



Applied Structural
Biology Lab
transporters

Proteínas Periplasmáticas

Andrea Balan

abalan@usp.br

17.08.2020

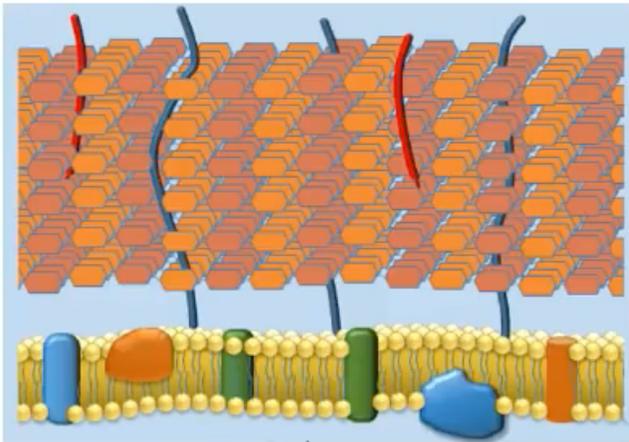
Disciplina Envoltório Bacteriano

Programa

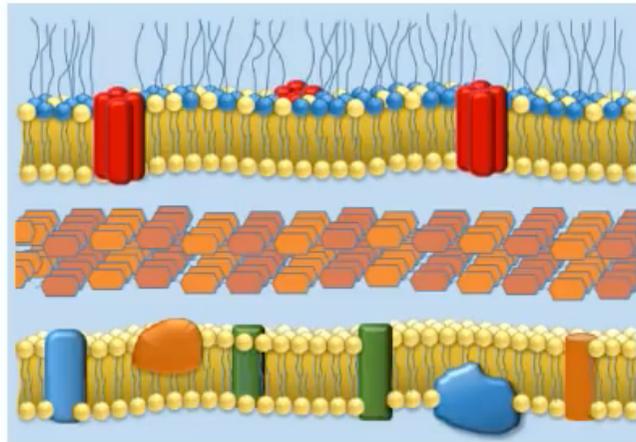
- Envoltório celular - característica do periplasma
- Função e principais tipos de proteínas do periplasma
- Enovelamento e transporte no periplasma
- Métodos de extração/fracionamento
- Escolha de sistemas de clonagem/expressão

Envoltório celular e periplasma

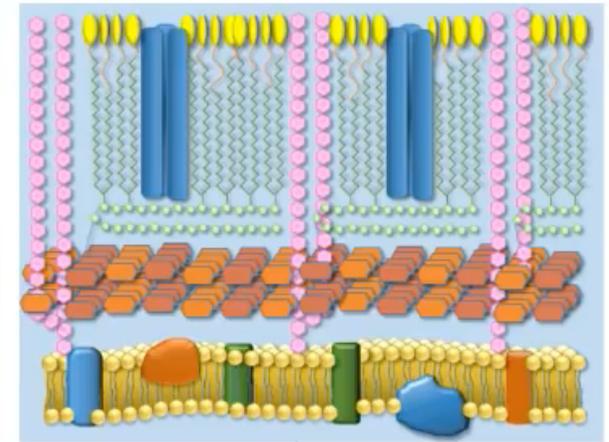
Gram Positive



Gram Negative



Acid Fast



Nível de dificuldade de isolamento de proteínas

Espaço Periplasmático

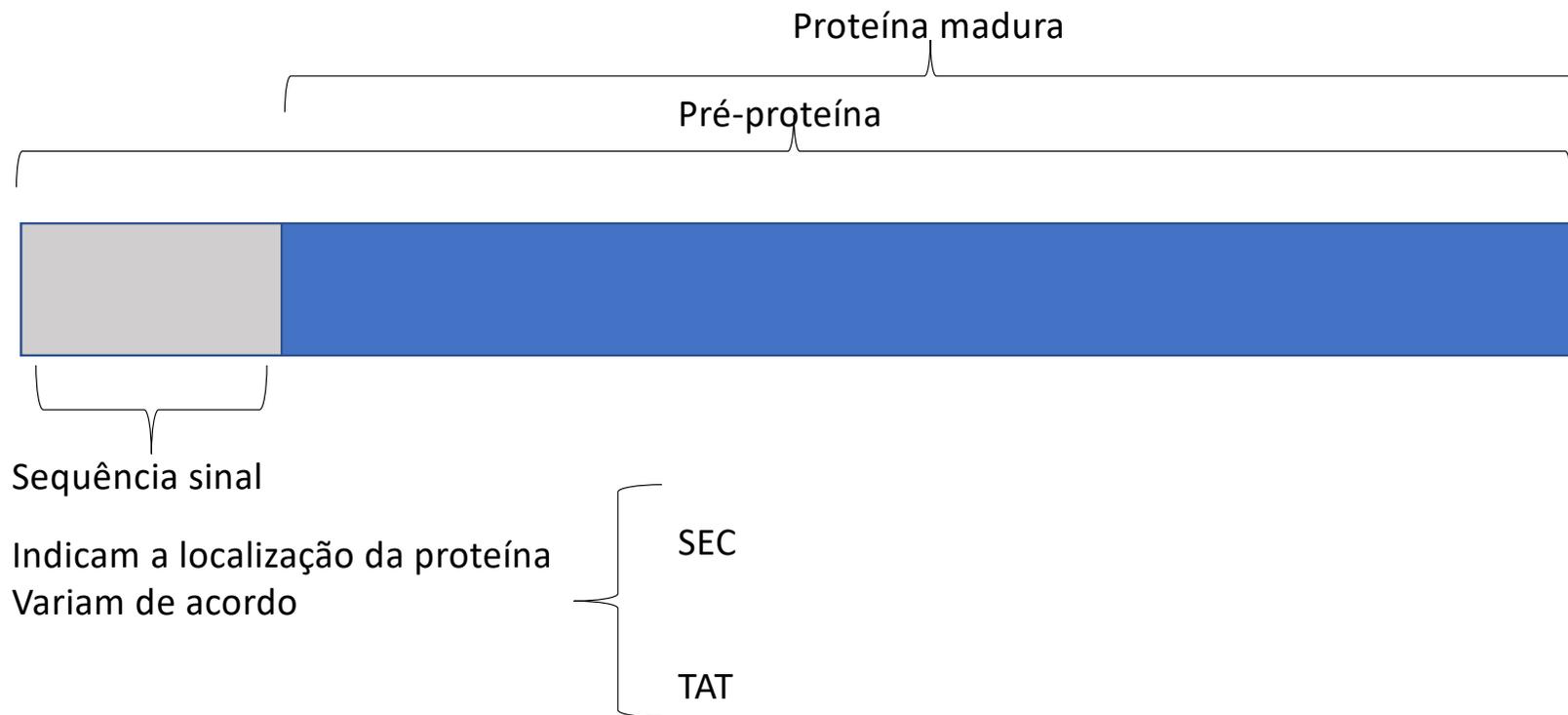
- consistência de gel
- grande número de proteínas
- 1 a cerca de 70 nm de espessura
- 40% do volume total da célula
- várias enzimas, proteínas ligadoras, transportadoras e quimiorreceptores
- Moléculas de açúcares, íons, peptídeos, aminoácidos, etc

Proteínas Periplasmáticas

- Enzimas
 - Óxido-reductases, transferases, hidrolases, etc
- Proteínas envolvidas em:
 - Formação de pontes de sulfeto
 - Transporte de elétrons
 - Regulação
 - Crescimento celular
 - Quimiotaxia e motilidade
 - Pilus Chaperone Proteins
 - Transportadoras (ligadoras)
 - Chaperonas

Mas como as
proteínas foram
parar no EP?

Proteínas que atravessam a membrana apresentam uma sequência sinal



O Sistema Sec de Transporte de Proteínas em Bactérias

- Sequência sinal

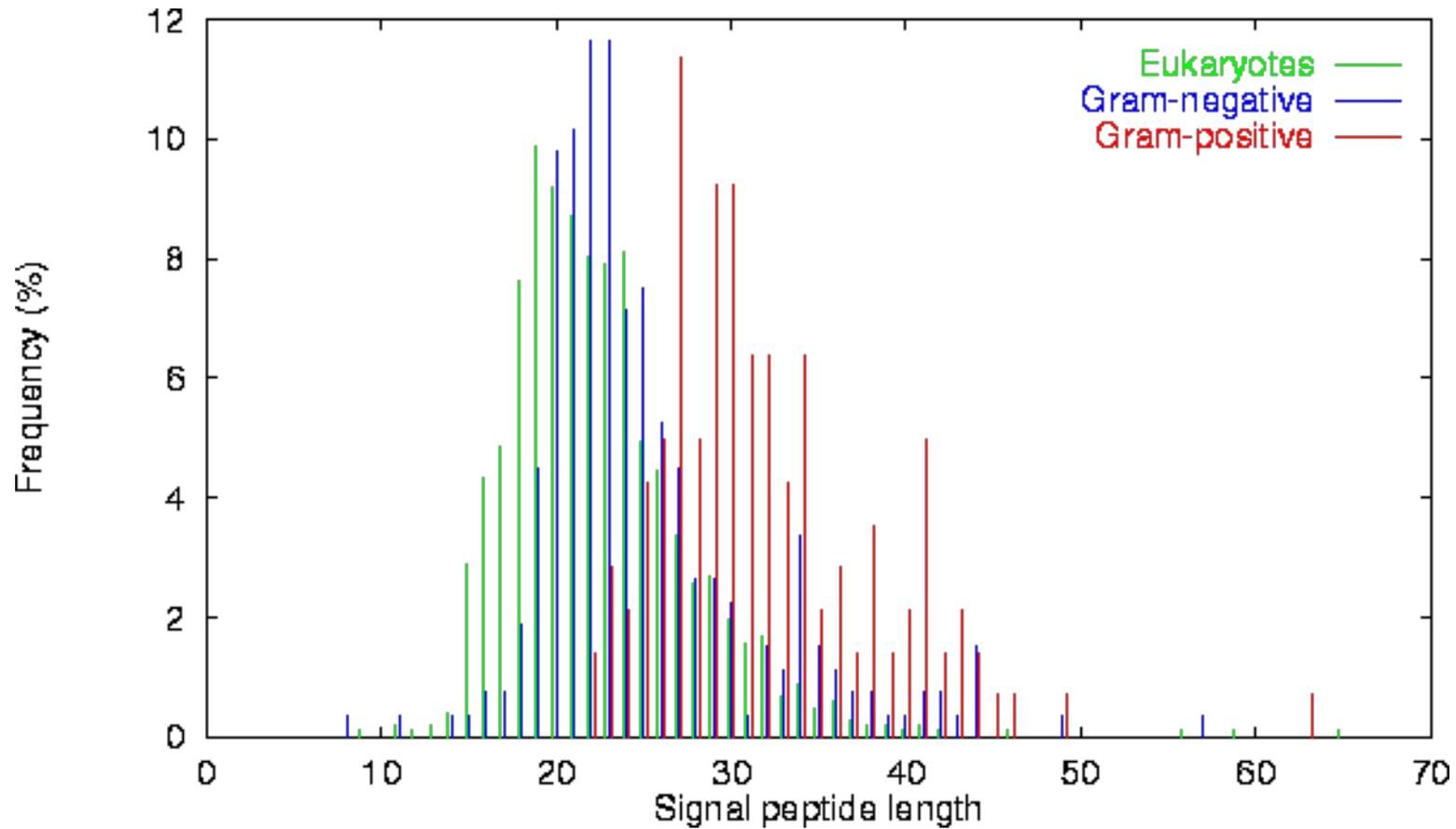
- Comprimento de 15 a 30 resíduos de aminoácidos
- Sinaliza a maquinaria celular para o reconhecimento de proteínas que devem ser transportadas

N (3-4 ++)

H (hidrofóbico)

N (A-X-A)

Variação das Sequências Sinal



Signal P

Sequence

Prediction: Signal peptide (Sec/SPI)

Cleavage site between pos. 24 and 25: ASA-
QT. Probability: 0.6424

Protein type	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Other
Likelihood	0.976	0.0008	0.0185	0.0047

Submit data

The SignalP 5.0 server predicts the presence of signal peptides and the location of their cleavage sites in proteins from Archaea, Gram-positive Bacteria, Gram-negative Bacteria and Eukarya. In Bacteria and Archaea, SignalP 5.0 can discriminate between three types of signal peptides:

- Sec/SPI: "standard" secretory signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase I (*Lep*)
- Sec/SPII: lipoprotein signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase II (*Lsp*)
- Tat/SPI: Tat signal peptides transported by the Tat translocon and cleaved by Signal Peptidase I (*Lep*)

SignalP 5.0 is based on a deep convolutional and recurrent neural network architecture including a conditional random field.

