

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

(NHZ6006-18)



Universidade Federal do ABC

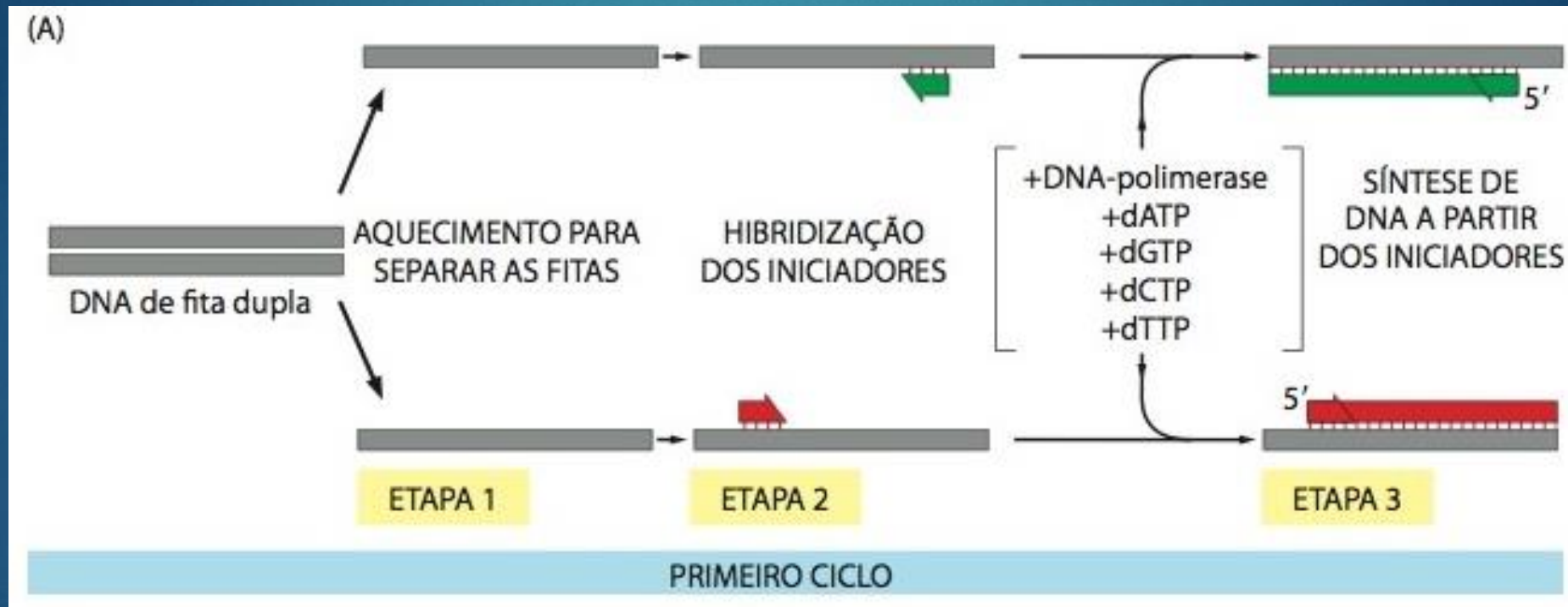
ETAPAS DA EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROORGANISMOS

1. Amplificação do gene de interesse.
2. Elaboração do constructo de vetor mais inserto (constructo recombinante).
3. Preparo do constructo (ou vetor) recombinante em quantidade.
4. Preparo das células competentes de expressão recombinantes.
5. Cultura das células com o constructo (ou vetor) recombinante para expressão das proteínas.
6. Purificação e avaliação da expressão.

