

Área: Ciências biológicas

Título: Emprego da técnica *Yeast*-ELISA para a detecção do domínio de ligação do receptor (RBD) de SARS-CoV-2

Autores: Enzo Corvello¹, Sandro Roberto Valentini¹, Cleslei Fernando Zanelli¹, Tatiana Maria de Souza Moreira¹

Filiação: ¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP

Introdução: Ainda são procurados anticorpos que possam ser utilizados na neutralização ou em testes de diagnóstico da COVID-19, tendo em vista a frequente aparição de novas cepas contendo mutações que podem diminuir a precisão de métodos estabelecidos. Com base na literatura, o anticorpo CC12.1 apresentou elevada afinidade e especificidade ao domínio de ligação ao receptor (RBD) do SARS-CoV-2, sendo um candidato para aplicação em teste de diagnóstico viral. Ainda nesse contexto, a implementação de tecnologias de produção de reagentes que agilizem a capacidade de diagnóstico e proporcionem uma autonomia nacional também são fatores importantes no combate a futuras pandemias.

Objetivos: Foi avaliada a empregabilidade do fragmento variável de cadeia única do anticorpo (scFv) CC12.1 ancorado na superfície de *Saccharomyces cerevisiae* como um método de detecção de SARS-CoV-2 por uma técnica chamada *yeast*-ELISA.

Metodologia: Foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* EBY100 transformada com o plasmídeo pYD4, expressando a sequência do scFv fusionada à proteína Aga2 sob controle do promotor de galactose. As células foram cultivadas em meio sintético com dextrose e casaminoácidos (SD-CAA) e a indução ocorreu em meio com rafinose e galactose 2% (SG/RCAA). A técnica de *Yeast*-ELISA foi desenvolvida sendo adicionadas 1×10^7 células por poço da placa de ELISA, as quais foram fixadas e bloqueadas com PBSA 5% (tampão fosfato-salina com 5% de soroalbumina bovina). Após isso, concentrações distintas do RBD de SARS-CoV-2 (2000 a 31,25 µg/mL) foram incubadas e, então, foi adicionada a enzima estreptavidina-HRP e o reagente TMB na ausência da luz, para posterior leitura a 450 nm e 570 nm. O teste também foi feito com as células não induzidas, a fim de comparar a inespecificidade da ligação do antígeno ao anticorpo nessa matriz celular.

Resultados e discussão: No resultado de *Yeast*-ELISA foi avaliado o sinal obtido das células induzidas e não induzidas em diferentes concentrações de RBD. Foi observado que o sinal de interação específica do antígeno RBD com o fragmento do anticorpo scFv (células induzidas) foi estatisticamente superior ao da interação não específica com as células não induzidas, sendo de 3,9 a 11,5x maior entre os grupos. Também foi possível observar que o sinal variou de acordo com a concentração de RBD, sendo que abaixo da concentração de 250 µg/mL os valores tenderam a estabilidade.

Conclusão: Com a realização desse trabalho pode-se afirmar que é possível realizar a expressão do scFv na levedura *S. cerevisiae* e mantê-lo fixado à superfície celular para uso, sem a necessidade de uma etapa de purificação. Além disso, o *Yeast*-ELISA demonstrou a possibilidade de uso dessa ferramenta para testes que visem a quantificação de alguma proteína viral ou diagnóstico da doença, em que foi verificada a baixa inespecificidade de ligação do RBD com a superfície da levedura, sendo um ponto relevante para a aplicação desse tipo de teste.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; diagnóstico COVID-19; scFv.

Apoio financeiro: CNPq - PIBITI (processo 3485), FAPESP (Processo 2021/13013-0), CNPq 402413/2020-2.