Mirror Use the new server if this one is heavily loaded.

i Protein sequences should be not less than 10 amino acids. The maximum number of proteins is 5000.

```
MRMIGFWQRALCVLMLTLPVLSAQTAPVTVFAAASLKESMDEAATAYEKATGTPVRSY
AASSALARQIEQGAPADVFFSADLEWMDYLQHQGLVLPQRHNLGNTLVLPASSKLR
VDPRAPGAIKALGENRLAVGQTASVPAGKYAAAALRKLQWDSVSNRLAESVRAAL
MLYSRGEAPLGIVYGSARADAKVRVWATFPDSDHAIVYPAALKNSNPNATAAFVSWL
GSKPKAIFARRGFSLKD
```

Organism group:

- Eukarya
 Gram-positive
 Gram-negative
 Archaea

Output format:

- Long output
 Short output (no figures)

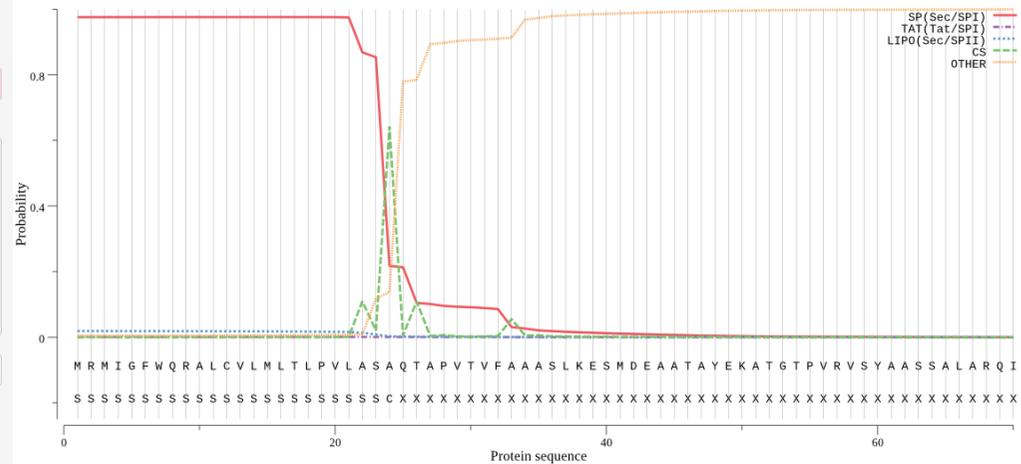
Upload Fasta File

Example proteins

Submit

Reset

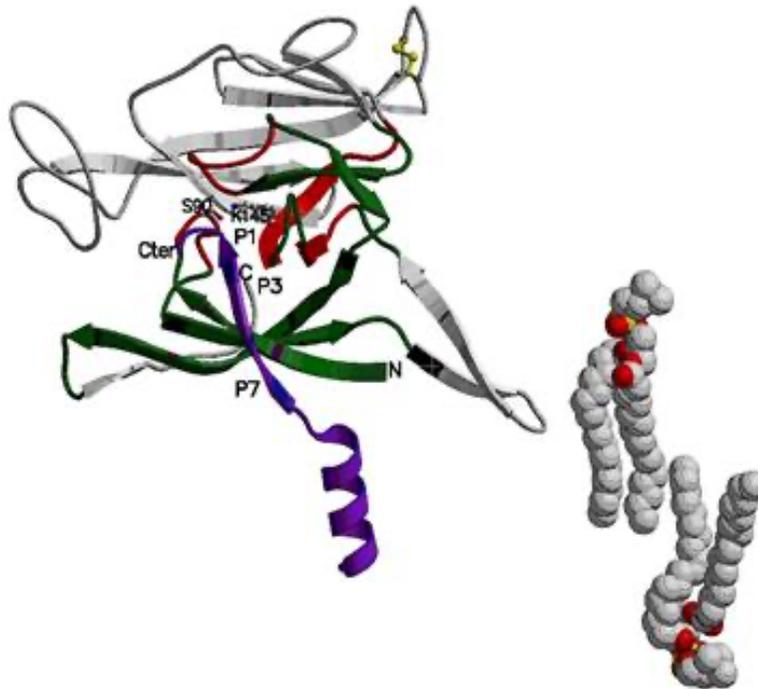
SignalP-5.0 prediction (Gram-negative): Sequence



Signal peptide		Recombinant protein		Host	Yield	Ranking	Reference
Signal sequence	Origin	Protein	Origin				
MKNMSCKLWSVT LFFSFLTIGPLAHA	<i>B. subtilis</i> , <i>Epr</i>	Cutinase	<i>F. solani pisi</i>	<i>B. subtilis</i> TEB1030	4.67 [U/mL]	1/173	Brockmeier et al., 2006
MAKPLSKGGILVKKVLIAGA VGTAVLFGTLSSGIPGLPAADAQVAKA	<i>B. subtilis</i> , <i>YncM</i>	Aminopeptidase	<i>B. subtilis</i> Zj016	<i>B. subtilis</i> WB600	88.59 [U/mL]	1/20	Guan et al., 2016
MKKFNFKTMLLLVLASCVFGWV VNVTTSLGPQTAITAQA	<i>L.</i> <i>plantarum</i> WCFS1	NucA (nuclease)	<i>S. aureus</i>	<i>L. plantarum</i> WCFS1	35.84 [U/mL]	1/78	Mathiesen et al., 2009
MKEVRFWGLLLGL FVCLGAVIPLVSKA	<i>L.</i> <i>plantarum</i> WCFS1	AmyA (amylase)	<i>L.</i> <i>amylovorus</i> NRRL B-4549	<i>L. plantarum</i> WCFS1	3.4 [10 ² mU/mL]	1/18	Mathiesen et al., 2009
MQINRRGFLKA TAGLATIGAASMFMPKANA	<i>C.</i> <i>glutamicum</i> R	AmyE (α -amylase)	<i>G.</i> <i>stearothermophilus</i>	<i>C. glutamicum</i>	288.3 [U/mL]	1/31	Watanabe et al., 2009
MRSKKLWISLLF ALTLIFTMAFSNMSA	<i>B.</i> <i>licheniformis</i> WX-02, <i>AprE</i>	Nattokinase	<i>B. subtilis</i> <i>natto</i>	<i>B. licheniformis</i> Δ 0F-3	31.99 [FU/mL]	1/81	Cai et al., 2016
MKNMSCKLWSVTL FFSFLTIGPLAHA	<i>B. subtilis</i> , <i>Epr</i>	Cutinase	<i>F. solani pisi</i>	<i>C. glutamicum</i>	13.1 [U/mL]	1/64	Hemmerich et al., 2016
MKKFPPKLLPIAVL SSIAFSSLASGSVPEASA	<i>B. subtilis</i> , <i>PhoB</i>	XynBYG (alkaline active xylanase)	<i>B. pumilus</i> BYG	<i>B. subtilis</i> WB700	327.2 [U/mL]	1/138	Zhang et al., 2016
MRSKKLWISLLFAL TLIFTMAFSNMSVQA	<i>B. subtilis</i> 168, <i>AprE</i>	Alkaline protease	<i>B.</i> <i>alcalophilus</i> TCCC11004	<i>B. subtilis</i> WB600	7574.08 [U/mL]	1/35	Our lab
MRIFKKAFFVIMI SFLIATVNVNTAHA	<i>B. subtilis</i> 168, <i>DacB</i>	Alkaline protease	<i>B.</i> <i>alcalophilus</i> TCCC11004	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> 111018	19835.7 [U/mL]	1/86	Our lab

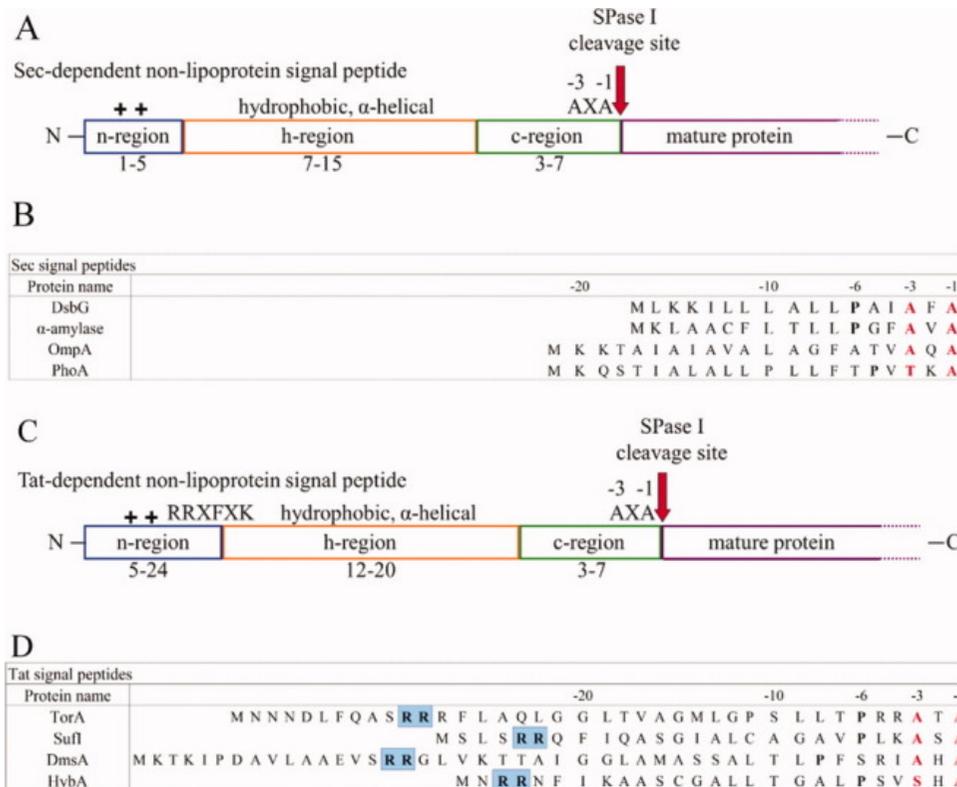
O Sistema Sec de Transporte de Proteínas em Bactérias

Endopeptidase



- Sinal-peptidase Tipo 1 é uma endopeptidase essencial que permanece associada à membrana. Peptidases bacterianas reconhecem o duo catalítico Ser/Lys

Peptidase sinal



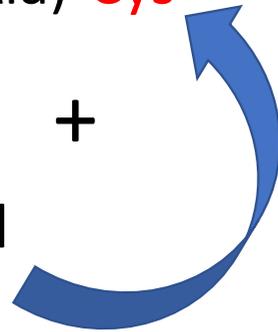
As características e o alinhamento dos peptídeos sinalizadores bacterianos. A estrutura tripartida de peptídeos de sinal não-lipoproteicos dependentes de Sec é representada em (A), onde o N-terminal é caracterizado pela presença de resíduos carregados positivamente (azul), o núcleo do peptídeo é composto de resíduos hidrofóbicos (laranja), e o terminal C é tipicamente neutro, mas polar e contém o local de clivagem (verde). A seta vermelha indica o local de clivagem da SPase e o motivo de aminoácido comum ao local de clivagem é fornecido. A região madura (roxa) da pré-proteína segue o local de clivagem. (B) Alinhamento da sequência do peptídeo sinal dependente de Sec. Sequências de peptídeos de sinal compiladas da base de dados SPdb.1 Os resíduos -1, -3 (vermelho) exibem a conservação da sequência de pequenos resíduos alifáticos entre uma série de peptídeos de sinal dependentes de Sec e Tat. Se presente, a prolina conservada está em negrito. O local de clivagem é o terminal carboxi do resíduo -1. (C) O peptídeo sinal não-lipoproteico dependente de Tat, representado da mesma maneira que o painel (A). (D) Alinhamento da sequência do peptídeo sinal dependente de Tat. Representados como no painel (B) e os resíduos destacados em azul são os resíduos de arginina necessários que dão à via Tat seu nome.