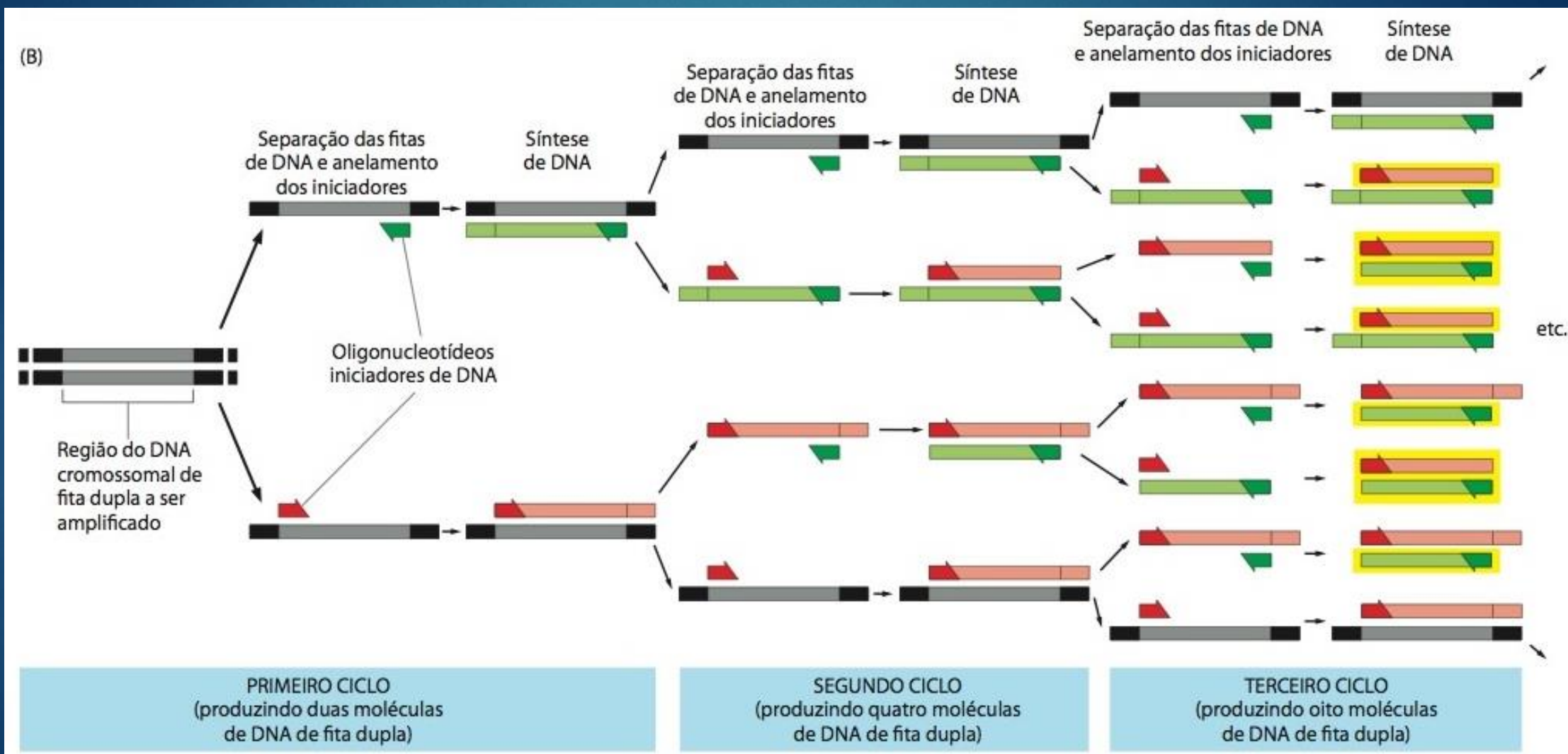
1 – Amplificação do gene e inserção no vetor

1. Extração de RNAm e síntese do cDNA de célula/ tecido.
2. Amplificação por PCR do fragmento de cDNA de interesse
3. Correr um gel de agarose com marcador de DNA
4. Cortar a banda e purificar utilizando kits.
5. Digestão do fragmento de cDNA purificado utilizando enzimas de restrição específica.
6. Paralelamente é necessário realizar a produção do vetor (plasmídeo) por meio de preparações plasmidiais.
7. Digerir o plasmídeo também e fazer a ligação do fragmento.
8. Transformar bactérias competentes *E.coli* (DH5alfa). – Previamente precisa preparar estas bactérias.
9. Checar se a bactéria recebeu o plasmídeo recombinante – constructo (Por PCR de colônia, por ex. (colonie)).

