

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL**

LUIZ FERNANDO DUARTE DA SILVA

**DESENHO E SÍNTESE ARTIFICIAL DE UM VETOR PARA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**

SÃO GABRIEL

2016

LUIZ FERNANDO DUARTE DA SILVA

**DESENHO E SÍNTESE ARTIFICIAL DE UM VETOR PARA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa - Unipampa, *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

SÃO GABRIEL

2016

LUIZ FERNANDO DUARTE DA SILVA

**DESENHO E SÍNTESE ARTIFICIAL DE UM VETOR PARA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**


Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa -
Unipampa, *Campus* São Gabriel, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 02 de dezembro de 2016

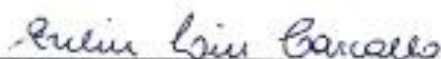
Banca examinadora:



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
UNIPAMPA



Dr.ª Adriana Koslovski Sassi
UNIPAMPA



M. Sc. Evelise Leis Carvalho
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz e Teresa e meu irmão Oberdan, obrigado pelo apoio incondicional durante todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Luiz Lima e Teresa Duarte não tenho palavras para descrever o amor que sinto por vocês. Jamais me esquecerei do que vocês repetiram inúmeras vezes, que o estudo seria a única herança herdada por mim e meu irmão e deveríamos batalhar e nunca desistir, para aproveitar-mos hoje as oportunidades que vocês não tiveram. Por mais difícil que a vida se apresente eu sei que vocês sempre estarão ao meu lado. Obrigado por tudo!

A meu irmão Oberdan Duarte por sempre me escutar quando preciso, brigar quando necessário e mais do que nunca me incentivar como ninguém. Obrigado mano por sempre me aconselhar, nunca deixar a peteca cair e sempre me fazer erguer a cabeça e seguir em frente.

Ao meu orientador Paulo Marcos Pinto, não tenho palavras para descrever a pessoa sensacional que és, caráter e índole inquestionável. Obrigado por sempre acreditar em mim mesmo nos momentos em que nem mesmo eu acreditava. Tenho orgulho de dizer que fui orientado por ti e mais do que orientador hoje tenho um amigo que levarei para a vida.

A minha primeira e única Co-orientadora da graduação Evelise Leis Carvalho a gurua da segunda capital farroupilha, jamais me esquecerei das festas surpresas, junções e risadas compartilhados durante esse tempo. Obrigado por todos os conselhos, como tu mesma diz “Luix tu é capaz, apenas não acredita em ti mesmo”.

A minha mãezona gabrielense tia Mara, não tenho palavras para lhe agradecer por todo o carinho e amor compartilhados. Sem dúvidas sentirei muita falta de todos nossos momentos. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos, irmãos e amantes que levarei da graduação para a vida Alexandre Freitas e José Victor Braga, o trio infalível a turma do Agile o gordo e os magro. São tantas histórias e momentos vividos juntos durante esse tempo que me faltam palavras para descreve-lós. Obrigado por tudo gurizada, vocês são os irmãos que a vida me deu.

As minhas amigas Tuane Bucker e Fernanda Cabral, por todos os momentos de festas, risadas e choros vividos e compartilhados juntos. Agradeço a minha parceira de todas as horas Stefânia Garcia por todos os momentos e loucuras vivenciados. Obrigado por tudo gurias!

As minhas colegas da turma 16 Nayara, Mirelle, Mariele, Bruna, Clariane e Julia Perdomo sem vocês a caminhada teria sido muito mais árdua. Agradeço em especial a Ananda Azambuja e Giane Borges pela amizade desde o primeiro minuto de aula. Como escutei uma vez “é por acaso que as pessoas entram em nossas vidas mas não é por acaso que elas permanecem”.

Aos colegas de laboratório pela formação do bonde do LPA Darlene, Pablo, Thalita, Bruno, Evelise, Filipe e Lais por todos os momentos de amizade e companheirismo compartilhados durante todo esse tempo.

“Eu não vim até aqui pra desistir agora...”

(Humberto Gessinger)

RESUMO

Até meados de 1970 o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado e caracterizado. A clonagem veio a permitir um novo olhar para a análise desta biomolécula. A expressão heteróloga de proteínas é extremamente importante para o campo da biotecnologia. O hospedeiro mais comumente utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, por apresentar diversas vantagens como crescimento rápido e eficiente e seu custo ser extremamente barato. Diversos são os vetores utilizados para expressão de proteínas como por exemplo plasmídeos, fagos, cosmídeos e vírus. Os plasmídeos são os vetores mais utilizados para a tecnologia do DNA recombinante pois apresentam um sítio múltiplo de clonagem, além de um marcador de seletividade que é um gene de resistência a antibiótico. Este trabalho teve como objetivo realizar o desenho e construção *in silico* de um vetor para expressão heteróloga de proteínas que não necessite de subclonagens futuras. Para isto procedeu-se para o desenho racional apresentando algumas regiões de interesse e posteriormente foi sintetizado pela *IDT Technologies* e apresenta um tamanho de 852 pares de bases. O plasmídeo utilizado foi o pUC19, qual apresenta um tamanho de 2.686 pares de bases. Bactérias *E. coli* DH5 α foram transformadas com pUC19 e posteriormente foi realizado a extração do plasmídeo e clivagem com a enzima *BamHI*. Como passo seguinte foi realizado um PCR livre de enzimas de restrição contendo as amostras do pUC 19 clivadas e a amostra do PCR do constructo realizado anteriormente. Após o PCR de fusão, bactérias *E. coli* DH5 α foram então eletroporadas com o PCR de fusão e realizada a extração. A amostra obtida foi então clivada com a enzima *BamHI* e aplicada em gel de agarose 1%. Logo após estes procedimentos podemos confirmar a clonagem do constructo, apresentando o tamanho esperado da sua fusão com o plasmídeo, apresentando assim um tamanho final de 3.487 pares de bases. Os resultados deste trabalho possibilitaram o desenvolvimento de um novo sistema para a expressão e purificação de proteínas.