lipobox

- Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys

+

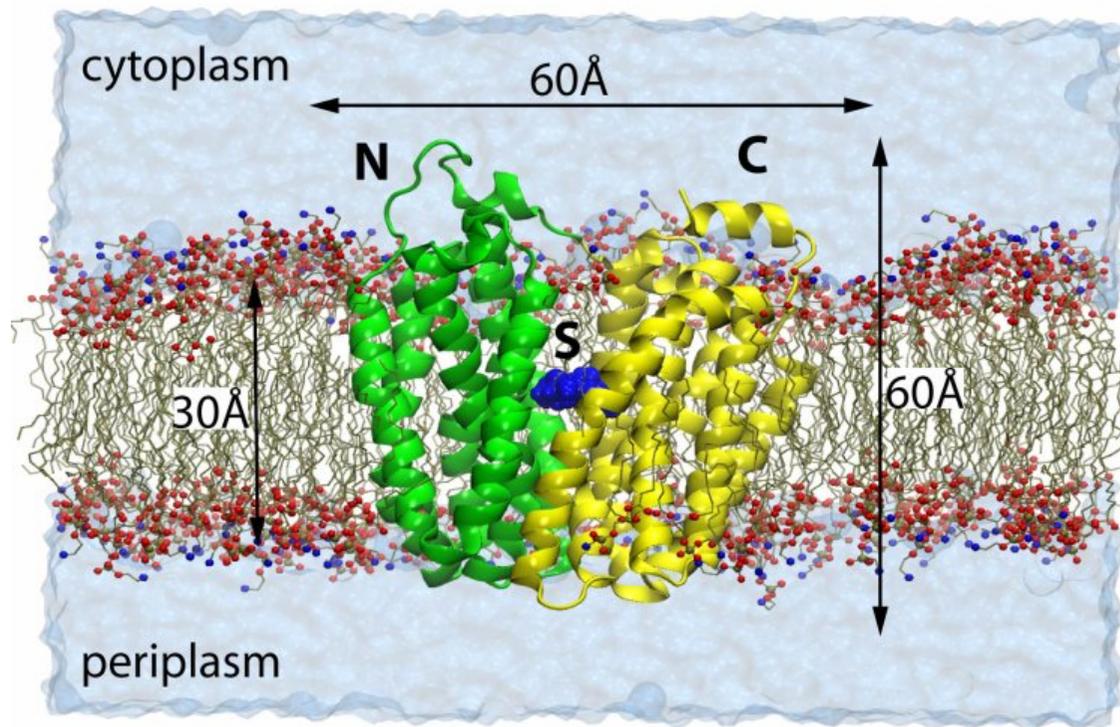
- Diacil-glicerol



Clivagem do peptídeo
sinal e acetilação

Sistemas de Secreção transportam proteínas

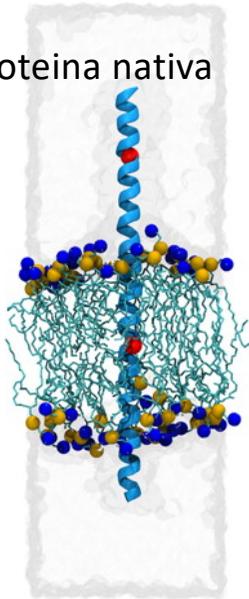
- secreção envolve a passagem de proteínas para o meio extracelular



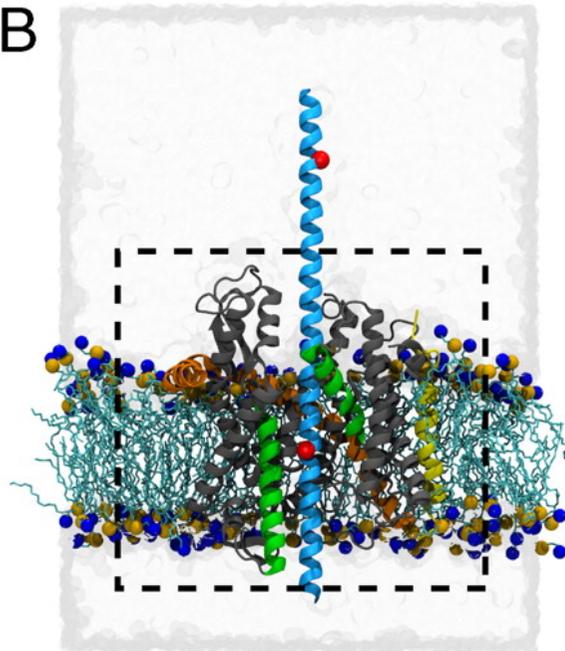
O Complexo Translocon

A

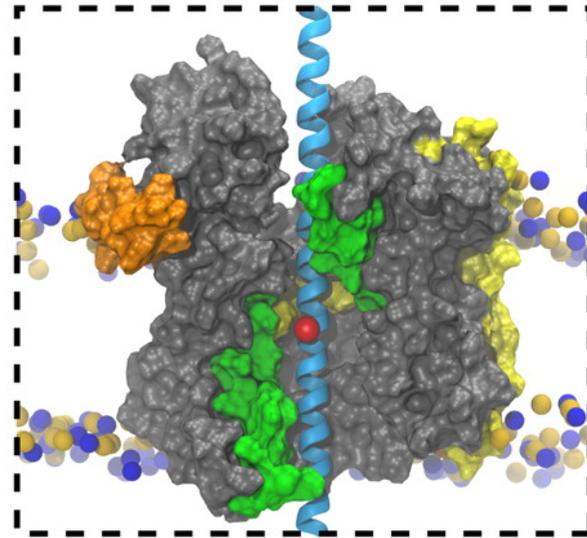
Proteína nativa



B

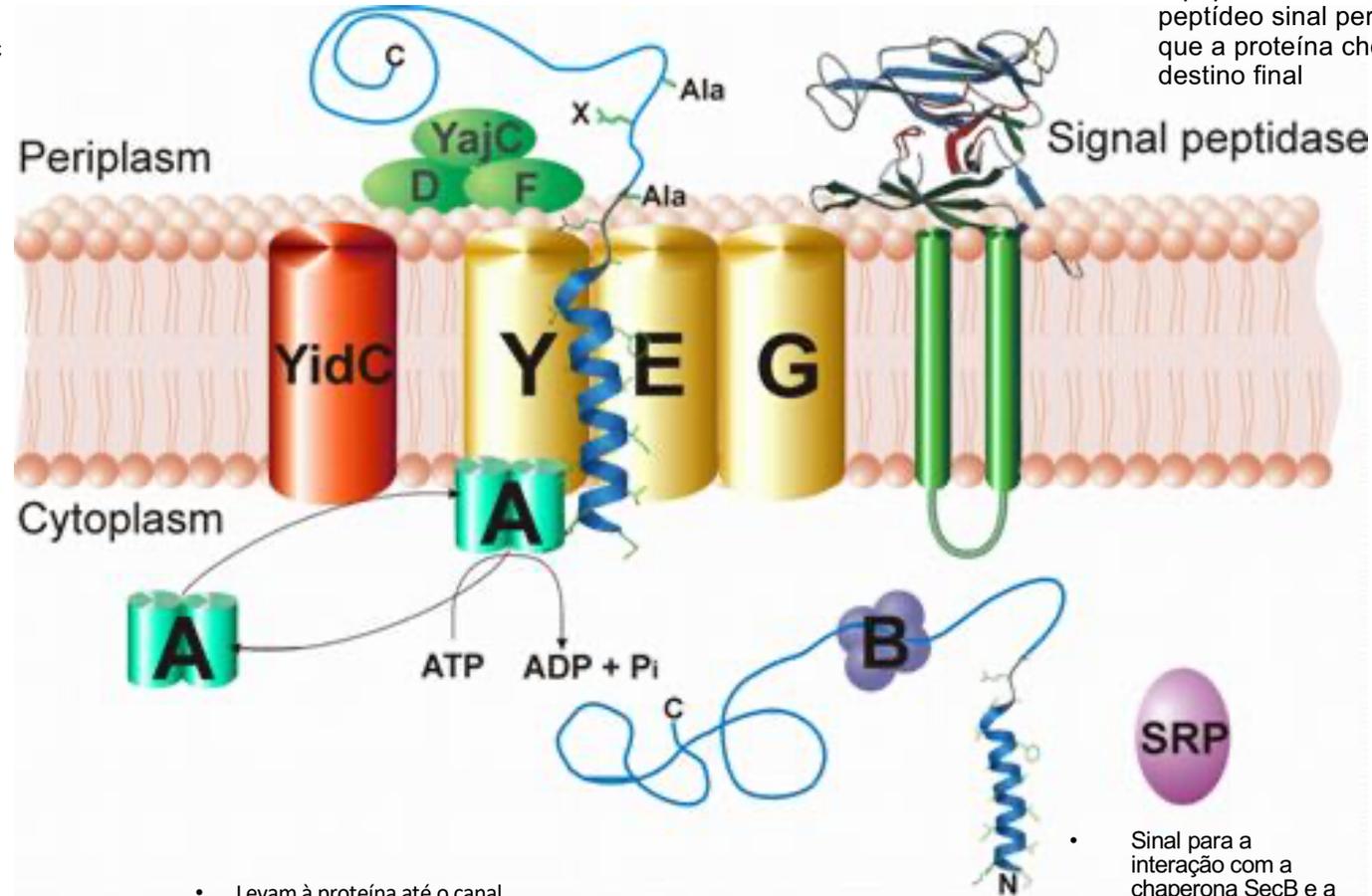


C



O Sistema Sec de Transporte de Proteínas em Bactérias

- As proteínas SecDF e YajC (verde) ajudam no re-enovelamento ou fecham o poro de passagem



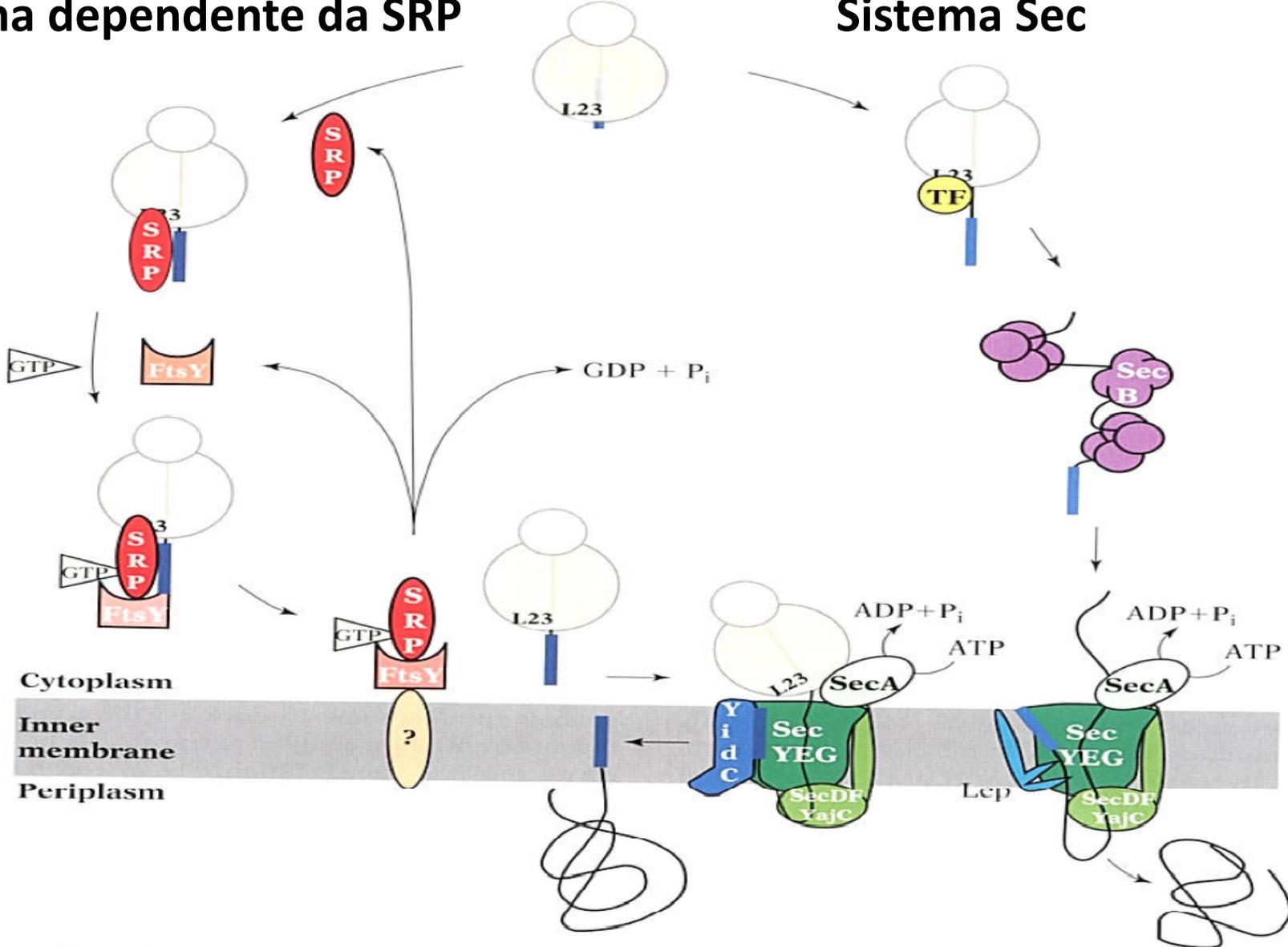
- A peptidase sinal cliva o peptídeo sinal permitindo que a proteína chegue ao destino final