PCR – Reação em cadeia da polimerase

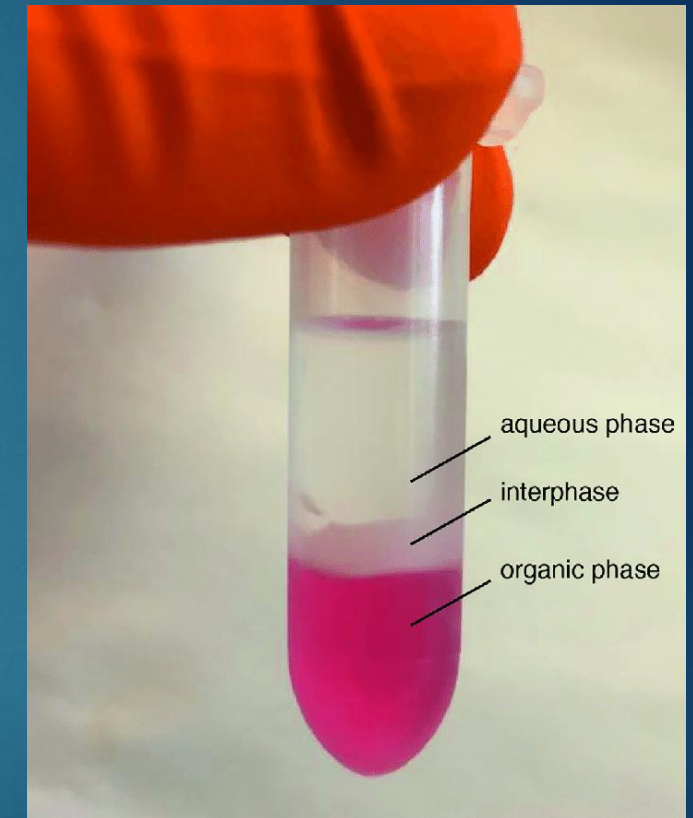
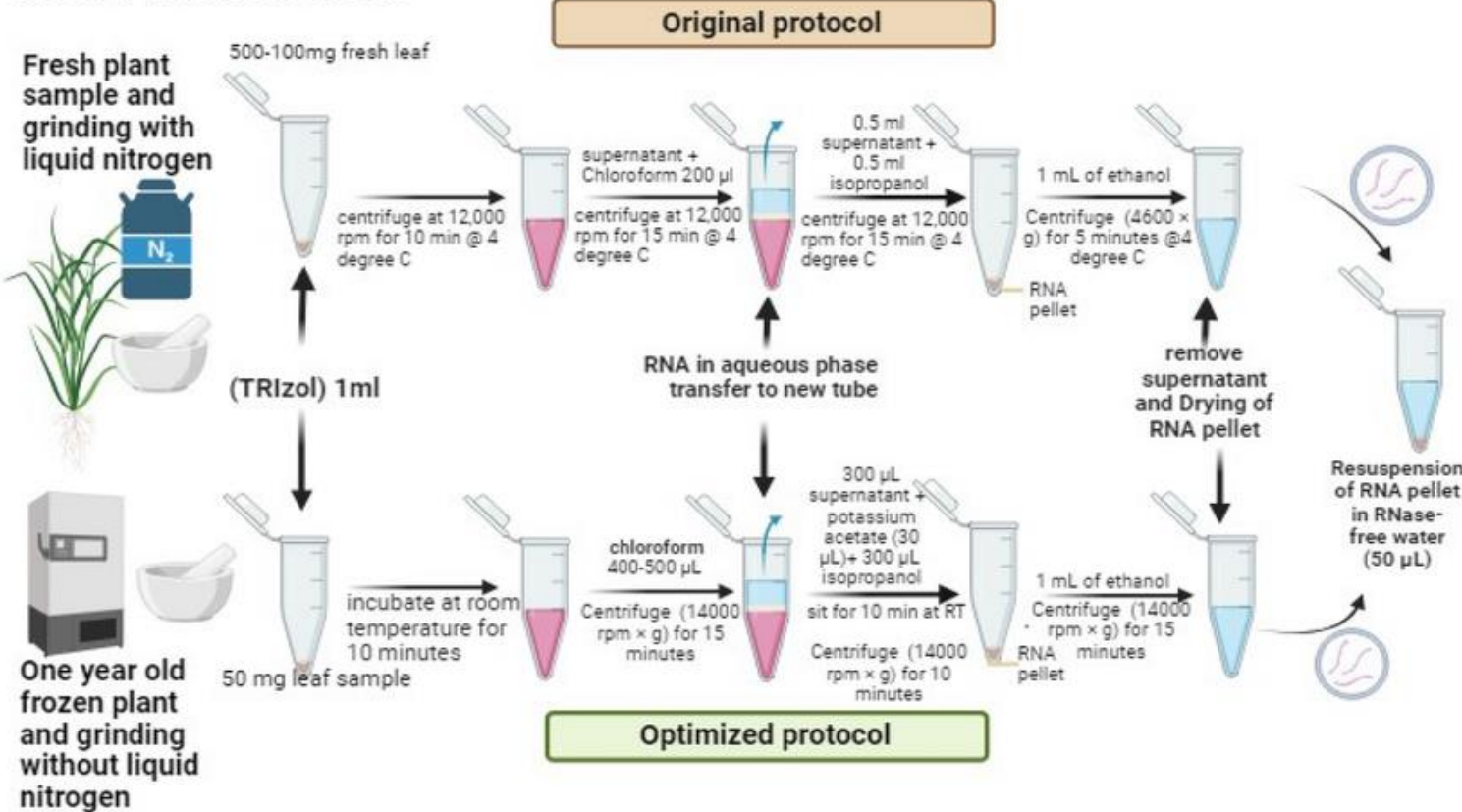