Palavras chaves: constructo, expressão de proteínas, vetores de clonagem

ABSTRACT

Until the mid-1970s DNA was the most difficult cellular component to be analyzed and characterized. The cloning allowed a new look at the analysis of this biomolecule. The heterologous expression of proteins is extremely important for the field of biotechnology. The most commonly used host is the bacterium *Escherichia coli*, because it has several advantages such as rapid and efficient growth and its cost is extremely cheap. A number of vectors are used for expression of proteins such as plasmids, phages, cosmids, and viruses. Plasmids are the most commonly used vectors for recombinant DNA technology because it has a multiple cloning site as well as a selectivity marker which is an antibiotic resistance gene. The objective of this work was to design and construct a vector *in house* for heterologous expression of related proteins that does not require future subcloning. For this we proceeded to the rational design presenting some regions of interest and it was later synthesized by *IDT Technologies* and has a size of 852 base pairs. The plasmid used was pUC19 of which it had a size of 2668 base pairs. *E. coli* DH5 α bacteria were transformed with pUC19 and subsequently the plasmid extraction and cleavage with the *Bam*HI enzyme was performed. As a next step a free restriction enzyme PCR was performed containing the cleaved pUC 19 samples and the PCR sample from the above construct. After fusion PCR, *E. coli* DH5 α bacteria were then electroporated with the fusion PCR and extraction was performed. The obtained sample was then cleaved with the *Bam*HI enzyme and applied on 1% agarose gel. Soon after these procedures we can confirm the cloning of the construct, showing the expected size of its fusion with the plasmid thus presenting a final size of 3.487 base pairs. The results of this work enabled the development of a new system for the expression and purification of proteins.

Keywords: construct, expression of proteins, cloning vectors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem demonstrativa do plasmídeo pUC 19.....	14
Figura 2 - Desenho racional <i>in silico</i> do constructo.....	24
Figura 3 – Reação em cadeia da polimerase do constructo.....	26
Figura 4 – Extração e clivagem do plasmídeo pUC19.....	28
Figura 5 – Reação em cadeia da polimerase livre de enzimas de restrição.....	29
Figura 6 – Visualização das amostras extraídas após a eletroporação.....	30
Figura 7 – Comprovação da clonagem do constructo.....	31

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

μl – Microlitros

% – Por cento

°C – Graus Celsius

BamHI – Enzima de restrição isolada de *Bacillus amyloliquefaciens*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* ou Ácido desoxirribonucleico

DMSO (dimetilsulfóxido)

Dntp (desoxirribonucleotídeo fosfatado)

EcoRI – Enzima de restrição isolada de cepas de *Escherichia coli*

Hind III – Enzima de restrição isolada de *Haemophilus influenzae*

LB – Meio de cultura Luria Bertani

min – Minuto(s)

mL – Mililitro

pb – Pares de bases

PCR – Polymerase in Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Vetores de expressão.....	15
1.2 Expressão heteróloga de proteínas.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO.....	19
3.1 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Desenho racional <i>in silico</i> do constructo.....	20
4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) do constructo.....	20
4.3 Transformação bacteriana.....	20
4.4 Extração do DNA plasmidial.....	21
4.5 Clivagem do plasmídeo com a enzima de restrição <i>BamHI</i>	21
4.6 PCR livre de enzimas de restrição.....	22
4.7 Eletroporação bacteriana.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Desenho racional <i>in silico</i> do constructo.....	24
5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) do constructo.....	26
5.3 Transformação bacteriana, extração e clivagem do DNA plasmidial.....	27
5.4 PCR livre de enzimas de restrição.....	29
5.5 Eletroporação bacteriana.....	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A célula pode ser definida como a menor parte de um organismo vivo capaz de desenvolver de forma autônoma as funções básicas como reprodução e crescimento (ALBERTS. *et al.*, 1994). O ácido desoxirribonucleico (DNA) é o material genético de todas as células vivas. Até meados da década de 1970 era o componente celular mais difícil de ser analisado através de técnicas moleculares que levassem a sua caracterização química funcional nos organismos vivos (STRYER, 1988).

Logo após o final da década de 70, diversas foram as tecnologias que surgiram nos campos da microbiologia, bioquímica, genética microbiana e biotecnologia que permitiram o isolamento, clonagem e purificação de determinados genes específicos (ZAHA. *et al.*, 1996).

Procedimentos que estabeleçam a expressão e purificação de proteínas tornaram-se desafiadores para o campo da biotecnologia (CABRITA; DAI; BOTTOMLEY, 2006). A clonagem gênica permitiu um novo enfoque na análise do DNA, fazendo com que as dificuldades encontradas diminuíssem muito, tornando esta molécula de fácil análise (CARUSO, 2007).

A expressão heteróloga de proteínas em bactérias é utilizada para uma gama de aplicações biotecnológicas, principalmente para a utilização industrial (KIM, J. *et al.*, 2016). A escolha da linhagem bacteriana para a síntese de proteínas é importante para dar início a todo o processo. A partir daí se define toda a tecnologia necessária, sejam elas técnicas moleculares, reagentes e diferentes equipamentos que virão a serem utilizados em todo o processo. Entre os microrganismos, diversos são os sistemas que estão disponíveis, desde bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais comumente utilizado para estudos de expressão de proteínas por possuir diversas vantagens (KIM, J. *et al.*, 2016). Os recentes progressos na compreensão básica da transcrição, tradução e enovelamento de proteínas em *E. coli* juntamente com a disponibilidade de ferramentas genéticas tornou esta bactéria extremamente utilizada para a expressão de proteínas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009)

As vantagens apresentadas para a utilização de *E. coli* como um organismo hospedeiro são amplamente conhecidas pela comunidade científica (ROSANO;

CECCARELLI, 2014). Possui crescimento bastante eficiente, seu tempo de duplicação em condições ambientais ótimas é rápido, isso significa que uma cultura pode chegar na fase estacionária em poucas horas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). E principalmente que o DNA exógeno pode ser introduzido através de um simples método de transformação (KIM, J. *et al.*, 2016). No entanto, a expressão de uma proteína recombinante pode acabar conferindo uma carga metabólica sobre o microrganismo, causando assim uma considerável diminuição no tempo de geração (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Esta bactéria pode não expressar proteínas muito grandes ou que requerem modificações pós-traducionais, para estes casos geralmente se utiliza linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (DEMAIN; VAISHNAV, 2009a).

Um vetor de expressão procarioto bem conhecido contém um conjunto de elementos genéticos bem caracterizados e estes afetam tanto aspectos transcricionais e traducionais na produção de proteínas (HANNIG; MAKRIDES, 1998). Os plasmídeos de expressão devem possuir um promotor forte, uma origem de replicação (OR) reconhecida pela bactéria hospedeira, um sítio de múltipla clonagem, marcador genético (MG) que geralmente é um gene que confere resistência a ampicilina, além de outras sequências que sejam importantes para uma expressão heteróloga bem sucedida (MIYAMOTO, 2013). A presença de um gene que confere resistência a algum antibiótico facilita a seleção fenotípica (HANNIG; MAKRIDES, 1998).