- Levam à proteína até o canal na membrana formado pelas proteínas SecYEG (amarela)

- Sinal para a interação com a chaperona SecB e a ATPase SecA

Sistema dependente da SRP

Sistema Sec



O Receptor da SRP

G domain

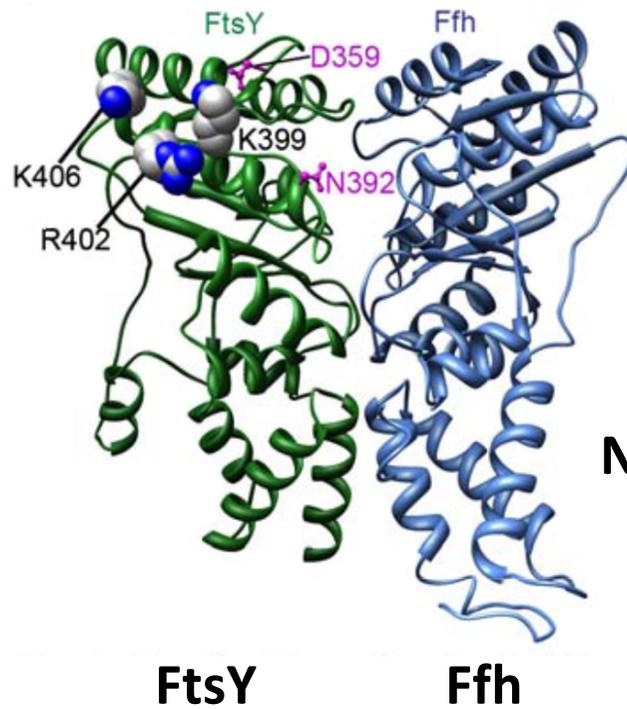
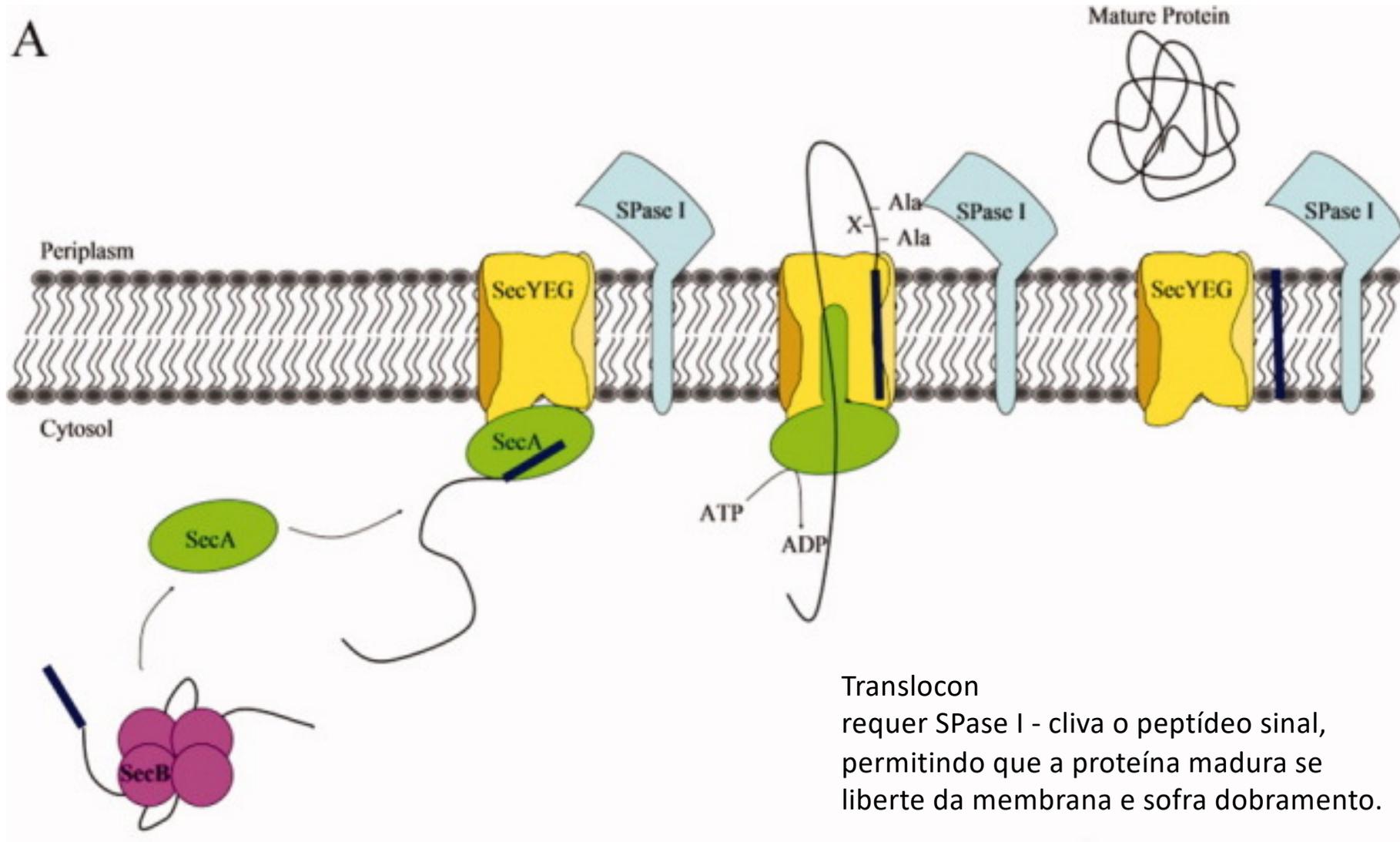


Figure 4. FtsY-Lys399 plays a crucial role in SRP–FtsY complex assembly. The basic residues on the FtsY G α 2-helix are highlighted in spacefill in the crystal structure of the *Thermus aquaticus* Ffh-FtsY NG-domain complex. (Shen and Shan, 2010)

Sistema SEC

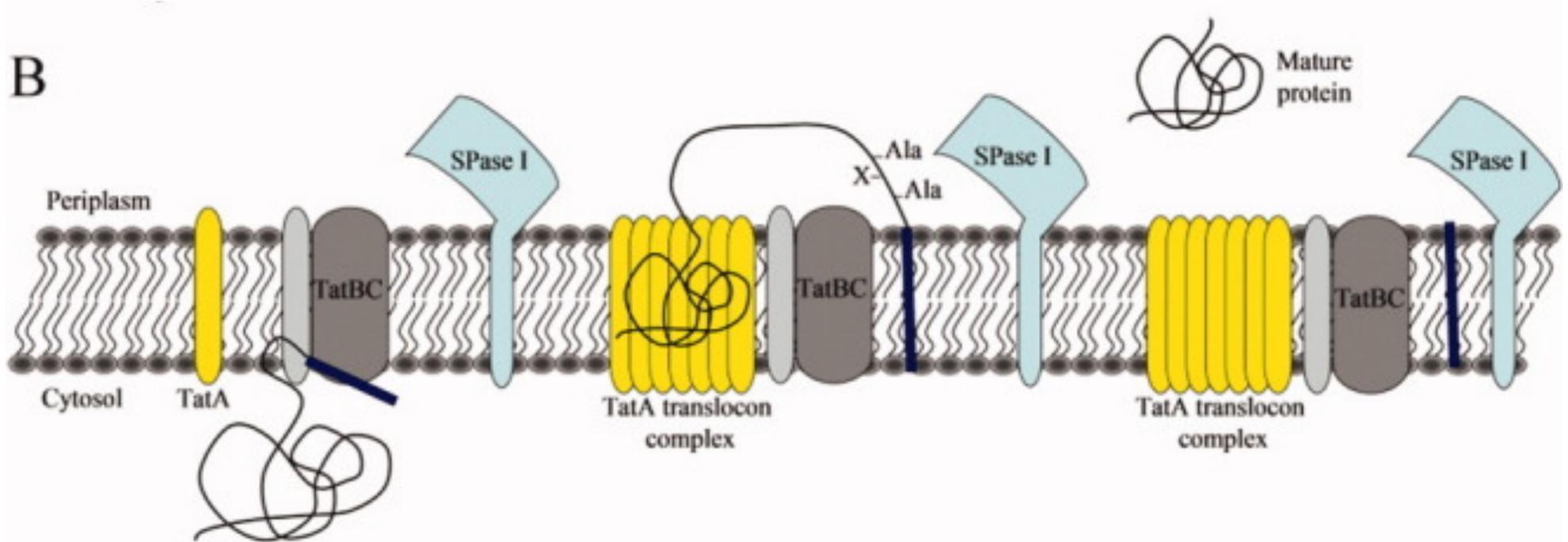
A



O Sistema Tat de Transporte de Proteínas em Bactérias

- Aceita apenas proteínas enoveladas
- Ainda não é bem descrito
- Sequência sinal tipo Tat
 - São idênticas na composição mas contém 2 resíduos consecutivos de **Argininas** dentro do domínio N
 - (**Twin-arginine-transport**)

O Sistema Tat de Transporte de Proteínas em Bactérias



via de translocação pós-translacional usada para a secreção de pré-proteínas totalmente enoveladas. O complexo TatBC reconhece e se liga à sequência sinal de uma pré-proteína dependente de Tat. Isso causa o recrutamento de TatA e a formação de um translocon de TatA de tamanho apropriado. A pré-proteína totalmente dobrada é então secretada no periplasma, enquanto a sequência sinal permanece na membrana. A proteína madura é liberada no periplasma assim que a SPase I cliva o peptídeo sinal.

O Translocon

Poros que tem movimento em duas direções e reconhece
quais proteínas ficam ou
Devem ultrapassar a membrana

1- Complexo central: Heterotrímero que forma um poro
de passagem

Altamente conservado

Em *E. coli*: **SecY, E, G**

Em eucariotos: **Sec61 α , β e γ**

2 – partícula de reconhecimento de sinal (SRP)

O Translocon

3- receptor de SRP

Ffh e FtsY

SecA (somente em bactérias)

se associa a SecB no translocon e promove a passagem de 30-40 resíduos por molécula de ATP cívado (E! para a translocação)

SecG – modula a atividade da SecA

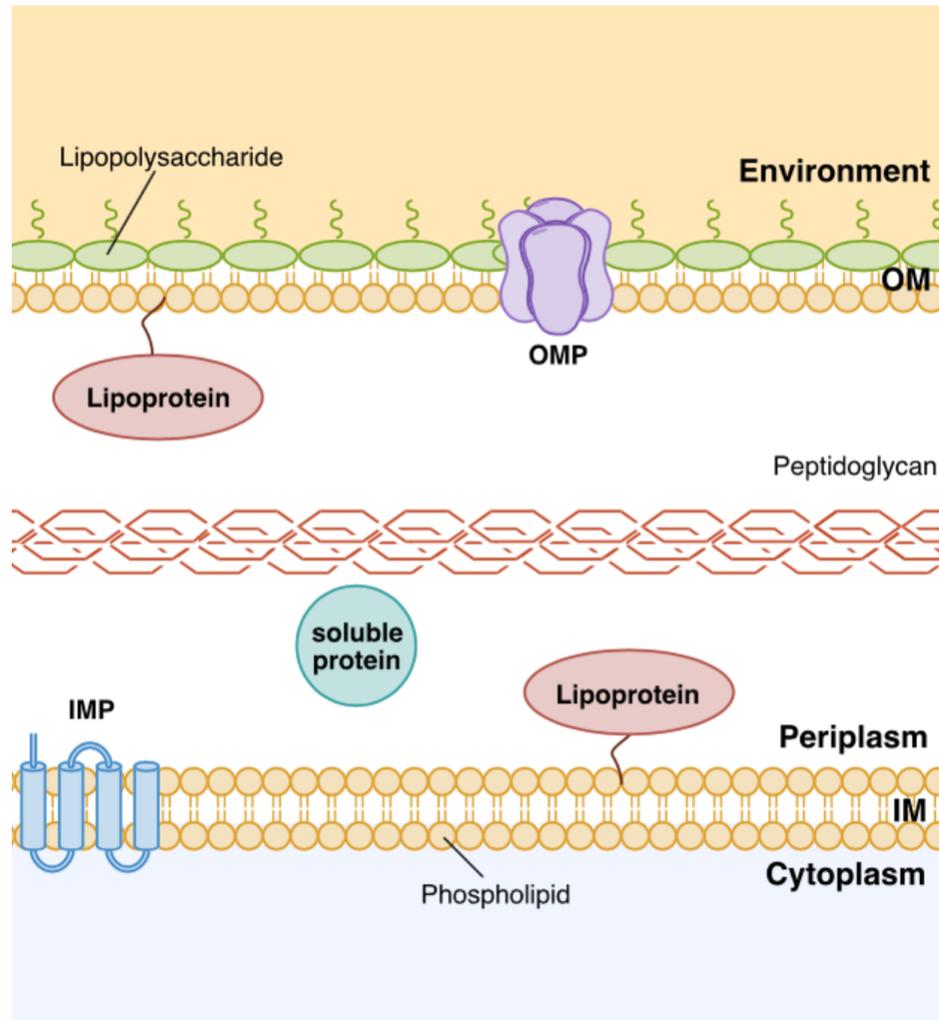
TRAM - translocating chaim-associated membrane protein (somente em eucariotos)

