

PRÁTICA DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM ESCHERICHIA COLI

Thalita Fonseca de Araujo ¹

Juliano Tomazzoni Boldo ²

Resumo:

A base de recursos naturais da biotecnologia microbiana são os microrganismos. Teoricamente, os passos para obtenção de proteínas recombinantes são simples. O gene de interesse é selecionado, é realizada a clonagem em um vetor que se tenha à disposição, o mesmo é transformado no hospedeiro escolhido, a expressão é induzida e, então, a proteína está pronta para purificação e caracterização. O objetivo desta aula prática foi instrumentar os alunos em metodologias apropriadas para a indução da expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli*. Foram utilizadas células de *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3) pLys S já transformadas com o vetor de expressão pGEX 4T-1 contendo gene da quitinase CHI2 do fungo entomopatígeno *Metarhizium anisopliae*. O pré-inóculo foi feito colocando uma colônia de *E. coli* transformada com pGEX 4T-1 para crescer em meio Luria-Bertani líquido com ampicilina a 37 °C e 250 RPM até a saturação do meio com células. Após, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio LB líquido e cultivadas nas mesmas condições até atingir-se a absorbância de 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Um mL foi retirado antes da indução como controle negativo (não induzido) do experimento. A indução foi realizada adicionado Isopropil -D-1-tiogalactopiranosida estéril ao inóculo. As células foram cultivadas por 3 h nas mesmas condições acima descritas. Após, o frasco contendo as células foram mantidos em gelo durante 5 min. Após, o meio de cultura com células foi centrifugada a 5.000 g por 5 min. O sobrenadante foi removido, o pellet de células foi ressuscitado em água estéril e foi centrifugado novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e as células mantidas a -20 °C até o momento da análise da expressão. No momento da análise, as células foram lisadas utilizando a metodologia freeze-thaw, que consiste em congelar as células utilizando nitrogênio líquido e descongelá-las rapidamente em banho-maria a 37 °C por repetidos ciclos até o rompimento completo das células. As células lisadas foram centrifugadas e tanto o sobrenadante quanto pellet de células foram analisados. Proteínas expressas de forma insolúvel (corpos de inclusão) são detectas no pellet (fração insolúvel) e proteínas expressas de forma solúvel localizam-se no sobrenadante (fração solúvel). A análise foi realizada através por SDS-PAGE 12%. . A expressão heteróloga da proteína CHI2 foi efetiva, possuindo cerca de 65 kDa, aparecendo tanto na fração induzida insolúvel quanto na induzida solúvel. A partir deste experimento é possível realizar a purificação da proteína expressa e sua caracterização bioquímica. Ainda, pode-se alterar o protocolo de indução com o intuito de aumentar a massa de proteína expressa na fração solúvel, como a diminuição da temperatura

de cultivo, o aumento do tempo de cultivo e a redução da concentração molar do indutor. A prática de indução de expressão heteróloga de proteínas demonstrou ter sido exitosa, conseguindo, portanto, transmitir de forma satisfatória os princípios da expressão heteróloga de proteínas, capacitando os alunos a exercer atividades relacionadas a este tópico e fornecendo conhecimentos que contribuirão para sua atuação profissional.

Palavras-chave: Biotecnologia microbiana; Proteínas recombinantes; Sistemas Bacterianos; Microbiologia

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

PRÁTICA DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM ESCHERICHIA COLI

¹ Aluno de graduação. thalita.fonseca23@gmail.com. Autor principal

² Docente. julianoiboldo@unipampa.edu.br. Orientador



PRÁTICA DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM *ESCHERICHIA COLI*

1. INTRODUÇÃO

A base de recursos naturais da biotecnologia microbiana são os microrganismos, quer eles estejam em cultura ou em amostras de DNA ambientais, abrangendo muitas atividades científicas, que variam desde a produção de hormônios humanos recombinantes a inseticidas microbianos e desde a lixiviação mineral à biorremediação de resíduos tóxicos (GLAZER; NIKAIDO, 2007).

A utilização de DNA, proteínas e enzimas aplicadas para diagnóstico vem crescendo exponencialmente. Outrossim, a utilização de enzimas nos setores alimentício, têxtil, medicina química e outros vem aumentando do mesmo modo. A crescente necessidade de aplicações terapêuticas e outras de enzimas e proteínas pode ser satisfeita apenas pela síntese de proteínas recombinantes (RAI; PADH, 2001).

Não há dúvidas quanto ao fato de que a produção de proteínas recombinantes em sistemas microbianos revolucionou a bioquímica. Teoricamente, os passos para obtenção de proteínas recombinantes são simples. O gene de interesse é selecionado, é realizada a clonagem em um vetor que se tenha à disposição, o mesmo é transformado no hospedeiro escolhido, a expressão é induzida e, então, a proteína está pronta para purificação e caracterização. Na prática, diversos fatores podem interferir: baixa taxa de crescimento do hospedeiro, formação de corpos de inclusão, inatividade proteica e, até mesmo, a não obtenção da proteína alvo (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

O sistema procariótico que utiliza a bactéria *Escherichia coli* como organismo hospedeiro de expressão é o mais utilizado para a produção de proteínas heterólogas. O seu curto tempo de geração, baixo custo e facilidade de manuseio, além de sua ampla caracterização, a tornam um organismo ideal para expressar proteínas recombinantes (BERNAUDAT, et al., 2011).