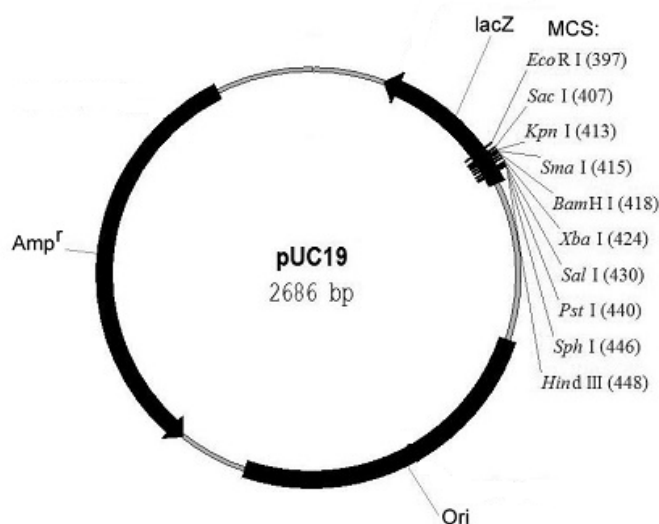
Uma série de elementos centrais são essenciais para os sistemas de expressão de proteínas geralmente a expressão ocorre utilizando plasmídeos de expressão. Estes sistemas de expressão baseados na utilização de plasmídeos ainda não são amplamente distribuídos (ROSANO; CECCARELLI, 2014) (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Os vetores de clonagem são elementos gênicos de replicação independente e são geralmente utilizados para possibilitar a inserção de uma sequência de nucleotídeos de interesse no interior de uma célula hospedeira. Com a utilização de enzimas de restrição e da DNA ligase, entre outros artifícios moleculares, possibilita clivar o vetor de clonagem em sítios específicos de restrição e posteriormente ligar ao gene de interesse, visando a aquisição de uma nova característica. Existe uma gama de vetores de clonagem, dentre eles os plasmídeos (SHOCK, 2015).

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA encontradas nas bactérias ou em leveduras, e podem ser considerados parasitas moleculares. Eles possuem um tamanho que varia de poucos milhares a mais de cem mil pares de bases (pb), fazem uso

da maquinaria celular para a sua replicação e expressão gênica (MIYAMOTO, 2013). Os plasmídeos para expressão mais utilizados nos dias atuais são resultado de diversas combinações de promotores, marcadores de seleção, sítios múltiplos de clonagem, além de estratégias de remoção de proteínas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Os principais plasmídeos de expressão utilizam os promotores *Lac*, *Tac* e *T7* (MIYAMOTO, 2013).

Para impedir o possível crescimento de células livres de plasmídeo, se utiliza um marcador de resistência adicionado ao plasmídeo. Em sistemas *E. coli*, os genes que conferem resistência a antibióticos são habitualmente utilizados para este fim. A resistência a ampicilina é conferida graças ao gene *bla*, o qual inativa o anel β -lactâmico periplasmático dos antibióticos β -lactâmicos (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A utilização de antibióticos e a resistência aos antibióticos são as principais preocupações com a utilização de culturas bacterianas em larga escala (ROSANO; CECCARELLI, 2014). O plasmídeo pUC19 possui múltiplos sítios de clonagem. Esse plasmídeo tem um tamanho de 2.686 pb e encontra-se presente em um alto número de cópias nas células (ZAHA. *et al.*, 1996).

Fig 1: Plasmídeo pUC19 apresentando um gene de resistência a ampicilina, promotor Lac responsivo a IPTG, origem de replicação e um sítio múltiplo de clonagem chamado de MCS.



Fonte: biosan.com

O sistema de expressão utilizado depende muito da proteína a ser produzida (MIYAMOTO, 2013). A transformação genética possui como papel principal a introdução de um gene específico em uma célula receptora e consequentemente a

expressão gênica, adicionando à célula hospedeira uma característica nova KLUG *et al.*, 2010).

Diversos são os sistemas que vem sendo desenvolvidos nos últimos anos para permitir a purificação rápida e eficiente de proteínas recombinantes expressas em bactérias (GUAN; DIXON, 1991).

1.1 VETORES DE EXPRESSÃO

Para a clonagem e expressão de proteínas existe diversos vetores que possuem os elementos genéticos que visam permitir e maximizar a expressão de proteínas recombinantes. Geralmente os vetores mais utilizados são os que permitem a expressão em células bacterianas, sendo estes, vetores de expressão procariotos (MIYAMOTO, 2013). Dentre os vetores mais utilizados na tecnologia do DNA recombinante encontram-se os plasmídeos, fagos, bacteriófagos, cosmídeos e vírus (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003).

Os plasmídeo são moléculas de DNA dupla fita que apresentam um tamanho que varia entre poucos milhares a mais de cem mil pares de bases (pb), os quais possuem em sua maquinaria elementos essenciais para a sua replicação e ao menos um gene que confere resistência a um determinado antibiótico (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Os plasmídeos para a expressão, mais utilizados nos dias de hoje são resultados de variadas combinações, promotores, marcadores de seleção, sítios múltiplos de clonagem e estratégias para a remoção de proteínas de fusão (ROSANO; CECCARELLI, 2014). O PCR livre de enzimas de restrição é utilizado geralmente para vetores circulares, onde é utilizado geralmente plasmídeos. Para este tipo de processo não é a necessidade de introduzir quaisquer pares de bases extra (ENT; LO, 2006). O mecanismo utilizado para extensão pela DNA polimerase, compreende da sobreposição do inserto e vetor para formar o plasmídeo completo. Neste mecanismo tanto o inserto como o vetor compartilham sequências sobrepostas em ambas as extremidades. Logo após os passos da PCR ambos irão se hibridizar e usando um ao outro para formar o novo plasmídeo (QUAN; TIAN, 2009).

Outro vetor, amplamente utilizados para os procedimentos de clonagem molecular é conhecido como bacteriófago λ , o qual é tido como o principal vírus da bactéria *E. coli* podendo se comportar como um parasita na bactéria (NASCIMENTO;

MARIA; ROSSI, 2003). Logo após injetar o seu DNA na bactéria o genoma do fago pode seguir duas vias principais a de estado lítico, o qual permanece na bactéria como uma molécula independente, onde o cromossomo do fago é replicado e em cerca de, 45 minutos a célula hospedeira é lisada liberando assim cerca de 100 novos fagos. A segunda via é a do estado lisogênico, neste caso o DNA do fago é integrado junto ao cromossomo da bactéria, passando a ser chamado de profago (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). A bactéria multiplica-se levando consigo o profago de forma passiva e distribuído para as suas descendentes. As opções entre seguir no estado lítico ou lisogênico depende do meio do qual encontra-se a bactéria além de fatores genéticos da bactéria hospedeira e do bacteriófago (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003).