4- chaperonas

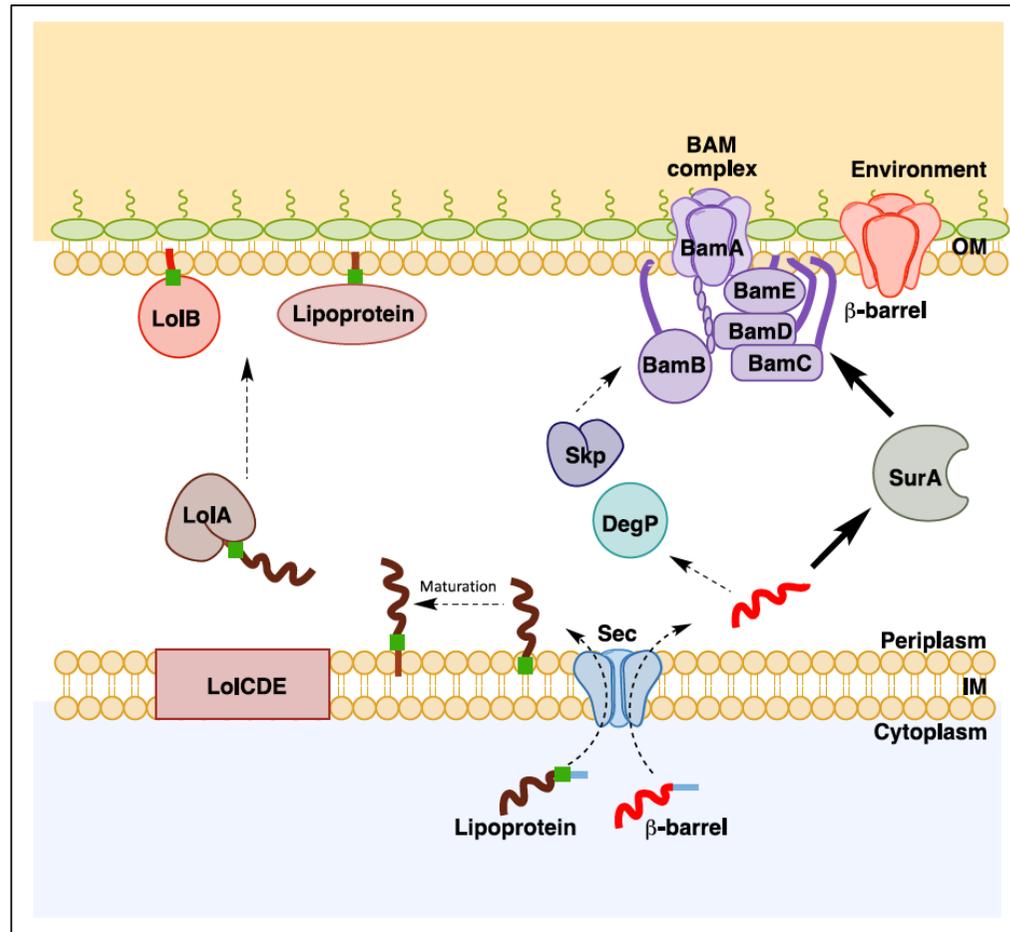
SecB e GroE (chaperonas que evitam agregação)

BiP

O envoltório celular tem várias proteínas características

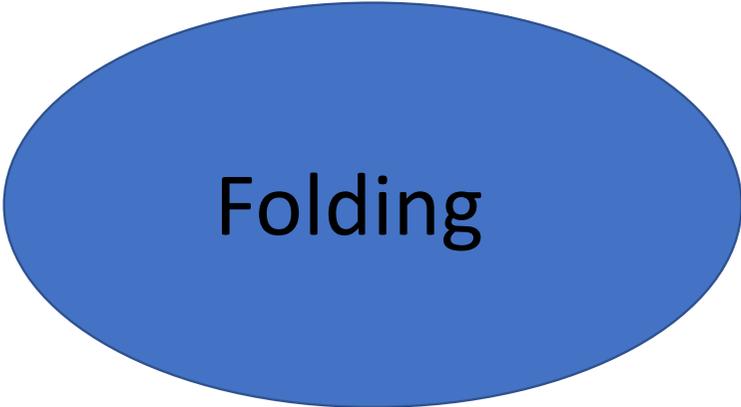


Modelo para rede de proteínas chaperonas.

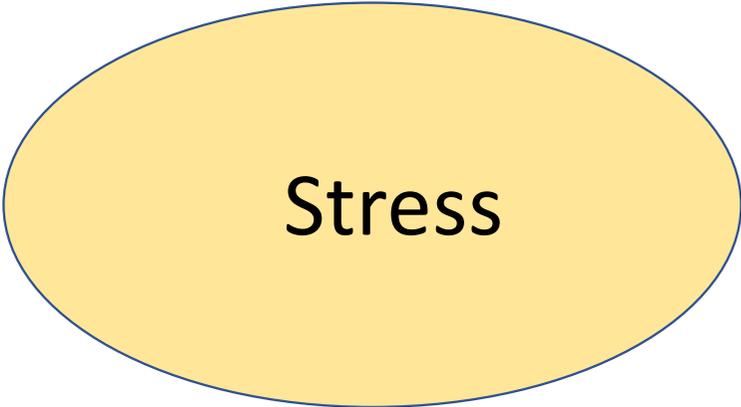


Folding de proteínas periplasmáticas

- Chaperonas (LolA – chaperona de lipoproteínas, SurA, FkpA, Skp, **DegP** – baixas temperaturas, entre outras)
- Não usam ATP



Folding



Stress

Expressão/extração de proteínas

- Toda informação da sua proteína de interesse
 - Bibliografia
 - Ortólogos, função, localização, hospedeiro, nativa, etc etc etc, massa molecular, características, folding
- Citoplasma
 - Mais fácil, maior quantidade, ambiente redutor
- Periplasma
 - Ambiente oxidante
 - Facilidade de obtenção da proteína de interesse – somente uma membrana a ser lisada
 - Extratos periplasmáticos contêm mínimas quantidades de parede celular e componentes citoplasmáticos

Expressão/extração de proteínas

- Ambiente do periplasma favorece também a produção de proteínas com pontes dissulfeto
 - Ambiente oxidante
 - Presença de enzimas como proteínas formadoras de pontes S-S (Disulfide bond-forming enzymes, Dsb)
 - Isomerases e chaperonas
 - Permeabilidade do periplasma, especificamente de G(-) permite o transporte de aditivos que facilitam o enovelamento e estabilidade
 - Periplasma não contém ácidos nucleicos e poucas proteases

Expressão/extração de proteínas

- Estudos anteriores demonstraram que a quantidade de secreção de uma determinada proteína alvo varia significativamente, dependendo do peptídeo sinal que está fundido à proteína
- o acúmulo de proteínas recombinantes no citoplasma levará à formação de corpos de inclusão ou degradação de proteínas via proteases

O Sistema Sec de Transporte de Proteínas em Bactérias

- Sequência sinal

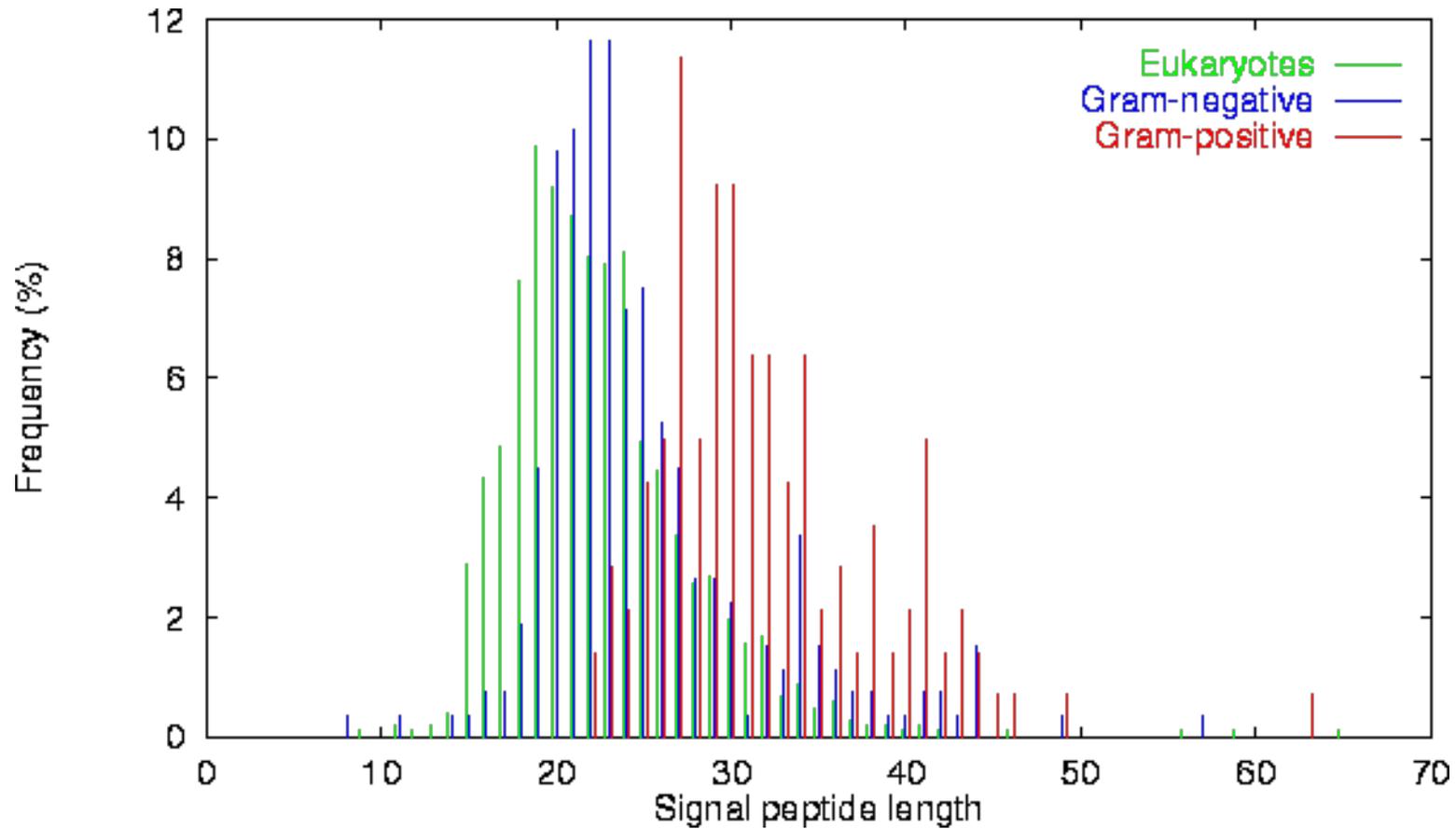
- Comprimento de 15 a 30 resíduos de aminoácidos
- Sinaliza a maquinaria celular para o reconhecimento de proteínas que devem ser transportadas

N (3-4 ++)

H (hidrofóbico)

N (A-X-A)

Variação das Sequências Sinal



Signal P

Sequence

Prediction: Signal peptide (Sec/SPI)

Cleavage site between pos. 24 and 25: ASA-
QT. Probability: 0.6424

Protein type	Signal peptide (Sec/SPI)	TAT signal peptide (Tat/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	Other
Likelihood	0.976	0.0008	0.0185	0.0047

Submit data

The SignalP 5.0 server predicts the presence of signal peptides and the location of their cleavage sites in proteins from Archaea, Gram-positive Bacteria, Gram-negative Bacteria and Eukarya. In Bacteria and Archaea, SignalP 5.0 can discriminate between three types of signal peptides:

- Sec/SPI: "standard" secretory signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase I (*Lep*)
- Sec/SPII: lipoprotein signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by Signal Peptidase II (*Lsp*)
- Tat/SPI: Tat signal peptides transported by the Tat translocon and cleaved by Signal Peptidase I (*Lep*)

SignalP 5.0 is based on a deep convolutional and recurrent neural network architecture including a conditional random field.