Com vistas à importância fundamental da expressão heteróloga de proteínas não somente para a biotecnologia, mas também para a ciência como um todo, o objetivo desta aula prática foi instrumentar os alunos em metodologias apropriadas para a indução da expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas células de *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3) pLys S já transformadas com o vetor de expressão pGEX 4T-1 contendo gene da quitinase CHI2 do fungo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

O pré-inóculo foi feito colocando uma colônia de *E. coli* transformada com pGEX 4T-1 para crescer em meio Luria-Bertani (LB) líquido com ampicilina (50 µg.mL⁻¹) a 37 °C e 250 RPM até a saturação do meio com células, por período *overnight*.

Após, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio LB líquido e cultivadas nas mesmas condições até atingir-se a absorbância de 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Um mL foi retirado antes da indução como controle negativo (não induzido) do experimento.

A indução foi realizada adicionando Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (1 mM) estéril ao inóculo.

As células foram cultivadas por 3 h nas mesmas condições acima descritas. Após, o frasco contendo as células foram mantidos em gelo durante 5 min. Após, o meio de cultura com células foi centrifugado a 5.000 g por 5 min. O sobrenadante foi removido, o pellet de células foi ressuspensionado em água estéril e foi centrifugado novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e as células mantidas a -20 °C até o momento da análise da expressão.

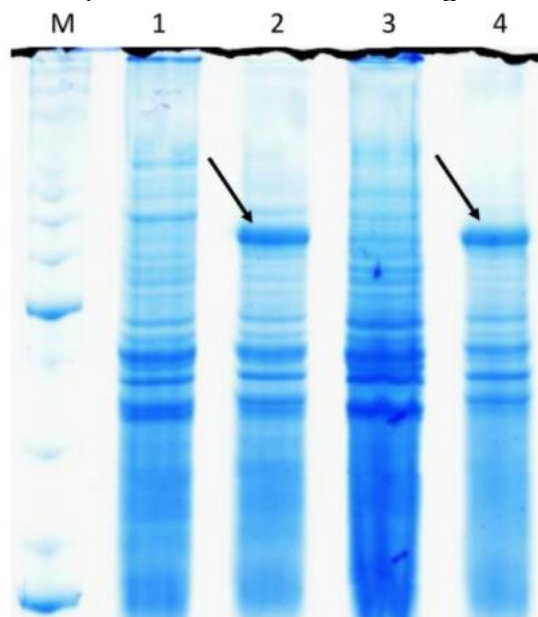
No momento da análise, as células foram lisadas utilizando a metodologia *freeze-thaw*, que consiste em congelar as células utilizando nitrogênio líquido e descongelá-las rapidamente em banho-maria a 37 °C por repetidos ciclos até o rompimento completo das células. As células lisadas foram centrifugadas e tanto o sobrenadante quanto *pellet* de células foram analisados. Proteínas expressas de forma insolúvel (corpos de inclusão) são detectadas no *pellet* (fração insolúvel) e proteínas expressas de forma solúvel localizam-se no sobrenadante (fração solúvel).

A análise foi realizada através por SDS-PAGE 12% utilizando marcador de peso molecular *Low Range* SDS-PAGE Standards (BioRad). Após, foi realizada a coração do gel com *comassie blue* R-250 a 60 °C por 1 h para observação do perfil de expressão proteico.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Foram aplicadas quatro amostras no gel, além do marcador de peso molecular: fração insolúvel não induzida, fração insolúvel induzida, fração solúvel não induzida e fração solúvel induzida, como pode ser observado na Figura 1:

Figura 1: Expressão da quitinase CHI2 de *Metarhizium anisopliae* em *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3) pLys S. M – marcador *Low Range* SDS-Standards (BioRad); 1 – fração insolúvel não induzida; 2 – fração insolúvel induzida; 3 – fração solúvel induzida; 4 – fração solúvel induzida. As setas indicam a proteína CHI2 expressa de forma heteróloga.



É possível observar que houve êxito na expressão heteróloga da proteína CHI2, com cerca de 65 kDa, tanto na fração induzida insolúvel quanto na induzida solúvel. A partir deste experimento é possível realizar a purificação da proteína expressa e sua caracterização bioquímica. Ainda, pode-se alterar o protocolo de indução com o intuito de aumentar a massa de proteína expressa na fração solúvel, como a diminuição da temperatura de cultivo, o aumento do tempo de cultivo e a redução da concentração molar do indutor.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prática de indução de expressão heteróloga de proteínas demonstrou ter sido efetiva, sendo que a proteína de interesse foi expressa, como observado na Figura 1.

A prática conseguiu, portanto, transmitir de forma satisfatória os princípios da expressão heteróloga de proteínas, capacitando os alunos a exercer atividades relacionadas a este tópico e fornecendo conhecimentos que contribuirão para sua atuação profissional.

5. REFERÊNCIAS

BERNAUDAT F. et al. Heterologous Expression of Membrane Proteins: Choosing the Appropriate Host. PLoS ONE 6(12): e29191, 2011

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology, 2nd edition, New York, Cambridge University Press, 2007.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. CURRENT SCIENCE, VOL. 80, NO. 9, 2001.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in Microbiology. Vol. 5, Art. 172, 2014.