PCR – Reação em cadeia da polimerase



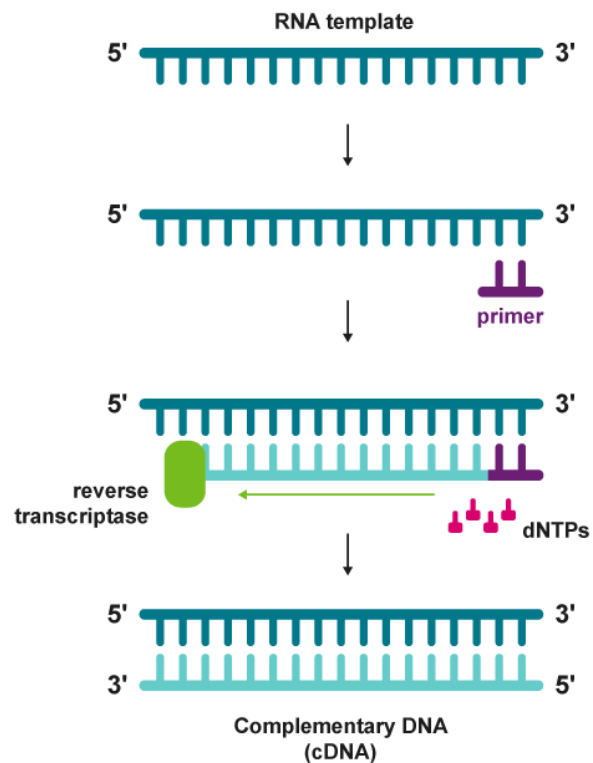
Extração RNA e síntese de cDNA

RNA Extraction



Síntese de cDNA e PCR

Reverse
transcription
and cDNA
synthesis



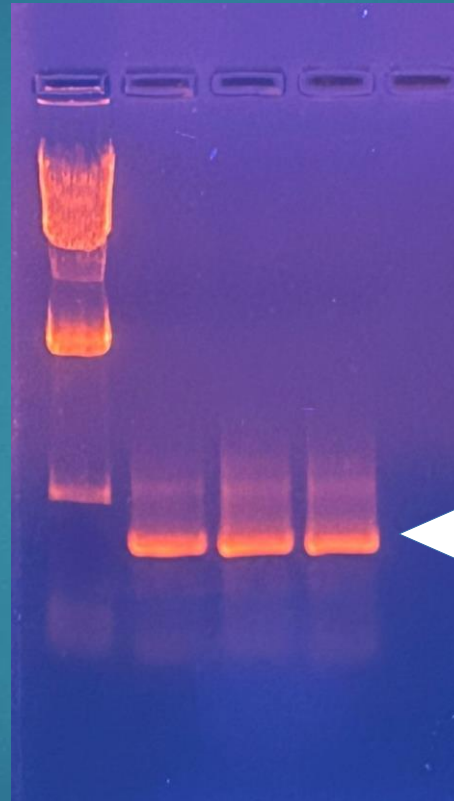