Mirror Use the new server if this one is heavily loaded.

i Protein sequences should be not less than 10 amino acids. The maximum number of proteins is 5000.

```
MRMIGFWQRALCVLMLTLPVLSAQTAPVTVFAAASLKESMDEAATAYEKATGTPVRSY
AASSALARQIEQGAPADVFFSADLEWMDYLQQHGLVLPQRHNLGNTLVLPASSKLR
VDPRAPGAIKALGENRLAVGQTASVPAGKYAAAALRKLQWDSVSNRLAESESVRAAL
MLYSRGEAPLGIVYGSARADAKVRVWATFPDSDHAIVYVPAALKNSNPNATAAFVSWL
GSKPKAIFARRGFSLKD
```

Organism group:

- Eukarya
 Gram-positive
 Gram-negative
 Archaea

Output format:

- Long output
 Short output (no figures)

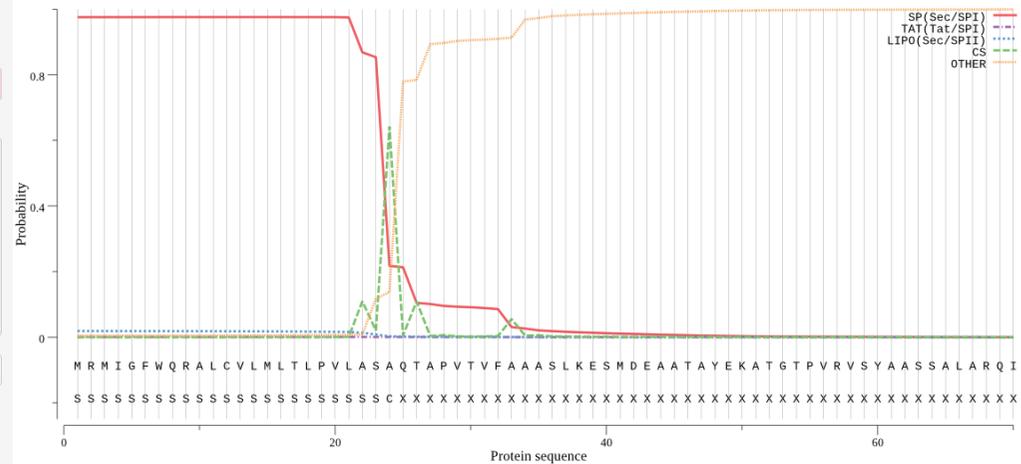
Upload Fasta File

Example proteins

Submit

Reset

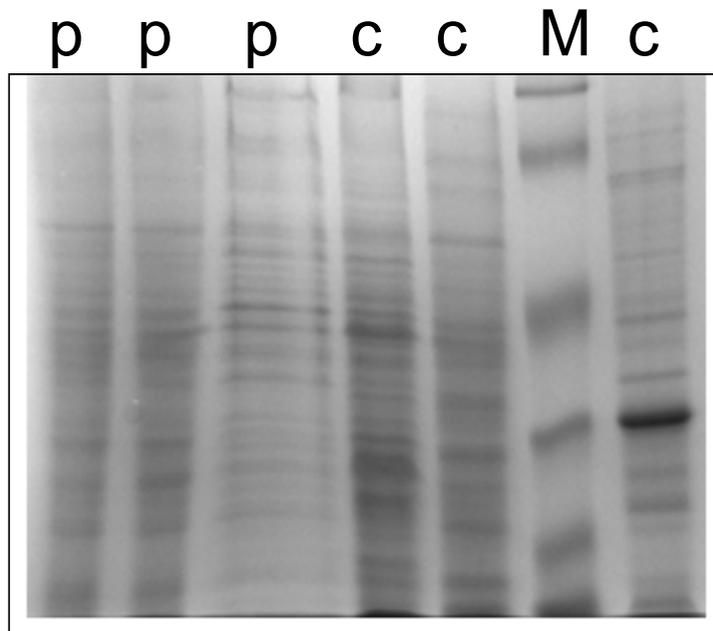
SignalP-5.0 prediction (Gram-negative): Sequence



Signal peptide		Recombinant protein		Host	Yield	Ranking	Reference
Signal sequence	Origin	Protein	Origin				
MKNMSCKLWSVT LFFSFLTIGPLAHA	<i>B. subtilis</i> , <i>Epr</i>	Cutinase	<i>F. solani pisi</i>	<i>B. subtilis</i> TEB1030	4.67 [U/mL]	1/173	Brockmeier et al., 2006
MAKPLSKGGILVKKVLIAGA VGTAVLFGTLSSGIPGLPAADAQVAKA	<i>B. subtilis</i> , <i>YncM</i>	Aminopeptidase	<i>B. subtilis</i> Zj016	<i>B. subtilis</i> WB600	88.59 [U/mL]	1/20	Guan et al., 2016
MKKFNFKTMLLLVLASCVFGWV VNVTTSLGPQTAITAQA	<i>L.</i> <i>plantarum</i> WCFS1	NucA (nuclease)	<i>S. aureus</i>	<i>L. plantarum</i> WCFS1	35.84 [U/mL]	1/78	Mathiesen et al., 2009
MKEVRFWGLLLGL FVCLGAVIPLVSKA	<i>L.</i> <i>plantarum</i> WCFS1	AmyA (amylase)	<i>L.</i> <i>amylovorus</i> NRRL B-4549	<i>L. plantarum</i> WCFS1	3.4 [10 ² mU/mL]	1/18	Mathiesen et al., 2009
MQINRRGFLKA TAGLATIGAASMFMPKANA	<i>C.</i> <i>glutamicum</i> R	AmyE (α -amylase)	<i>G.</i> <i>stearothermophilus</i>	<i>C. glutamicum</i>	288.3 [U/mL]	1/31	Watanabe et al., 2009
MRSKKLWISLLF ALTLIFTMAFSNMSA	<i>B.</i> <i>licheniformis</i> WX-02, <i>AprE</i>	Nattokinase	<i>B. subtilis</i> <i>natto</i>	<i>B. licheniformis</i> Δ OF-3	31.99 [FU/mL]	1/81	Cai et al., 2016
MKNMSCKLWSVTL FFSFLTIGPLAHA	<i>B. subtilis</i> , <i>Epr</i>	Cutinase	<i>F. solani pisi</i>	<i>C. glutamicum</i>	13.1 [U/mL]	1/64	Hemmerich et al., 2016
MKKFPKLLPIAVL SSIAFSSLASGSVPEASA	<i>B. subtilis</i> , <i>PhoB</i>	XynBYG (alkaline active xylanase)	<i>B. pumilus</i> BYG	<i>B. subtilis</i> WB700	327.2 [U/mL]	1/138	Zhang et al., 2016
MRSKKLWISLLFAL TLIFTMAFSNMSVQA	<i>B. subtilis</i> 168, <i>AprE</i>	Alkaline protease	<i>B.</i> <i>alcalophilus</i> TCCC11004	<i>B. subtilis</i> WB600	7574.08 [U/mL]	1/35	Our lab
MRIFKKA V F V I M I SFLIATVNVNTAHA	<i>B. subtilis</i> 168, <i>DacB</i>	Alkaline protease	<i>B.</i> <i>alcalophilus</i> TCCC11004	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> 111018	19835.7 [U/mL]	1/86	Our lab

Proteínas Periplasmáticas

- Choque osmótico
- Extração :
 - *Neu e Heppel (1965), J. Biol. Chem. 340: 3685-92.*



SDS-PAGE

Métodos de extração de proteínas periplasmáticas

Para quê extrair?

- Cold Osmotic Shock (COS) (Neu e Heppel, 1965)
 - Baseia-se na desestabilização do envoltório (M. externa) – uso de EDTA (1 mM), sacarose (20%) e lisozima (500 ug/mL)
 - Trabalhoso
 - Grandes quantidades de culturas
- Extração por clorofórmio (Ames et al. 1982)
 - Pequenos volumes de cultura
 - Quantitativo
- Congelamento e descongelamento (Paoletti et al, 1990)