Os cosmídeos outro tipo de vetor baseado em λ são os cosmídeos, que são o resultado da hibridização de um DNA de um fago e um plasmídeo bacteriano (MOREIRA; MENDES, 1998). Eles recebem esta denominação pelo fato das enzimas responsáveis pela ligação do DNA à membrana proteica precisarem de apenas sítios *cos* para funcionarem, ou seja, um cosmídeo é um plasmídeo que possui um local *cos* (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Podem ser usados para clonagem molecular utilizando sistemas de empacotamento *in vitro* onde é reconstituída a estrutura do fago e assim utilizado para infectar a célula hospedeira (MOREIRA; MENDES, 1998). Os cosmídeos necessitam de um marcador de seleção tal como o gene de resistência a ampicilina, além de uma origem de replicação plasmidial (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Desta forma as colônias transformadas com cosmídeos são selecionadas da mesma forma que células transformadas com plasmídeos, utilizando marcadores de seleção (MOREIRA; MENDES, 1998).

Os vírus é outro tipo de vetor utilizado (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Inicialmente o vírus SV40 foi isolado de células tumorais de macacos e foi um dos primeiros e extensivamente utilizado sistema viral para introduzir genes agora em células eucarióticas (MOREIRA; MENDES, 1998). Este vírus apresenta um tamanho de cerca de 5.200 pares de bases (pb) e é dividido em duas regiões; a precoce e tardia, quanto à expressão gênica viral (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Inicialmente, a região precoce é expressa no ciclo lítico e a expressão dos genes presentes na região tardia vem a ocorrer logo no início da replicação do DNA viral, entre as duas regiões encontra-se a origem de replicação do DNA viral (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Um dos responsáveis pela transformação maligna das células nas quais o vírus não completou a sua replicação é um produto

oriundo da expressão da região precoce chamado de antígeno T e também é responsável pelo início da replicação em células permissíveis. Os produtos obtidos da expressão e codificados pela região tardia correspondem às proteínas de formação do capsídeo viral (MOREIRA; MENDES, 1998).

1.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGAS DE PROTEÍNAS

As proteínas desempenham papéis significativos como sinalização celular, resposta imune, adesão celular, dentre outras (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). O advento da tecnologia do DNA recombinante veio a permitir a produção de proteínas em grande quantidade (MIYAMOTO, 2013). A expressão heteróloga de proteínas é uma importante ferramenta biotecnológica, utilizada para produzir e investigar a síntese de proteínas (KIM, J. *et al.*, 2016). Com o auxílio da engenharia genética, os sistemas de expressão heteróloga de proteínas começaram a ser extensivamente utilizados nos mais diversos setores, principalmente na indústria biofarmacêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

As proteínas podem ser expressas utilizando diversos sistemas, como por exemplo, leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos ou até mesmo através de plantas e animais transgênicos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). A qualidade proteica, velocidade de produção, rendimento e funcionalidade são alguns dos diversos fatores necessários a serem levados em conta na escolha do sistema de expressão de proteínas. A partir do ano de 2002 haviam cerca de 140 proteínas terapêuticas aprovadas pelos órgãos competentes dos EUA e Europa. As proteínas não glicosiladas são geralmente produzidas em *Escherichia coli* ou leveduras e constituem cerca de 40% do mercado da indústria biofarmacêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Notavelmente o hospedeiro mais comumente utilizado é a bactéria *E. coli* por suas diversas características, como por exemplo, rápido crescimento e cultivo extremamente barato (KIM, J. *et al.*, 2016). No entanto a expressão heteróloga de proteínas pode ser limitada por alguns fatores, como por exemplo, toxicidade da proteína expressa e formação de corpos de inclusão insolúveis devido a ligações dissulfeto (KIM, J. *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Dentre os mais diversos vetores de clonagem, os elementos genéticos são tidos como essenciais para o processo de transformação e expressão de proteínas. Em muitos casos são necessários variados passos para a produção heteróloga de proteínas, o que acarreta na necessidade de diversas subclonagens. Pensando em melhorar esses passos, nosso grupo realizou o desenho *in silico* de um constructo que possibilite expressar proteínas em vetores sem a necessidade de subclonagens futuras.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo em realizar a construção *in silico* de um vetor para a expressão heteróloga de proteínas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar *in silico* um vetor de expressão para utilização em *Escherichia coli*;
- Desenvolver um vetor de clonagem que não necessite de subclonagens futuras;
- Clonar este vetor em bactérias *E. coli* linhagem DH5 α ;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO RACIONAL *IN SILICO* DO CONSTRUCTO

Foi desenvolvido o desenho racional *in silico* de um constructo pensado para maximizar alguns passos e que não venha necessitar de subclonagens futuras.

O constructo contém as seguintes regiões; um promotor T7 apresentando 19 pb, um operador *lac* com 28 pb seguido novamente de outro promotor T7 apresentando 17 pb, uma região RBS com 6 pb, códon de início da síntese proteica ATG inicial apresentando 3 pb, peptídeo sinal com 50 pb seguido de um sítio de strep-tag contendo 24 pb apresentando dois espaçadores em sua extremidade de 6 pb cada, logo após vem um sítio de trombina com 18 pb, um gene humano a ser estudado em estudos futuros chamado de FJL 733, apresentando 633 pb seguido de dois sítios responsivos a enzimas de restrição em sua extremidade, um para a enzima *XbaI* e outro para a enzima *BamHI* contendo 6 pb cada respectivamente, o constructo apresenta um tamanho total de 852 pb. Após o desenvolvimento *in silico* o constructo foi sintetizado artificialmente pela *IDT Technologies*.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO CONSTRUCTO

O fragmento artificial foi então submetido à PCR para padronização das condições experimentais, utilizando 2,5µL de primer direto > Fw – pUC19 – *EcoRI* 5' – AAA CGA CGG CCA GTG AAT TCT AAT A – 3' e 2,5µL de primer reverso > Rv – pUC 19 – *Hind III* 5' – ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT CAG – 3', além de 10 µL de Buffer, 5µl de dNTP(desoxirribonucleotídeo fosfatado), 1,5µL DMSO (dimetilsulfóxido), 0,5µL de fusion e completados com 28µL de água. O volume final foi de 50µL divididos em dois tubos cada contendo 25µL e adicionados 1µL de amostra do constructo.

