

CCM121- Biologia II

Aula Prática – Indução da expressão de proteína recombinante em *E. Coli*

A bactéria *Escherichia coli* é o organismo modelo e o principal usado para a expressão de proteínas recombinantes. Para isso, o gene da proteína de interesse é clonado em um vetor plasmidial, que é utilizado para transformar uma cepa apropriada de *E. coli*, no nosso caso, a cepa BL21. Hoje, vamos induzir a expressão da proteína Rrp47 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e verificar a produção da proteína recombinante pela bactéria.

1. No dia anterior, uma colônia de BL21/pET-RRP47 foi pré-inoculada em 5mL de meio LB-Kan e incubada por 14-18 horas a 37°C e 200rpm;
2. 2 horas antes da aula, 100µL da pré-cultura foi usada para fazer um inóculo em 5mL de meio LB-Kan.
3. No início da aula, medir a DO₆₀₀ da cultura. Caso esteja entre 0,5-1,0, passe para os passos abaixo. Em caso negativo, continue a incubação por mais tempo (lembrando que culturas de *E. coli* em fase exponencial de crescimento dobram em cerca de 40 minutos).;
4. No tempo 0 (após o inóculo atingir a DO desejada), coletar 0,5 mL da cultura, centrifugar a 6000 rpm por 2 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 200µL de tampão de amostra ao pellet. Suspender as bactérias vigorosamente no vórtex, congelar;
5. No restante da cultura, adicionar IPTG para concentração final de 0,1 ou 1 mM, e incubá-las a 37°C por 2 horas, 200 rpm;
6. Após esse período, retirar 0,5 mL do meio, centrifugar a 6000 rpm por 2 minutos, descartar o sobrenadante, e adicionar 200 µL de tampão de amostra. As amostras devem ser armazenadas a -20°C.

Verificação da expressão da proteína recombinante

7. Incubar as amostras dos passos 4 (**tempo 0**) e 6 (**tempo 2 horas**) a 95°C por 5 min. Centrifugar.
8. Um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% estará previamente montado pelas técnicas do LBBM. Nele, serão aplicadas as amostras do tempo 0 e 2h de indução, juntamente com o marcador de peso molecular nos volumes abaixo:
 - T0 - aplicar no gel: 40 uL
 - T 2h - aplicar no gel: 30 uL
9. Correr o gel por 40 minutos, a 180-200V, até o tampão de amostra estar próximo do final do gel.
10. Desmontar o sistema com cuidado, retirando o gel de empilhamento. Colocar o gel na solução de coloração (azul de Coomassie), incubar por 15 minutos.
11. Retirar o corante e lavar bem o gel em água corrente. Acrescentar água, aquecer 30 seg no micro-ondas e trocar a água. Repetir a operação até descorar completamente o gel e as bandas ficarem visíveis.

Utilizar luvas para manipulação do gel de poliacrilamida.

Os monômeros de acrilamida são neurotóxicos, portanto, evite aspirar ou deixar cair na pele. Caso isto ocorra, lave imediatamente, com bastante água e sabão. O polímero (poliacrilamida) é inócuo/atóxico.

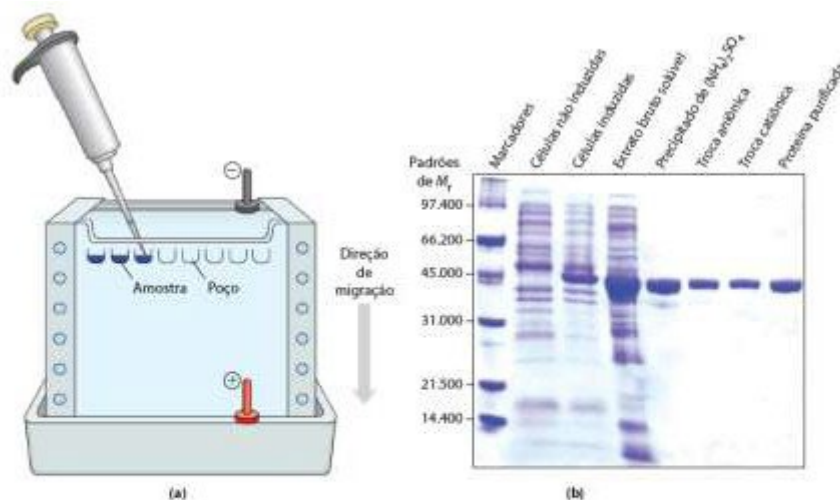


FIGURA 3-18. Eletroforese. (a) Diferentes amostras são colocadas em poços ou depressões no topo do gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas se movem para o gel quando um campo elétrico é aplicado. O gel minimiza as correntes de convecção causadas pelos pequenos gradientes de temperatura, bem como movimentos proteicos além daqueles induzidos pelo campo elétrico. (b) Proteínas podem ser visualizadas após eletroforese tratando o gel com um corante como o azul Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si. Cada banda no gel representa uma proteína diferente (ou subunidade de proteína); proteínas menores se movem através do gel mais rapidamente que as maiores e, portanto, são encontradas mais

próximas da base do gel. Esse gel ilustra a purificação da proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita no Capítulo 25). O gene para a proteína RecA foi clonado (Capítulo 9) para que sua expressão (síntese da proteína) pudesse ser controlada. A primeira canaleta mostra um conjunto de proteínas padrão (de M_r conhecido), servindo como marcadores de massa molecular. As duas canaletas seguintes mostram proteínas de células de *E. coli* antes e depois que a síntese da proteína RecA foi induzida. A quarta canaleta mostra as proteínas presentes após sucessivas etapas de purificação. A proteína purificada é uma cadeia polipeptídica única (M_r 38.000), como mostrado na canaleta mais à direita.

SDS-PAGE

O gel para eletroforese é constituído de um polímero de acrilamida. A polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados por persulfato de amônio e estabilizados por TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). A polimerização também depende da presença de um agente bifuncional N,N'-methylenebisacrylamida tornando as cadeias ligadas entre si formando o gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas. O sistema de eletroforese que será utilizado é denominado descontínuo. São utilizados dois tipos de gel, um denominado gel de empilhamento e outro denominado gel de corrida, que são polimerizados um sobre o outro. A função do gel de empilhamento é de concentrar amostras com grande volume, resultando em uma melhor definição e resolução da separação das moléculas no gel de corrida.