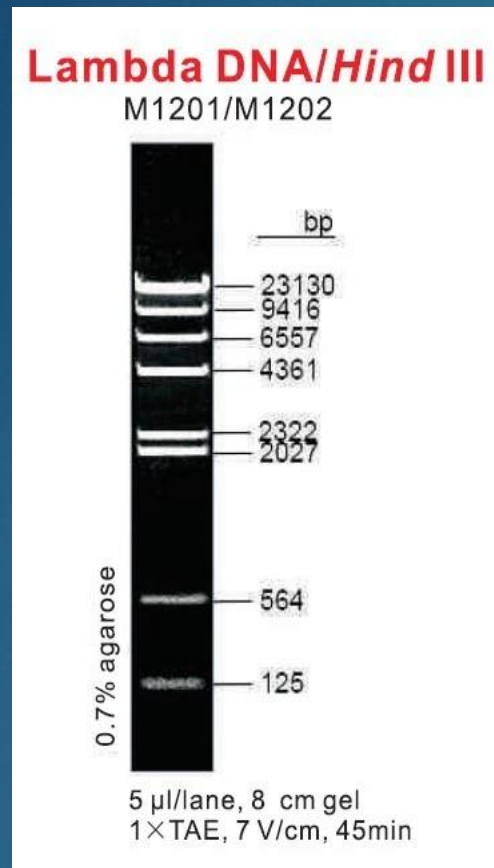
PCR
amplification
of cDNA

cDNA amplification
with specific primers
using PCR technique



RT-PCR product
(amplified cDNA)

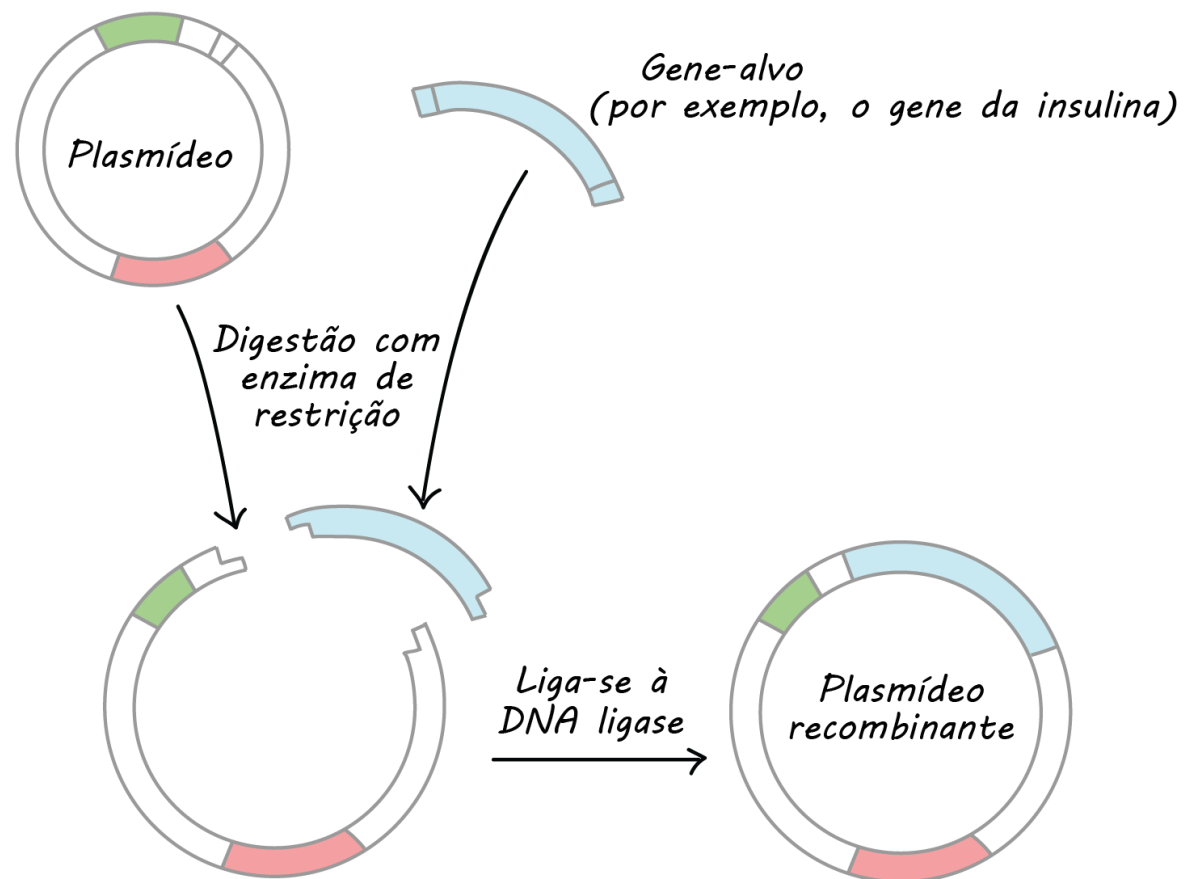
Análise de amplificação por gel de agarose