Foi utilizado o termociclador (Eppendorf Mastercycler, Alemanha) para as reações de PCR, com as seguintes condições de ciclagem utilizadas: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos para a desnaturação a 98 °C durante 30 seg, hibridização a 65 °C durante 30 seg e extensão a 72 °C durante 40 seg e extensão final a 72 °C por 10 min. Posteriormente o resultado obtido do PCR foi analisado em gel de agarose 1% utilizando GelRed como corante.

4.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Inicialmente bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α foram transformadas quimicamente segundo o protocolo de Sambrook & Russell (2001). Sumarizando 2 colônias que foram inoculadas em 2 tubos de vidro separadamente contendo 3 ml de meio Luria-Bertani (LB) e colocadas para crescimento a 37°C por 16 horas. No dia seguinte os meios foram centrifugados por 1 minuto a 12.000 RPM e descartado o sobrenadante. Resuspendeu a amostra em 1 ml de Cloreto de Magnésio (MgCl₂). O sobrenadante, foi então descartado e o pellet novamente resuspendido, agora desta em 1 ml de Cloreto de Cálcio (CaCl₂), posteriormente levado a banho de gelo a 0°C por 30 minutos.

Logo após o banho de gelo a amostra foi centrifugada novamente. Foi descartado o sobrenadante mas não completamente e as amostras foram levadas ao vortex. Foram adicionados 1 μ L de plasmídeo pUC19 ocorrendo posteriormente sucessivos choques térmicos 20 minutos a 0°C, 2 minutos a 42°C e 5 minutos a 0°C. Após os choques térmicos colocou-se 600 μ L de meio líquido autoclavado em cada um dos tubos e incubou-se a 37°C por 1 hora. Preparou-se então placas contendo 25 mL de meio LB Ágar Miller com 125 μ L de ampicilina a uma concentração de 20 mg/mL. As placas foram colocadas na estufa a 37°C por 16 horas.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Colônias de bactérias transformadas com plasmídeo pUC 19 foram colocadas para crescimento em meio líquido contendo 3 ml de LB líquido suplementado com 12 μ L de ampicilina na concentração de 20 mg/mL, incubadas com agitação de 250 RPM a 37°C por 16 horas. A extração do DNA plasmidial foi realizada segundo descrito por Sambrook & Russell (2001) e observada em gel de agarose 1% utilizando GelRed como corante.

4.5 CLIVAGEM DO PLASMÍDEO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *BAMHI*

Logo após a extração procedeu-se para a clivagem das amostras com enzima a *BamHI*. A clivagem foi realizada utilizando os seguintes volumes, 7 μ L de plasmídeo pUC19 anteriormente extraído, 1 μ L de enzima *BamHI*, 2 μ L de Buffer 10x e 10 μ L de água as amostras foram então colocadas a uma temperatura de 37°C por 16 horas. Os produtos da clivagem foram tratadas com 1 μ L de RNase em uma concentração de 10

mg/ml durante 60 min à 37°C e analisados em gel de agarose 1% utilizando GelRed como corante.

4.6 PCR LIVRE DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Com as amostras do plasmídeo pUC19 extraídas e clivadas juntamente com a amostra do PCR do constructo realizado anteriormente, procedeu-se então para o PCR do vetor mais o inserto. Foi realizado utilizando os seguintes volumes; 2 µL de Buffer 10x, 2 µL de Dntp (desoxirribonucleotídeo fosfatado), 0,6 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 0,5 µL de fusion, 2 µL do plasmídeo pUC 19 extraído e clivado anteriormente e 5 µL do PCR do constructo do qual havia sido realizado inicialmente e 7,9 µL de água. O volume final da reação foi de 20 µL e a ciclagem utilizada foi desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos para a desnaturação à 98°C durante 10 seg, hibridização a 56°C por 30 seg e extensão a 72°C durante 3 min e extensão final a 72°C por 10 min. Logo após o resultado obtido do PCR foi analisado em gel de agarose 1% utilizando GelRed como corante.

4.7 ELETROPORAÇÃO BACTERIANA

Para a transformação bacteriana através da eletroporação utilizou-se bactérias *E. coli* da linhagem DH5α, eletroporadas em cubeta de 0,2 mm utilizando o programa de 2,5 Kv. Adicionou-se então 20 µL de bactérias eletrocompetentes e 2 µL da amostra do PCR livre de enzimas de restrição realizado anteriormente. Logo após a eletroporação, as bactérias foram resuspendidas em 600 µL de meio seguindo os passos do protocolo de Sambrook & Russell (2001). Eletroporou-se também, para um controle negativo, bactérias sem a adição da amostra de PCR. As bactérias foram então incubadas a 37°C por uma hora com agitação.

Posteriormente as células transformadas foram plaqueadas em 25 mL de meio LB Ágar Miller mais 125 µL de ampicilina a uma concentração de 20 mg/mL, as placas foram então encubadas a 37°C por 16 horas. Logo após procedeu-se novamente a extração seguindo o protocolo de Sambrook & Russell (2001) e realizando posteriormente uma clivagem das amostras nos seguintes volumes; 7 µL de amostra da extração, 1 µL de enzima BamHI, 2 µL de Buffer 10x e completados com 10 µL de água as amostras foram então colocadas a uma temperatura de 37°C por 16 horas. Os produtos da clivagem foram tratadas com 1 µL de RNase em uma concentração de 10

mg/ml durante 60 min a 37°C e analisados em gel de agarose 1% utilizando GelRed como corante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

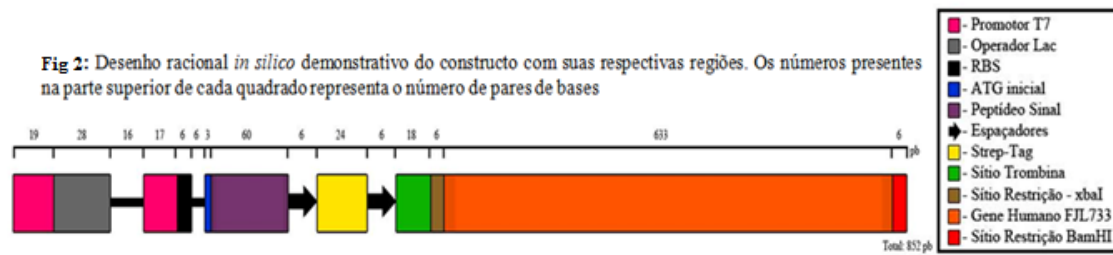
5.1 DESENHO RACIONAL *IN SILICO* DO CONSTRUCTO

Em muitos casos o desenho de vetores artificiais torna-se necessário para maximizar processos futuros, principalmente que não necessite de subclonagens (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). Os sistemas de expressão tem sido desenvolvidos ultimamente para permitir a purificação rápida e eficiente de proteínas expressas em bactérias.

