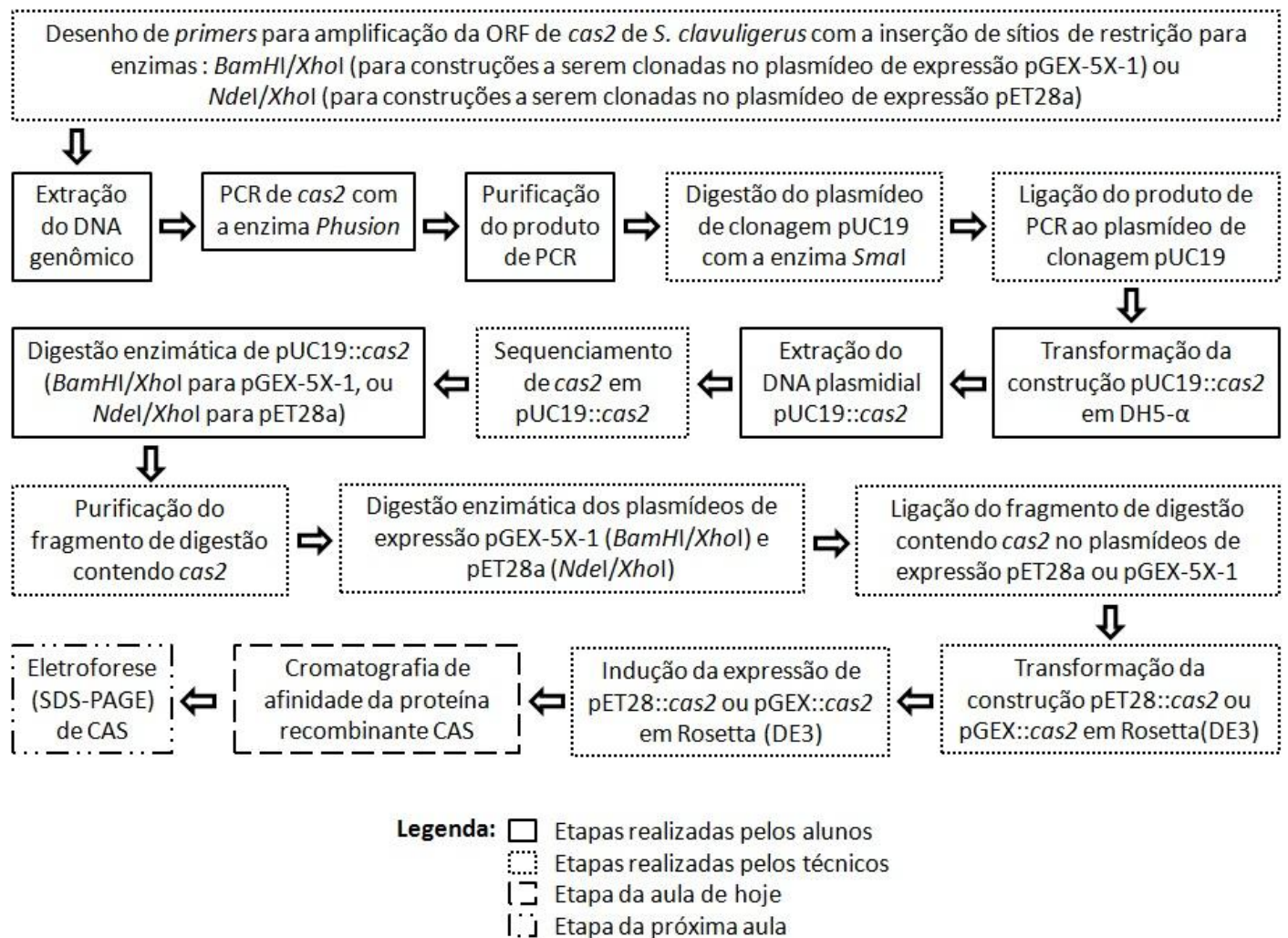


Aula Prática 6: PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Na aula anterior, realizamos a digestão enzimática do plasmídeo pUC19::*cas2*, extraído da linhagem DH5- α de *E. coli*, a fim de confirmar a presença do inserto *cas2*.

Durante a semana, repetimos o protocolo de digestão, e o DNA codificante de *cas2* foi purificado em gel de agarose e ligado num plasmídeo de expressão (pET28a ou pGEX-5X-1). O vetor de expressão contendo o DNA codificante de *cas2* foi usado para transformar a linhagem de expressão *E. coli* Rosetta (DE3). A expressão da proteína recombinante clavamínato sintase (CAS) foi induzida ontem conforme descrito no item “A”.

O esquema a seguir é um resumo das etapas do projeto. Nesta aula, realizaremos a purificação da proteína recombinante CAS.