1 2 3 4

1 – Marcador de Pares de base de DNA. 2 a 4 – Produto de PCR das amostras de cDNA de ovário (2) e intestinos (2 e 3) de *R. microplus*, oligonucleotídeos para BmTI-3.

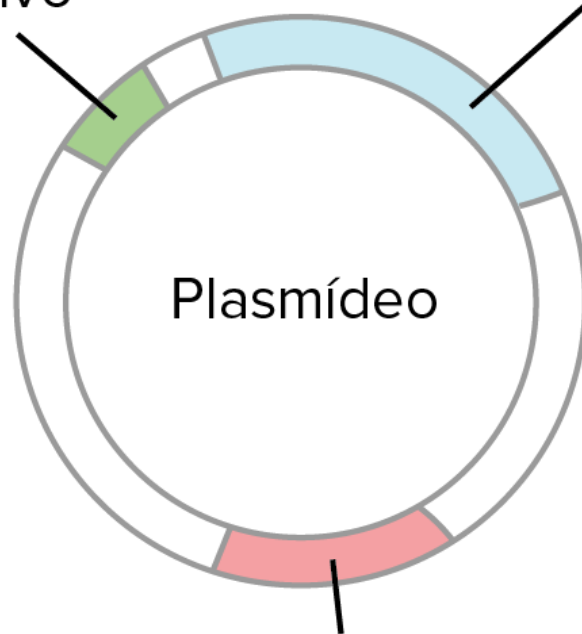
Inserção do fragmento amplificado no vetor