Como descrito na figura 1, inicialmente foi adicionada uma sequência para o promotor T7. Esta sequência foi adicionada pois é, uma região específica onde a transcrição irá começar, neste local ocorre a ligação de fatores de transcrição para o início da transcrição em procariotos. Logo após foi inserido um operador lac, esta região foi adicionada visando permitir a indução quando se adiciona IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo). O promotor de IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo) funciona como um análogo a lactose e em muitos dos casos este é mais efetivo que a lactose atuando na indução (KILIKIAN *et al.*, 2000).

O IPTG induz a transcrição genética e aumenta a quantidade da enzima T7 RNA polimerase, a qual se liga ao promotor T7, iniciando a transcrição do cDNA de interesse. Uma região RBS, que é uma sequência conservada de 6 nucleotídeos também conhecida como Shine Delgarno encontrada poucas bases do códon de iniciação, seguido de um ATG inicial, foi adicionado, pois é ela que dará início a síntese proteica, ou seja, é o primeiro códon a ser traduzido. Seguido de um peptídeo sinal contendo cerca de 60 pb permitindo a exportação para o meio periplasmático. Um sítio de Strep-tag que é um peptídeo que contém oito resíduos de sequência e apresenta uma afinidade intrínseca com a estreptavidina, esta região foi adicionada para ser utilizada em posteriores passos de purificação da proteína de fusão por meio da cromatografia de afinidade como citado por Schimidt e colaboradores em 1996.

O sítio sensível a uma determinada protease, foi adicionado a trombina inserida, antes do sítio de clonagem permite que o mesmo possa ser clivado liberando a proteína de interesse e posteriormente possa ocorrer a purificação em colunas de afinidade (GUAN; DIXON, 1991).

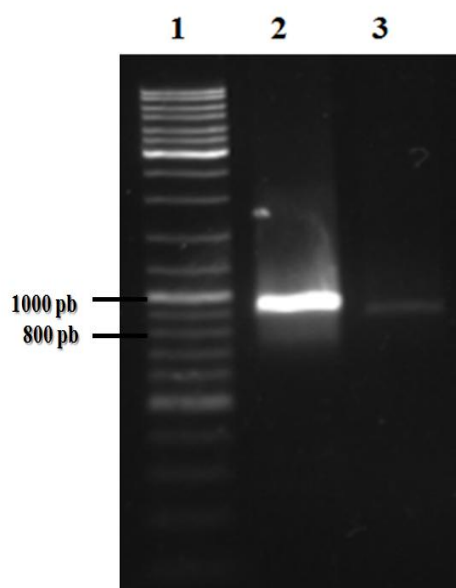


Os sítios para as enzimas *XbaI* e *BamHI* adicionado nas extremidades do gene FJL733 foi adicionado para que em estudo futuros possa ser realizada a clivagem e inserção de outras sequências de interesse.

5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO CONSTRUCTO

Para a confirmação e amplificação do constructo foi realizado uma PCR do mesmo, utilizando dois primers direto > Fw – pUC19 – EcoRI 5' – AAA CGA CGG CCA GTG AAT TCT AAT A – 3' e reverso Rv – pUC 19 – Hind III 5' – ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTT CAG – 3' para que ocorra a amplificação do mesmo. O constructo sintetizado pela *IDT Technologies* apresenta um tamanho total de 852 pb juntamente com todas as regiões citadas na figura 1.

Fig 3: PCR do constructo amplificado utilizando os primers Rv HindIII e Fw EcoRI. Eletroforese em gel de agarose 1%. 1- Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 2 e 3 PCR do constructo.



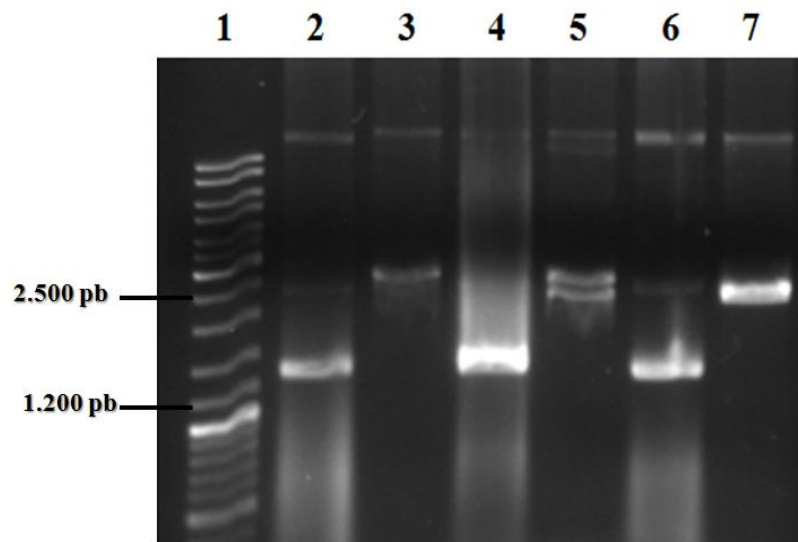
O PCR do constructo então apresentou o tamanho esperado, pois na imagem do gel de agarose pode-se observar na canaleta 2 e 3 uma banda que fica entre 800 pb e 900 pb apresentando assim o tamanho desejado, pois o constructo possui um tamanho de 852 pb.

5.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA, EXTRAÇÃO E CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

A transformação das bactérias *E. coli* com o plasmídeo pUC 19 ocorreu conforme descrito por Sambrook & Russell (2001). O processo de transformação constitui de um evento de altíssima importância para a manipulação gênica (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003). O procedimento de transformação ocorreu utilizando choque térmico e o plasmídeo utilizado para a transformação bacteriana apresenta um tamanho de 2.686 pb. Plasmídeos que apresentam tamanho pequeno incorporam-se mais facilmente à célula bacteriana competente (LIMA, 2008). Além disso, quando a transformação ocorre com a inserção de DNA linearizado este é pobremente incorporado pela bactéria, um dos fatores seria por sofrer degradação pelas exonucleases presentes no espaço periplasmático (NASCIMENTO; MARIA; ROSSI, 2003); O que não ocorreu em nosso caso, pois a molécula exógena inserida na bactéria foi o plasmídeo pUC 19, desprezando assim problemas apresentados por moléculas lineares e apresentando o maior número de multiplicados possíveis da molécula de plasmídeo inicial.