A. Indução de expressão heteróloga (já realizada)

- 1) **Preparo do pré-inóculo:** uma colônia da linhagem de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada com o plasmídeo de expressão foi inoculada no meio de cultura LB contendo 100 μ g/mL do antibiótico adequado (canamicina para pET28::*cas2*, ou ampicilina para pGEX::*cas2*). O pré-inóculo foi incubado *overnight* a 37 °C, 150 rpm.
- 2) No dia seguinte, 1 mL desse pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL do antibiótico adequado.
- 3) A cultura foi incubada a 37 °C, 200 rpm, por cerca de 3 h, até que atingisse a Abs_{600nm} ~0,4 - 0,6.

- 4) **Coleta da amostra antes da indução:** Antes de iniciar a indução da expressão de *cas*, 200 μ L da cultura foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 35 μ L de água milli-Q e 15 μ L de tampão de amostra para proteínas (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 4% (m/v) de SDS; 20% (v/v) de glicerol; 1% (v/v) de β -mercaptoetanol; e 0,03 mM de azul de bromofenol). A alíquota foi guardada a -20 °C para posterior verificação da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- 5) O restante da cultura foi induzido com 0,3 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) por 16 h, a 18 °C, 130 rpm.
- 6) **Coleta da amostra após a indução:** Uma amostra de 200 μ L das células induzidas após 16h de incubação foi coletada e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 35 μ L de água milli-Q e 15 μ L de tampão de amostra para proteínas. A alíquota foi guardada a -20 °C para posterior verificação da expressão da proteína recombinante por SDS-PAGE.
- 7) A cultura restante foi centrifugada a 3.000 rpm, 4° C, por 45 min. e o meio de cultura foi descartado.
- 8) As células foram ressuspensas em 2 mL de tampão de equilíbrio (20 mM de Tris, 100 mM de NaCl, pH 8,0)

B. Questões sobre indução da expressão heteróloga

- 1) A indução da expressão gênica normalmente é feita com uma cultura bacteriana que esteja numa faixa de absorvância específica $Abs_{600nm} = 0,4 - 0,6$. Há alguma razão que justifique isso?
- 2) Discuta o papel do IPTG e a necessidade do antibiótico no protocolo.
- 3) Por que a temperatura de incubação difere antes e depois da indução da expressão? Isso é sempre necessário?

C. Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína recombinante CAS proveniente das construções gênicas em ambos os vetores de expressão (pET28 e pGEX) será realizada por cromatografia de afinidade, uma técnica na qual incuba-se a proteína a ser purificada com uma resina contendo alguma molécula ou íon que tenha afinidade pela proteína de interesse. Desta forma, a proteína se liga à resina, que pode ser lavada para a retirada dos contaminantes e então a proteína de interesse pode ser eluída (desligada da coluna) pura.

No vetor pET28, a região codificante de *cas2* foi inserida próxima a uma região que codifica uma sequência de histidinas (denominada His-Tag ou cauda de histidinas). Quando *cas2* for expresso a partir da construção no vetor pET, a proteína recombinante clavamino sintase estará fusionada a uma sequência consecutiva de 6 histidinas. Neste caso, será utilizada uma resina carregada com Ni^{2+} ou Co^{2+} , íons pelos quais as histidinas têm afinidade.

De forma semelhante, no vetor pGEX, a região codificante de *cas2* foi inserida em fase numa região que codifica a proteína glutatona S-transferase (GST), enzima que adiciona glutatona a uma variedade de substratos. Portanto, será utilizada uma resina contendo glutatona imobilizada, na qual enzima GST se ligará.

O procedimento de purificação da proteína consiste basicamente em alguns passos: 1) obter o extrato proteico das células bacterianas; 2) preparar a coluna com a resina; 3) equilibrar a coluna com o tampão adequado; 4) aplicar a amostra proteica na coluna; 5) lavar a coluna para eliminar os contaminantes; e 6) eluir a proteína de interesse adsorvida na coluna; 7) Limpar a coluna para que possa ser reutilizada.

D. Preparo do extrato proteico (Inicie na etapa 2)

- 1) Após as 16 h de indução da expressão, as células bacterianas foram centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de tampão de equilíbrio (20 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 8,0).
- 2) Incubar as células com 10 μ L de uma solução de lisozima a 10 mg/mL (concentração final de 20 μ g/mL) por 30 min. no gelo.
- 3) Realizar 5 ciclos de congelamento em $N_2(l)$ e descongelamento a temperatura ambiente.