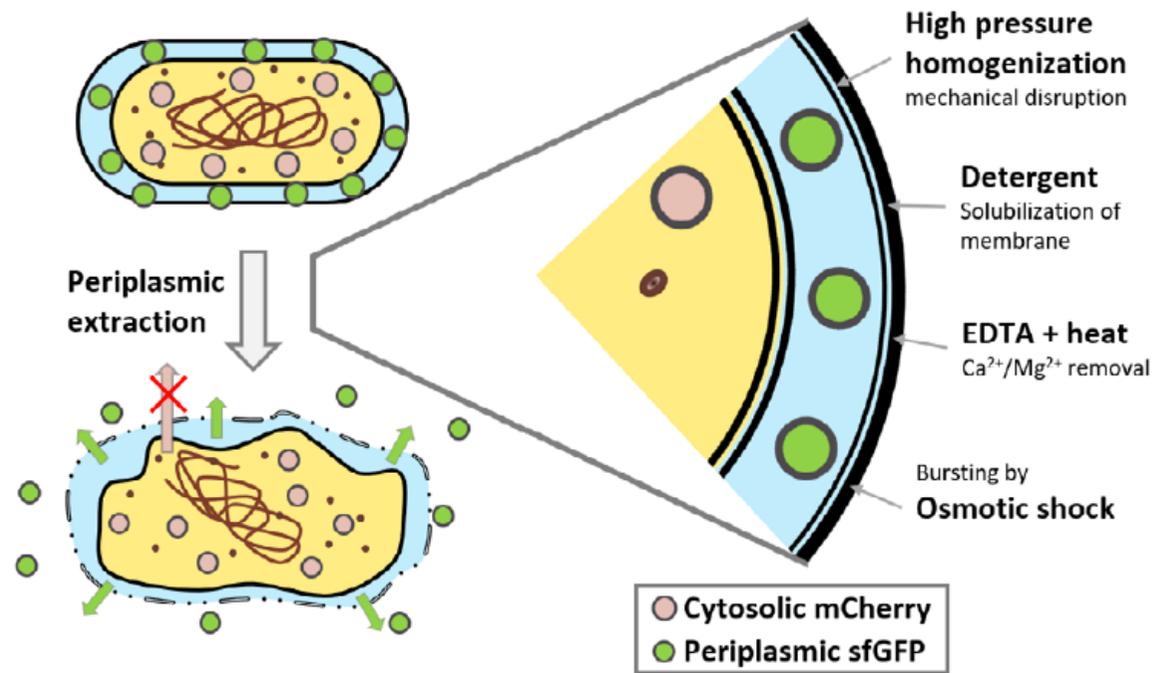
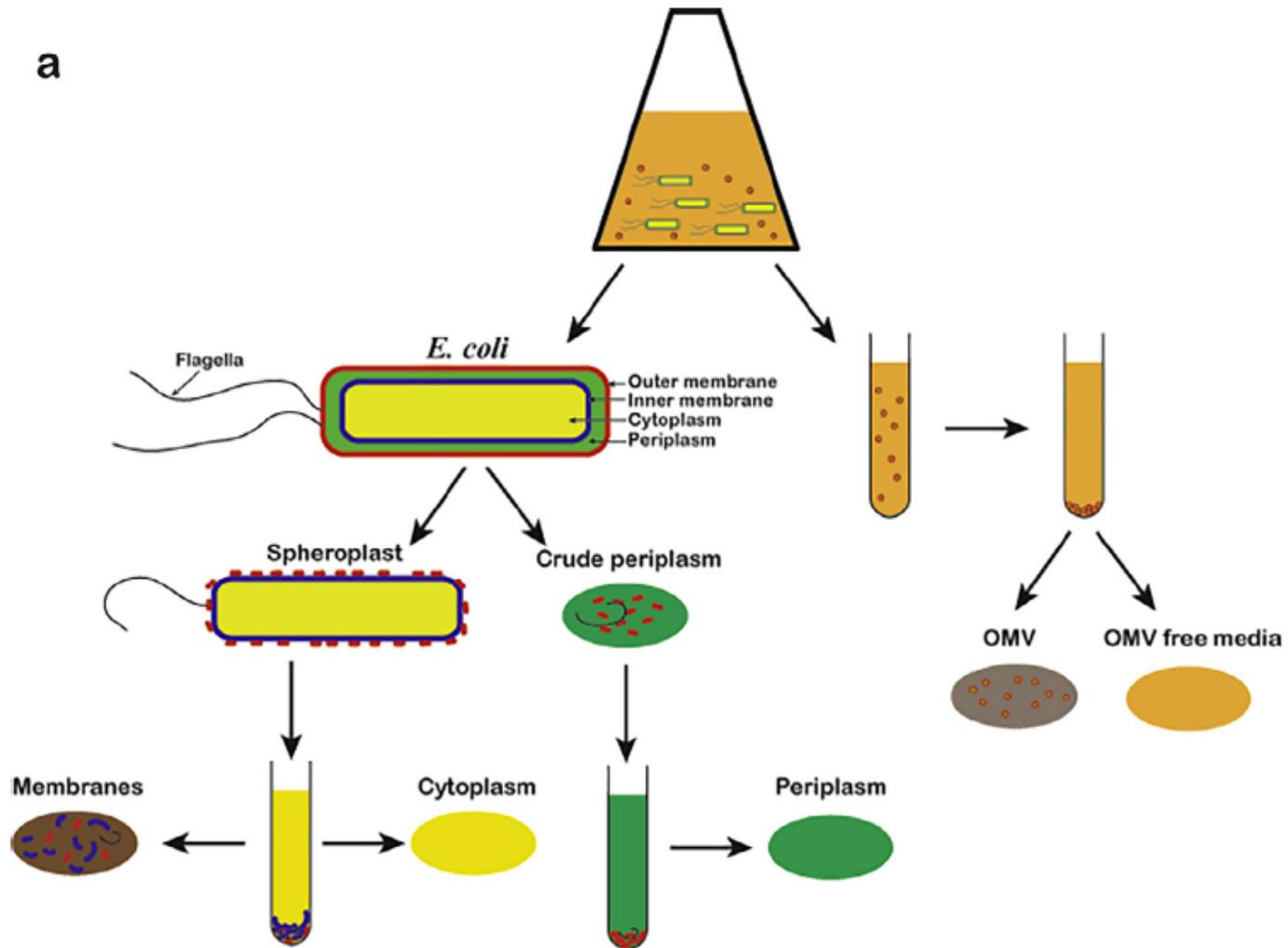
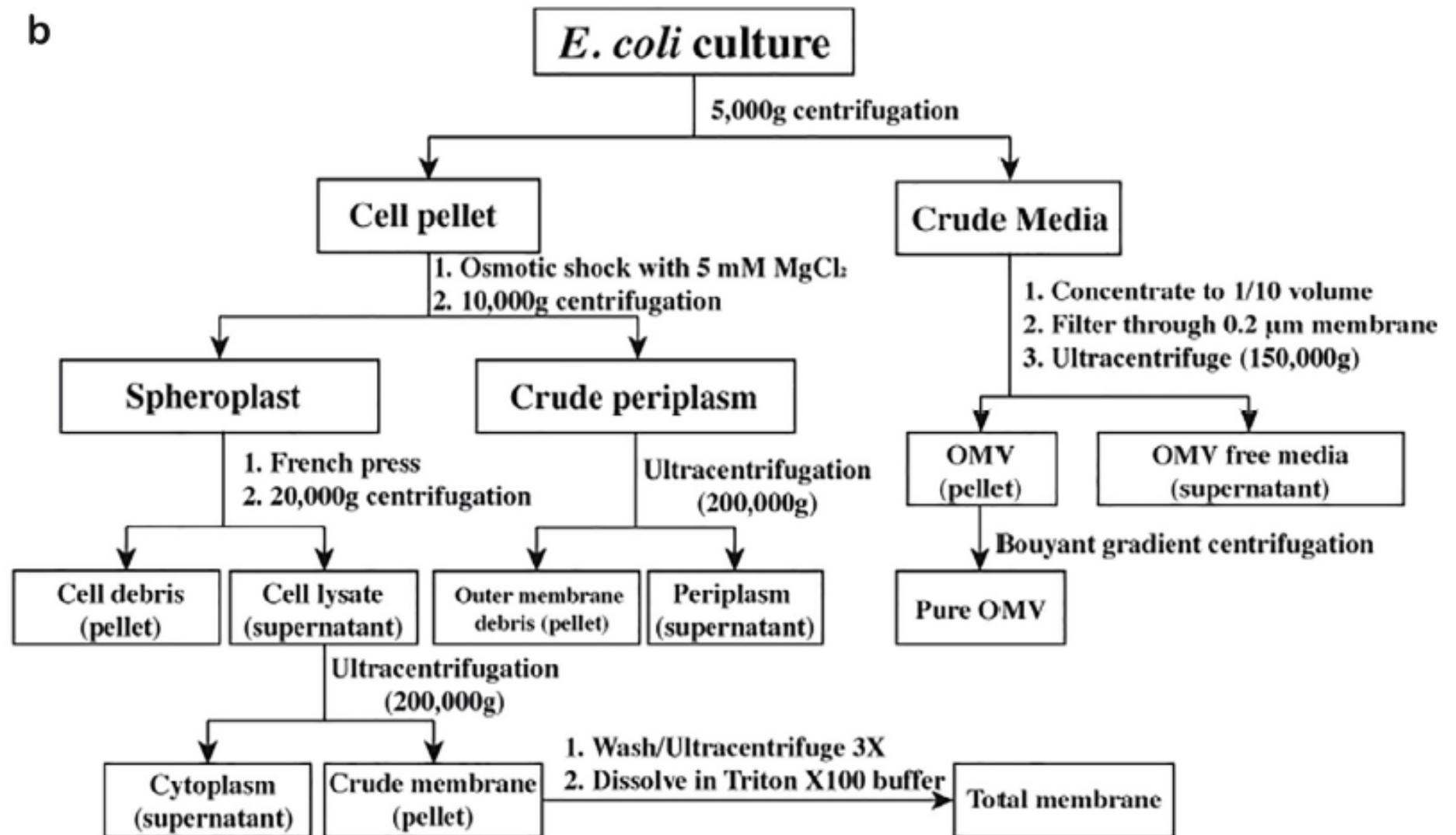


FIGURE 2 Schematic representation of methods for potential selective periplasmic protein extraction, including their action principles

a



b



O método de extração com clorofórmio tem se mostrado o mais eficiente mas a eficiência depende do microrganismo

TABLE 1

RELATIVE QUANTITY OF PERIPLASMIC PROTEINS EXTRACTED FROM 7 BACTERIA BY 4 EXTRACTION METHODS

Values are o.d. at 595 nm using the Bio-Rad assay

Organisms, source	CHL	COS	RF/T	SF/T
<i>Pseudomonas fragi</i> , ATCC 27363	1.358*	0.674	1.152	1.069
<i>Hafnia alvei</i> , meats	0.433	0.760*	0.393	0.364
<i>Pseudomonas cepacia</i> , meats	0.943*	0.143	0.167	0.374
<i>Escherichia coli</i> , clinical	0.493*	0.265	0.248	0.115
<i>Yersinia enterocolitica</i> , meats	0.383*	0.359	0.158	0.137
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , ATCC 23220	0.143	0.065	0.223*	0.151
<i>Acinetobacter lwoffii</i> , ATCC 15309	0.071	0.093	0.103*	0.064

* Highest value of the 4 methods. CHL, chloroform; COS, cold osmotic shock; RF/T, rapid freeze/thaw; SF/T, slow freeze/thaw.

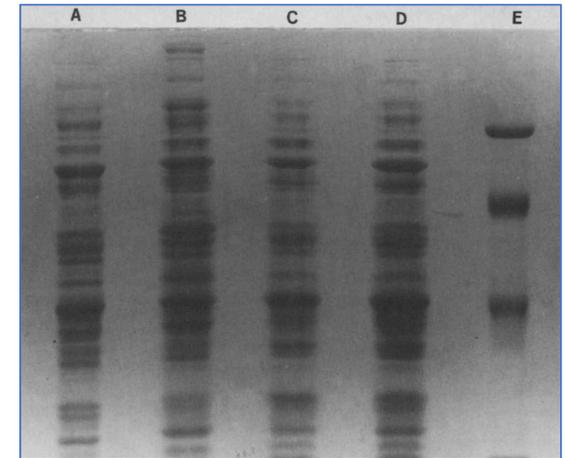


TABLE 1 DNA, endotoxin, total protein content, and purity of extracts

Extraction method	Cyto-Peri-FP system (mCherry/sfGFP)					Cyto-GFPmut3.1 system				Peri-sfGFP system			
	DNA (mg/ml)	Endotoxin (EU/ml)	Tot. Prot. (mg/ml)	Purity mCherry (%)	Purity sfGFP (%)	DNA (mg/ml)	Endotoxin (EU/ml)	Tot. Prot. (mg/ml)	Purity (%)	DNA (mg/ml)	Endotoxin (EU/ml)	Tot. Prot. (mg/ml)	Purity (%)
HPH 700/70 bar, two passages	0.92	5.9E+06	14.6	5	3	0.69	8.4E+06	17.6	39	0.74	3.6E+06	14.2	6
HPH 200/20 bar, 10 passages	0.93	5.3E+06	15.2	5	3	0.79	1.1E+07	20.3	37	0.80	4.4E+06	11.0	6
OS wash	0.14	1.4E+06	1.4	8	6	0.04	2.4E+06	1.2	10	0.13	1.3E+06	2.0	6
OS hypertonic solution	0.05	7.1E+06	4.0	9	4	≤0.03	6.9E+06	2.8	28	0.05	4.0E+06	2.4	5
OS hypotonic solution	≤0.03	6.4E+05	2.9	11	4	0.05	3.8E+06	12.2	65	≤0.03	8.7E+05	2.4	5
10 mM EDTA, 60°C, 2 hr	0.18	2.9E+06	3.6	20	10	0.08	8.4E+06	7.6	61 ^a	0.23	1.7E+06	2.8	12
0.15% DOC, 7 hr	0.17	1.4E+05	7.2	9	11 ^b	0.05	5.5E+05	9.6	73	0.08	1.8E+05	7.7	12

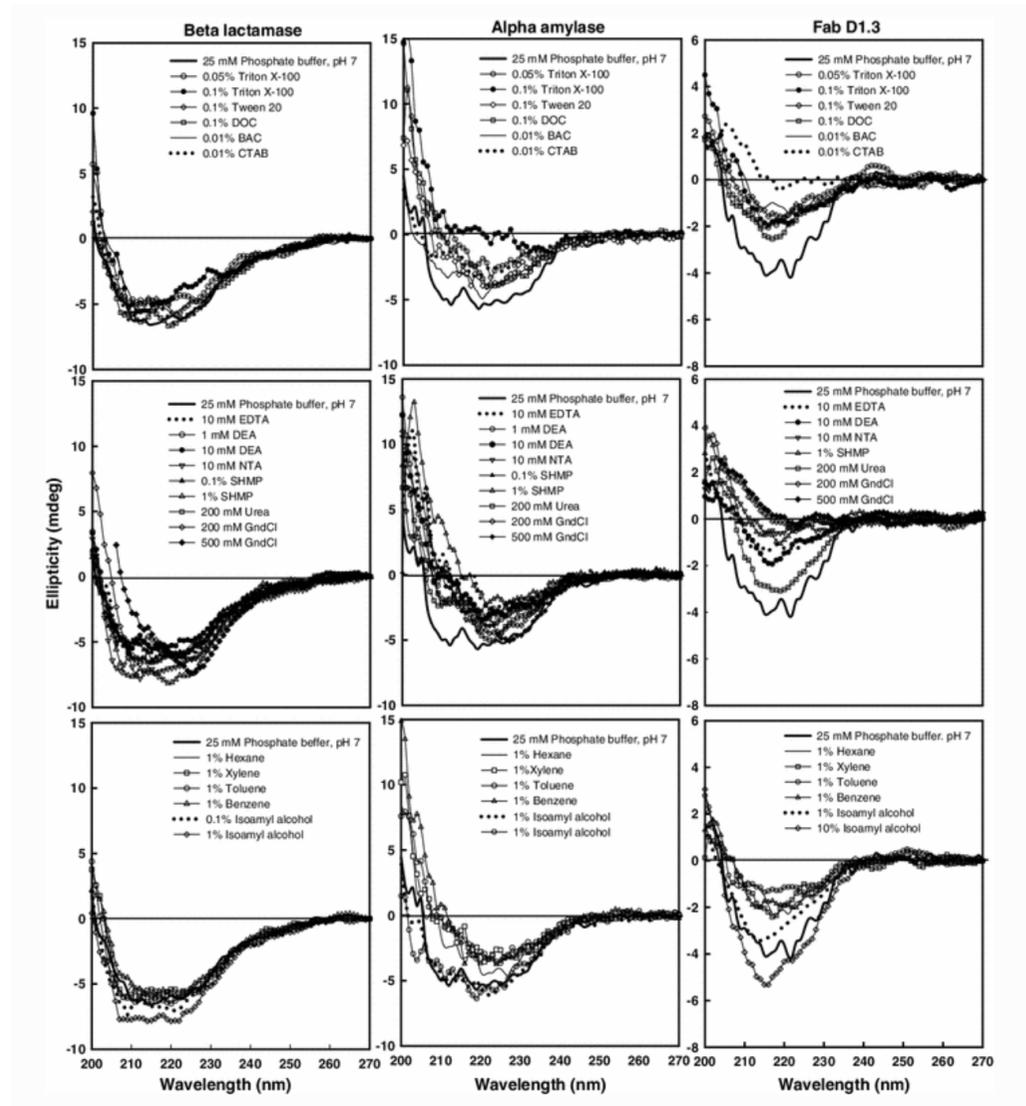
Note: Purity is calculated based on the ratio of protein of interest and total protein.