Como passo seguinte a transformação bacteriana realizou-se a extração do plasmídeo conforme descrito por Sambrook & Russell (2001) e logo após ocorreu a clivagem do mesmo com a enzima BamHI. O plasmídeo pUC 19 apresenta um agrupamento de sítios para algumas enzimas de restrição dentre elas para a BamHI demonstrando assim o porque de sua utilização. Como pode ser visualizado na figura 3 nas canaletas 2, 4 e 6 encontram as amostras apenas extraídas. O que deveria apresentar 3 bandas esperadas para extrações de plasmídeo. Já nas canaletas 3, 5 e 7 as amostras foram clivadas com a enzima *BamHI* e, como o plasmídeo apresenta um sítio responsivo para a enzima utilizada, o mesmo deveria apresentar apenas uma banda de 2.686 pb, ou seja, apresentar-se de forma linearizada como foi confirmado na figura 4, canaletas 3, 5 e 7.

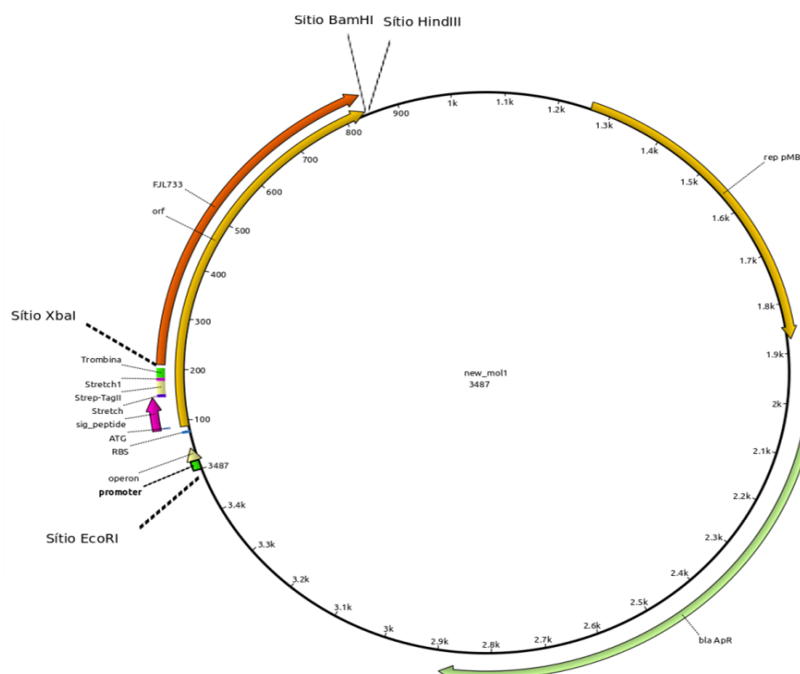
Fig 4: Gel de agarose 1% apresentando amostras extraídas e clivadas. Em 1- Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 2, 4 e 6 amostras de plasmídeo apenas extraídas, 3, 5 e 7 amostras extraídas e clivadas com a enzima *Bam*HI.



5.4 PCR LIVRE DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O PCR livre de enzimas de restrição se fez necessário pois tanto inserto quanto vetor utilizam um ao outro como molde para a formação da nova molécula. O gene de interesse inserido no vetor por sua vez foi amplificado por PCR com um par de primers anteriormente, que por sua vez no PCR livre de enzimas de restrição foi prolongado e introduzido no vetor. Na figura 5 podemos visualizar a nova molécula formada a partir do PCR livre de enzimas de restrição onde encontra-se o plasmídeo pUC 19 juntamente com o constructo desenvolvido para o estudo onde o tamanho final apresentado seria de 3.487 pb.

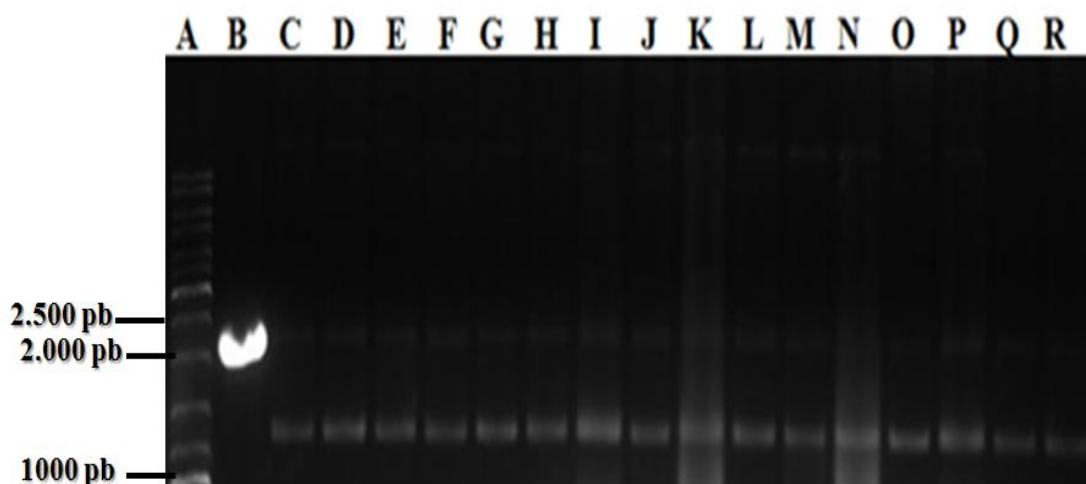
Fig 5: Nova molécula esperada após o fim do PCR de fusão, apresentando as regiões responsivas ao plasmídeo pUC 19 mais as regiões encontradas no constructo desenvolvido para o estudo.



