboard.

OU, Xiuyuan et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, v. 11, n. 1, p. 1620, 2020.

OZMEN, Sevilay Akalp et al. The review of histopathological pulmonary findings of COVID-19: what we learned from postmortem biopsy and autopsies; Beyond the horizon. *The Eurasian Journal of Medicine*, v. 52, n. 3, p. 307, 2020.

PANATI, Kalpana et al. Virology and Molecular Pathogenesis of Coronavirus Disease 2019: An Update. *The Eurasian Journal of Medicine*, v. 54, n. 3, p. 299, 2022.

PHILLIPS, T. A.; VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of bacteriology*, v. 159, n. 1, p. 283-287, 1984.

POURESMAEIL, Mahin; AZIZI-DARGAHLU, Shahnám. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Archives of microbiology*, v. 205, n. 5, p. 212, 2023.

QIU, Yiyi; SONG, Qiaozhi. Heterologous expression of the *Stellaria media* plant defensin SmD1 in *Escherichia coli*. *PeerJ*, v. 13, p. e19526, 2025.

RAHBAR, Zahra et al. Recombinant expression of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) in *Escherichia coli* and its immunogenicity in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 25, n. 9, p. 1110, 2022.

RAJAH, Maaran Michael et al. The mechanism and consequences of SARS-CoV-2 spike-mediated fusion and syncytia formation. *Journal of molecular biology*, v. 434, n. 6, p. 167280, 2022.

RAO, K. Raja Surya Sambasiva. Molecular Cloning, High Level Expression and Activity Analysis of Constructed Human Interleukin-25 Using Industrially Important IPTG Inducible *Escherichia coli* BL21 (DE3). *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, v. 6, n. 3, p. 19-30, 2014.

RIVERA-DE-TORRE, Esperanza et al. Strategies for heterologous expression, synthesis, and purification of animal venom toxins. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 9, p. 811905, 2022.

RONG, Yixin et al. Folding of heterologous proteins in bacterial cell factories: Cellular mechanisms and engineering strategies. *Biotechnology Advances*, v. 63, p. 108079, 2023.

SCHOEMAN, Dewald; FIELDING, Burtram C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, v. 16, n. 1, p. 69, 2019.

TAN, Wei Miao et al. Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation Method to Optimize Canine Synovial Fluid for One and Two-Dimensional Gel Electrophoresis Studies. *Sains Malaysiana*, v. 50, n. 11, p. 3297-3302, 2021.

TANTIWIWAT, Termsak et al. Utilization of receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein expressed in *Escherichia coli* for the development of neutralizing antibody assay. *Molecular Biotechnology*, v. 65, n. 4, p. 598-611, 2023.

TING, Wan-Wen; TAN, Shih-I.; NG, I.-Son. Development of chromosome-based T7 RNA polymerase and orthogonal T7 promoter circuit in *Escherichia coli* W3110 as a cell factory. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 7, n. 1, p. 54, 2020.

TOBÓN, Ezequiel et al. Functional expression of five refolded recombinant variants of RBD from SARS-CoV-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, p. 106781, 2025.

TUNGEKAR, Aatir A.; RECACHA, Rosario; RUDDOCK, Lloyd W. Production of neutralizing antibody fragment variants in the cytoplasm of *E. coli* for rapid screening: SARS-CoV-2 a case study. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 4408, 2023.

VIJAYRAJRATNAM, Sukhithasri et al. Optimized *Legionella* expression strain for affinity purification of His-tagged membrane proteins eliminates major multimeric contaminant. *Microbiology Spectrum*, p. e03222-24, 2025.

WALTON, Dean WA et al. Encephalitis in a Pandemic. *Frontiers in Neurology*, v. 12, p. 637586, 2021.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WANG, Dawei et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WEISS, Susan R.; LEIBOWITZ, Julian L. Coronavirus pathogenesis. *Advances in virus research*, v. 81, p. 85, 2011.

WHITTAKER, Gary R.; DANIEL, Susan; MILLET, Jean K. Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2. *Current opinion in virology*, v. 47, p. 113-120, 2021.

WOLF, Kyle A.; KWAN, Jason C.; KAMIL, Jeremy P. Structural dynamics and molecular evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. *Mbio*, v. 13, n. 2, p. e02030-21, 2022.

WU, Zhuanchang et al. Palmitoylation of SARS-CoV-2 S protein is essential for viral infectivity. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 6, n. 1, p. 231, 2021.

YAGHOOBIZADEH, Fatemeh et al. Expression, purification, and study on the efficiency of a new potent recombinant scFv antibody against the SARS-CoV-2 spike RBD in *E. coli* BL21. *Protein Expression and Purification*, v. 203, p. 106210, 2023.

YU, Shi et al. SARS-CoV-2 spike-mediated entry and its regulation by host innate immunity. *Viruses*, v. 15, n. 3, p. 639, 2023.

ZAFAR, Asma et al. Heterologous expression and characterization of a novel thermostable and alkali stable recombinant lipase enzyme from *Bacillus thuringensis*

into *E. coli* BL21 (DE3) for detergent formulation. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 27, n. 3, p. 367-382, 2024.

ZENG, Sen et al. The advances of broad-spectrum and hot anti-coronavirus drugs. *Microorganisms*, v. 10, n. 7, p. 1294, 2022.

ZHAO, Qiong et al. Evolution of carbapenem resistance in *klebsiella pneumoniae* and *escherichia coli* carrying bla NDM-1 gene: imipenem exposure results in sustained resistance memory of strains in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 22, n. 1, p. 46, 2023.