Abbreviations: DOC, deoxycholate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPH, high-pressure homogenization; OS, osmotic shock.

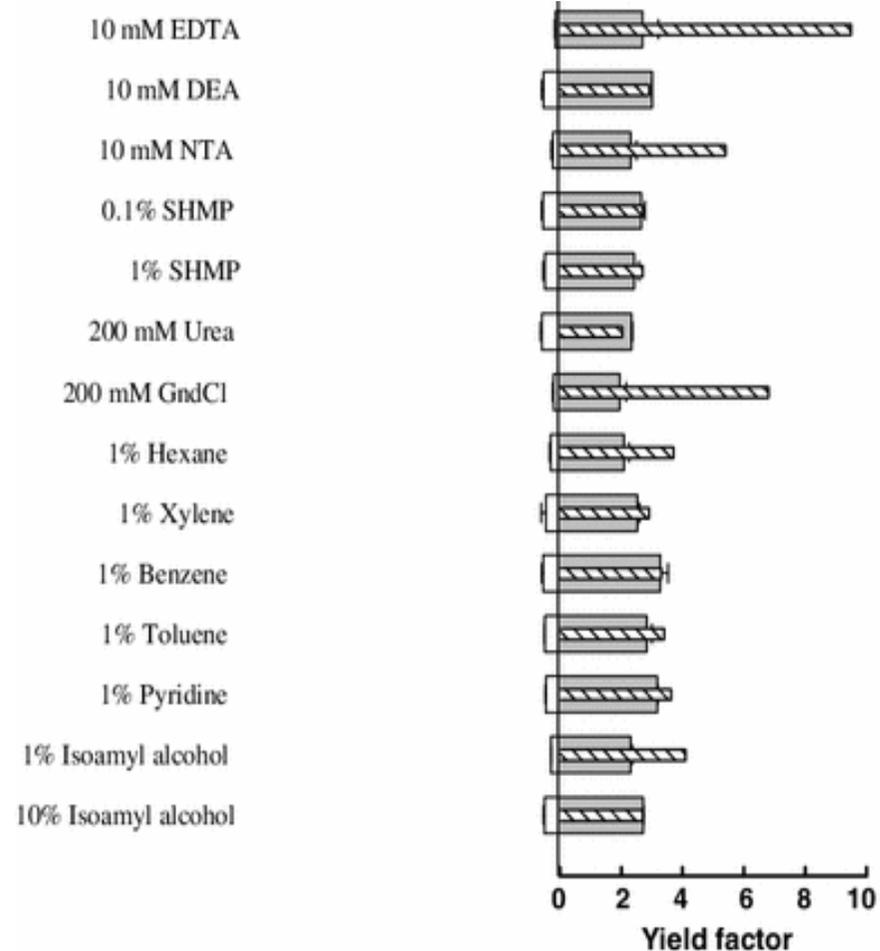
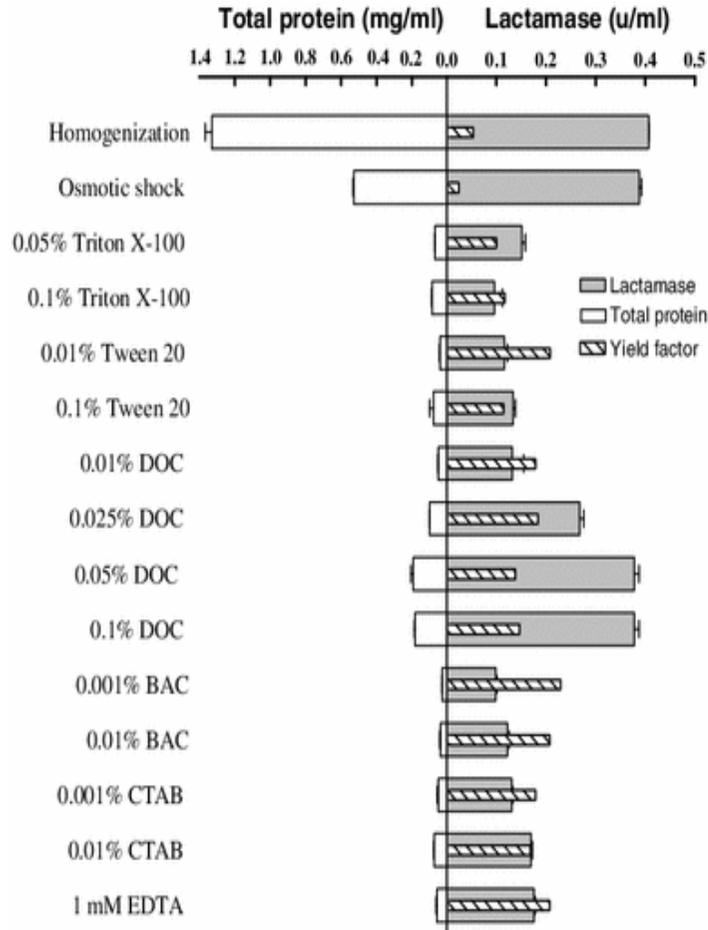
^aAfter 30 min, we observed full extraction with a purity of 95%; however, after 2 hr of EDTA/heat treatment, the fluorescence signal decreased.

^bDue to solubilization of sfGFP from IB, the sfGFP content according to fluorescence was 180%, resulting in a relatively high purity value.

Teste com diferentes aditivos
Avaliação das proteínas por dicroísmo circular



Espectros intrínsecos de CD de proteínas puras (1 mg / ml em tampão de fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0) na presença de vários produtos químicos. Os espectros foram registrados usando uma célula de comprimento de caminho de 0,2 cm e calculados em média em três varreduras



Liberação de Fab D1.3 a partir de células de *E. coli* por homogeneização, choque osmótico e vários produtos químicos feitos em tampão Tris 200 mM pH 7,5. Os resultados são médias de duas medições. O fator de rendimento foi calculado dividindo o rendimento de proteína alvo pelo rendimento de proteína total. O rendimento da proteína alvo e o rendimento total da proteína são relativos ao extração por choque osmótico; as quantidades de proteínas alvo e total recuperados das células bacterianas por choque osmótico foram considerados como 100% alvo e rendimentos totais de proteína, respectivamente

Extração de proteínas de *M. tuberculosis*

Table 2
Protein concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) for each strain obtained by different lysis buffer, sonication and bead beat methods.

	<i>M. smegmatis</i> (25 mg)				<i>M. fortuitum</i> (25 mg)	Mtb (25 mg)
	Lbi ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Lb_thUr ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Lb_thUr_DTT ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Lb_thUr_DTT_SDS ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Lb_thUr ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Lb_thUr ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) [Mean \pm SD]
Sonic. 15 min	0.15	0.65				
Sonic. 5 min	0.11	0,63	0,15	0,51		
Bead beat. (v/v)		0,29	0,08	0,16	0.12	
Bead beat. (1/2)		0,53			0,91	
Bead beat. (1/3)		0,81			1.17	
Sonic. 5 min followed by bead beat. (1/3)						1.42 \pm 0.14

Lbi = Lysis buffer initial; Lb_thUr = Lysis buffer (thio) urea (combination of thiourea and urea); Lb_thUr_DTT = Lysis buffer (thio) urea with DTT; Lb_thUr_DTT_SDS = Lysis buffer (thio) urea with DTT and SDS.

The highest protein extraction yeilds obtained for each strain after experiments are indicated in bold.

Liberação de proteínas de membrana e associadas

Uso de detergentes, zwitterionicos, aniônicos e outros

Uso de agentes caotrópicos

Butanol, etanol,

Cloreto de guanidina, Mg^{2+}

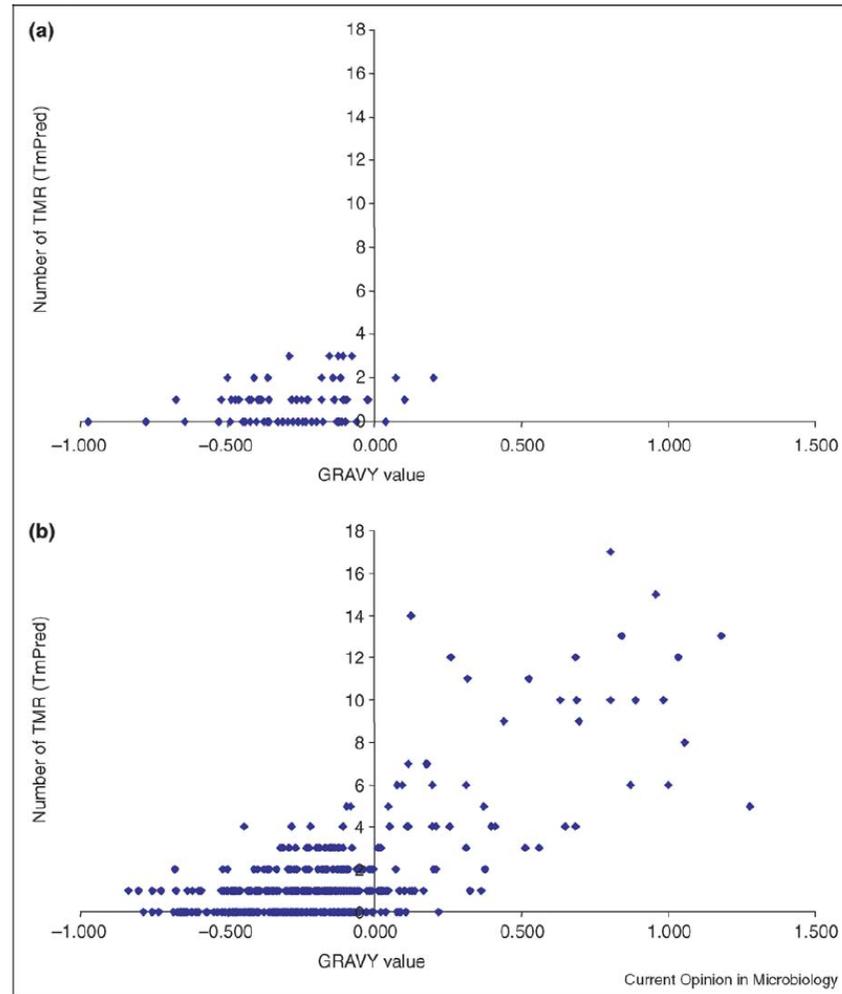
Acetato de lítio

fenol, propanol, entre outros

Proteínas de membrana – ultracentrifugação

avaliar o GRAVY (índice de hidrofobicidade) – negativo são melhores para isolamento

uso de detergentes fortes



Comparison of (a) 2-DE and (b) 2-DLC-MS/MS for the identification of integral membrane proteins. Protein identifications generated from *Campylobacter jejuni* (S Cordwell, in preparation) showing predicted GRAVY value and number of TMRs.

Separação de Vesículas de Membrana Externa (OMVs)