- 4) Transferir o extrato celular para microtubos de 2 mL e centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
- 5) Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos microtubos de 2 mL e centrifugar novamente.
- 6) Transferir o sobrenadante (extrato proteico) para um novo microtubo de 2 mL.
- 7) **Coleta de amostra do Extrato proteico solúvel:** Utilize dois tubos de 0,6 mL para separar duas alíquotas de 20 µL do extrato proteico para posterior análise em SDS-PAGE. Adicione 10 µL de tampão de amostra para proteínas. Nomeie os tubos da seguinte forma: Número do grupo/3 (Ex: Grupo 1/3).
- 8) **Coleta de amostra do Extrato proteico insolúvel:** colete uma alíquota do precipitado em dois tubos de 0,6 mL e adicione 20µL de água e 10µL de tampão de amostra para proteínas, para posterior análise em SDS-PAGE. Nomeie os tubos da seguinte forma: Número do grupo/4 (Ex: Grupo 1/4).
- 9) Proceda à purificação com o restante da amostra.

E. Purificação da proteína por cromatografia

- **Protocolo para purificação da proteína codificada pelo vetor pET28a**

ATENÇÃO: O primeiro passo já foi realizado. Inicie na etapa 2.

- 1) Monte uma coluna cromatográfica com 0,5 mL da resina carregada com Co^{2+} .
- 2) Lave a coluna com 5 mL de água.
- 3) Equilibre a coluna com 5 mL de tampão de equilíbrio (20 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, pH 8,0).
- 4) Passe o extrato proteico solúvel pela coluna e colete o fluxo em um tubo de 2 mL.
- 5) Repita a passagem do extrato proteico.
- 6) Lave a coluna com 5 mL de tampão de lavagem (20 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, e 10 mM de Imidazol, pH 8,0).
- 7) Elua a proteína recombinante com 1 mL de tampão de eluição (20 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, e 500 mM de Imidazol, pH 8,0) e colete a proteína purificada em um tubo de 1,5 mL.
- 8) **Coleta da amostra de Proteína purificada:** Utilize dois tubos de 0,6 mL para separar duas alíquotas de 20 µL da proteína eluída para posterior análise em SDS-PAGE. Adicione 10 µL de tampão de amostra para proteínas. Nomeie os tubos da seguinte forma: Número do grupo/5 (Ex: Grupo 1/5).
- 9) Realize a lavagem da coluna: adicione 1 mL de tampão de eluição. Após o término, adicione 5 mL de tampão de equilíbrio. Para estocagem, adicione 5 mL de 20% de etanol (deixe passar somente cerca de 2 mL) e guarde a coluna a -4 °C com cerca de 3 mL.

- **Protocolo para purificação da proteína codificada pelo vetor pGEX-5X-1**

ATENÇÃO: O primeiro passo já foi realizado. Inicie na etapa 2.

- 1) Monte uma coluna cromatográfica com 0,5 mL da resina carregada com glutatona.
- 2) Lave a coluna com 5 mL de água.
- 3) Equilibre a coluna com 5 mL de tampão de equilíbrio (PBS 1X - 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de Na_2HPO_4 ; 1,5 mM de KH_2PO_4 ; pH 7,4).
- 4) Passe o extrato proteico solúvel pela coluna e colete o fluxo em um tubo de 2 mL.
- 5) Repita a passagem do extrato proteico.
- 6) Lave a coluna com 5 mL de tampão de lavagem (PBS 1X).
- 7) Elua a proteína recombinante com 1 mL de tampão de eluição (20 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, e 10 mM de glutatona reduzida, pH 8,0) e colete a proteína purificada em um tubo de 1,5 mL.

- 8) **Coleta da amostra de Proteína purificada:** Utilize dois tubos de 0,6 mL para separar duas alíquotas de 20 µL da proteína eluída para posterior análise em SDS-PAGE. Adicione 10 µL de tampão de amostra para proteínas. Nomeie os tubos da seguinte forma: Número do grupo/5 (Ex: Grupo 1/5).
- 9) Realize a lavagem da coluna: adicione 1 mL de tampão de eluição. Após o término, adicione 5 mL de tampão de equilíbrio. Para estocagem, adicione 5 mL de 20% de etanol (deixe passar somente cerca de 2 mL) e guarde a coluna a -4 °C com cerca de 3 mL.

F. ATENÇÃO: Ao final desta aula, haverá 4 alíquotas de proteínas para análise em SDS-PAGE, sendo:

- 1) Cultura bacteriana antes da indução da expressão (Já coletada);
- 2) Cultura bacteriana 16 h após a indução da expressão (Já coletada);
- 3) Extrato proteico solúvel da cultura bacteriana após a indução da expressão (Aula de hoje);
- 4) Extrato proteico insolúvel da cultura bacteriana após a indução da expressão (Aula de hoje);
- 5) Proteína purificada do extrato proteico (Aula de hoje).

G. Questões sobre purificação de proteínas

- 1) Qual a diferença entre as proteínas obtidas no extrato proteico e as proteínas obtidas após a cromatografia de afinidade?
- 2) Caso as proteínas recombinantes estejam totalmente insolúveis no extrato após a lise, ainda seria possível purificá-las? Explique.
- 3) Quais os papéis do cobalto e do imidazol no processo de purificação?
- 4) Quais os papéis da glutatona e da glutatona reduzida no processo de purificação?