5.5 ELETROPORAÇÃO BACTERIANA

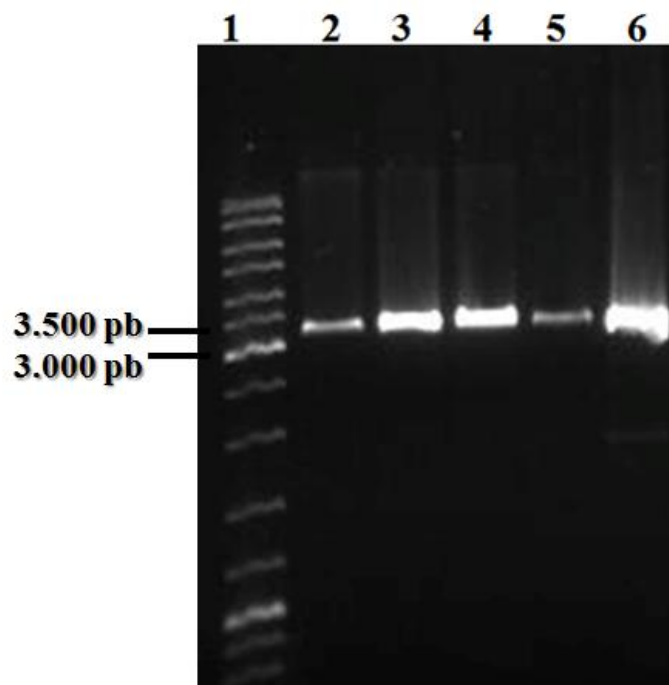
Com a realização da eletroporação foi possível obter diversas colônias resultantes. Mas as mesmas não confirmavam se realmente as bactérias que cresceram continham ou não o plasmídeo mais o constructo. Então procedeu-se a realização da extração para posterior clivagem seguindo o protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). As amostras foram então migradas em gel de agarose 1%, na figura 6 canaleta B, podemos observar apenas o plasmídeo pUC19 integro sem estar clivado e em C a R as amostras extraídas apresentando 3 bandas como esperado logo após a extração do DNA plasmidial.

Fig 6: Amostras das extrações realizadas a partir a biblioteca de colônias obtidas após a eletroporação. Gel de agarose 1% em A- Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), B- plasmídeo pUC 19 sem o inserto e de C até R amostras das extrações



Como passo seguinte da extração escolheu-se as melhores amostras de extrações e realizou-se a clivagem utilizando a enzima *Bam*HI, escolhida pois o plasmídeo pUC19 apresenta no sítio múltiplo de clonagem uma região onde cliva com a mesma. O plasmídeo pUC19 apresenta um tamanho de 2.686 pb e o constructo um tamanho de 852 pb, ou seja, a banda esperada após a clivagem seria de 3.487 pb como podemos visualizar na figura 6, canaletas 2, 3, 4 e 5.

Fig 7: Clivagem com a enzima *BamHI*. 1- Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 2 à 5 clivagem da amostra contendo plasmídeo mais constructo, 6- clivagem do plasmídeo pUC 19 com a enzima *BamHI*.



Realizada a clivagem de 16 horas com a enzima citada anteriormente podemos visualizar na figura 7 que realmente clivou o plasmídeo e confirmando a real clonagem do constructo pois nas canaletas 2 a 5 as bandas visualizadas apresentam um tamanho em torno do tamanho esperado, já na canaleta 6 é a amostra do plasmídeo pUC 19 também clivado com a mesma enzima *BamHI* para podermos assim realizar uma comparação. Como observamos, a clivagem do plasmídeo pUC 19 certamente foi falha pois apresenta um arraste não condizente a uma clivagem bem sucedida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabemos da importância da produção heteróloga de proteínas principalmente para a indústria biofarmacêutica. A utilização de proteínas expressas de forma heteróloga em bactérias são amplamente utilizadas para diversas aplicações biotecnológicas (KIM, J. *et al.*, 2016). Portanto, se fazem necessárias pesquisas voltadas para maximizar os processos de produção.

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um constructo para maximizar processos futuros de purificação de proteínas, além da não necessidade de subclonagens. A utilização da técnica de PCR livre de enzimas de restrição se fez necessária, pois nesta técnica vetor e inserto irão se hibridizar utilizando um ao outro para a formação do novo plasmídeo. A clonagem do constructo inserido no plasmídeo deve ser comprovada para demonstrar a efetividade do mesmo, o que foi caracterizado neste trabalho. Sendo assim, um novo sistema para expressão e purificação de proteínas foi desenvolvido.

7. REFERENCIAS

1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. 1294 p.
2. CABRITA, L. D.; DAI, W.; BOTTOMLEY, S. P. **A family of e. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production**. BMC biotechnol, 2006. v. 6, p.12.
3. DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms**. Biotechnology advances, 2009. v. 27, n. 3, p. 297–306.
4. DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P.; **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms**. Biotechnology advances, 2009b. v. 27, n. 3, p. 297–306.
5. ENT, F. Van Den; LO, J. **Short note rf cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids**. Journal Biochem Biophys Methods, 2006. v. 67, p. 67–74.
6. GUAN, K.; DIXON, J. E. **Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione s-transferase**. Analytical biochemistry, 1991. v. 192, n. 2, p. 262–267.
7. HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. **Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli***. Trends in biotechnology, 1998. v. 16, n. 2, p. 54–60.
8. KILIKIAN, B. V. *et al.* **Process strategies to improve heterologous protein production in escherichia coli under lactose or iptg induction**. Process biochemistry, 2000. v. 35, n. 9, p. 1019–1025.
9. KIM, J. *et al.* **Strategies for increasing heterologous expression of a thermostable esterase from archaeoglobus fulgidus in *Escherichia coli***. Protein expression and purification, 2016. v. 127, p. 98–104.

10. KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R.; SPENCER, C.A.; PALLADINO, M.A., 2010 **Conceitos de genética**. 9ª edição. Artmed, Porto Alegre, RS. 323-346.
11. MIYAMOTO, C. A. **Produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli***. Revista conexão eletrônica, 2013. p. 220–233.
12. NASCIMENTO, A. A. C.; MARIA, N.; ROSSI, M. **Tecnologia do dna recombinante**. Universidade de São Paulo, p.87., 2003.
13. QUAN, J.; TIAN, J. **Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways**., Ploss One, 2009. v. 4, n. 7.
14. ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges**. Frontiers in microbiology, 2014. v. 5, n. APR, p. 1–17.
15. SAMBROOK J.; RUSSEL D.W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
16. SHOCK, T. **Biotecnologia : transformação bac- teriana por método de choque térmico**, Revista Unilus., 2015. v. 55, n. 13, p. 41–53.
17. SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli***. Journal of biotechnology, 2005. v. 115, n. 2, p. 113–128.
18. ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H.B.; SCHRANK, I.S.; RODRIGUES, J.J.S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R.; RAUPP, R.M.; SILVA, S.C.; GAIESKY, V.L.V. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.336 p.