Vetor e inserto

Promotor para
conduzir a expressão
gene-alvo

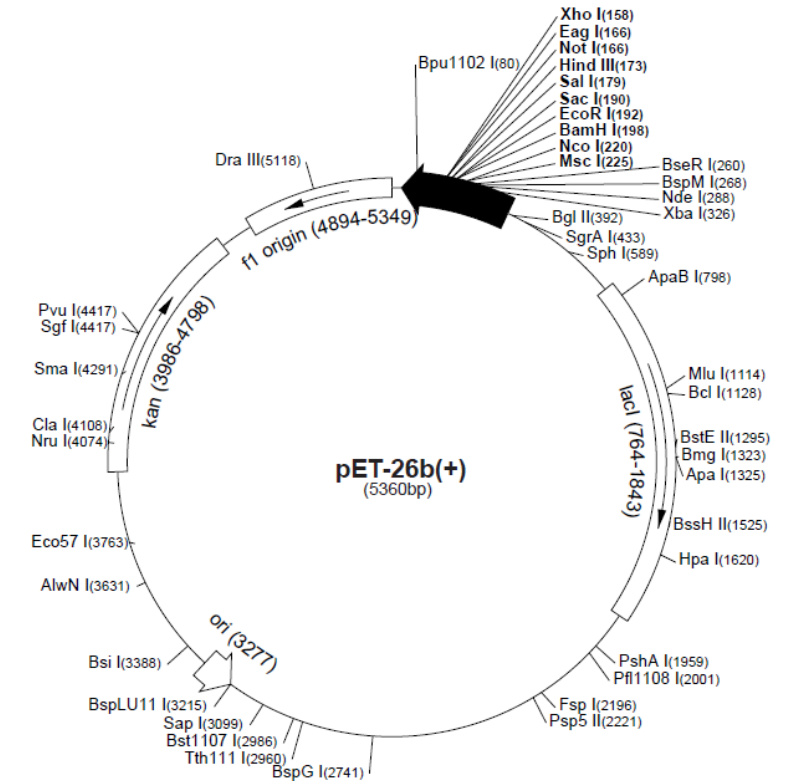
Gene-alvo



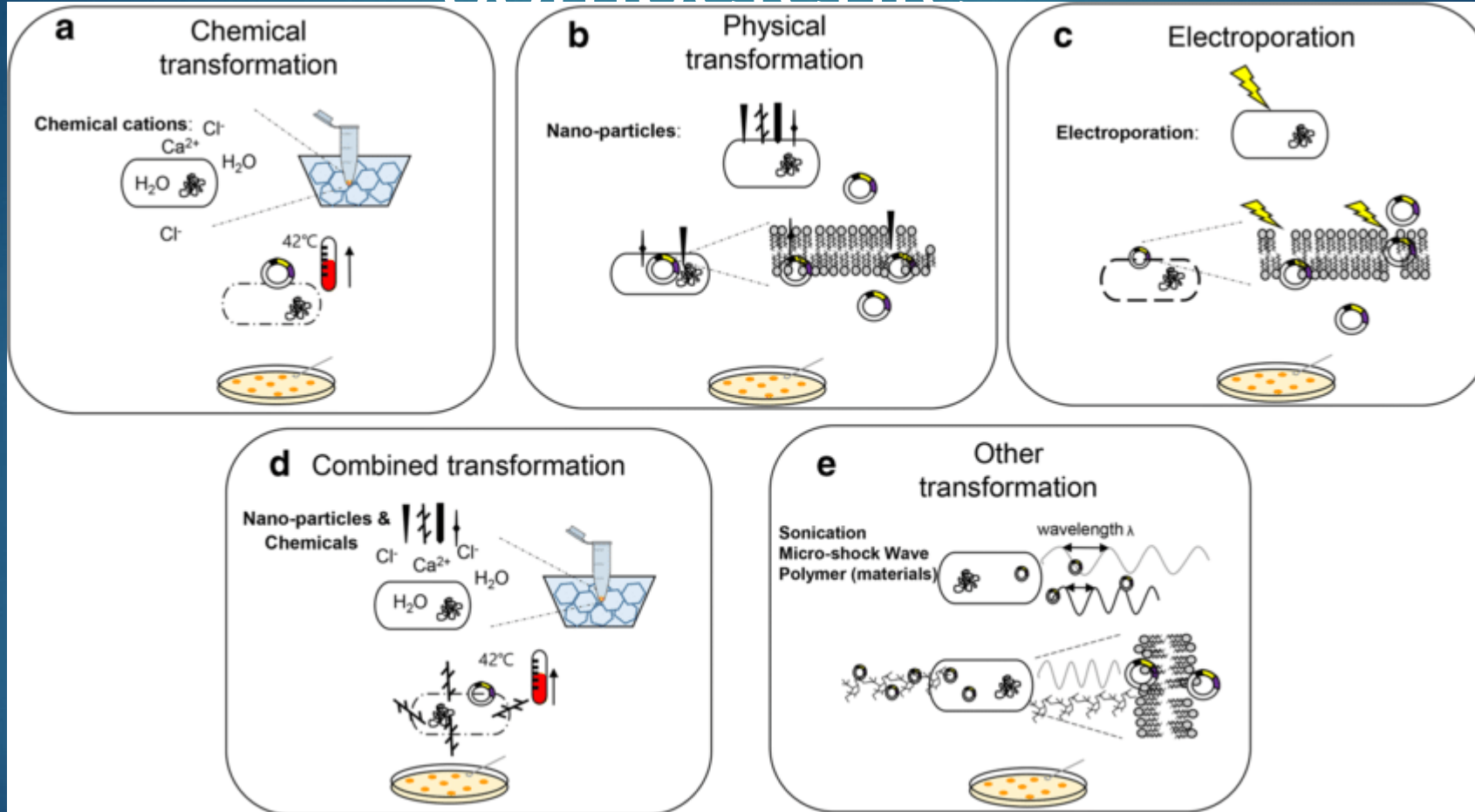
Gene de resistência ao antibiótico

pET-26b(+) sequence landmarks

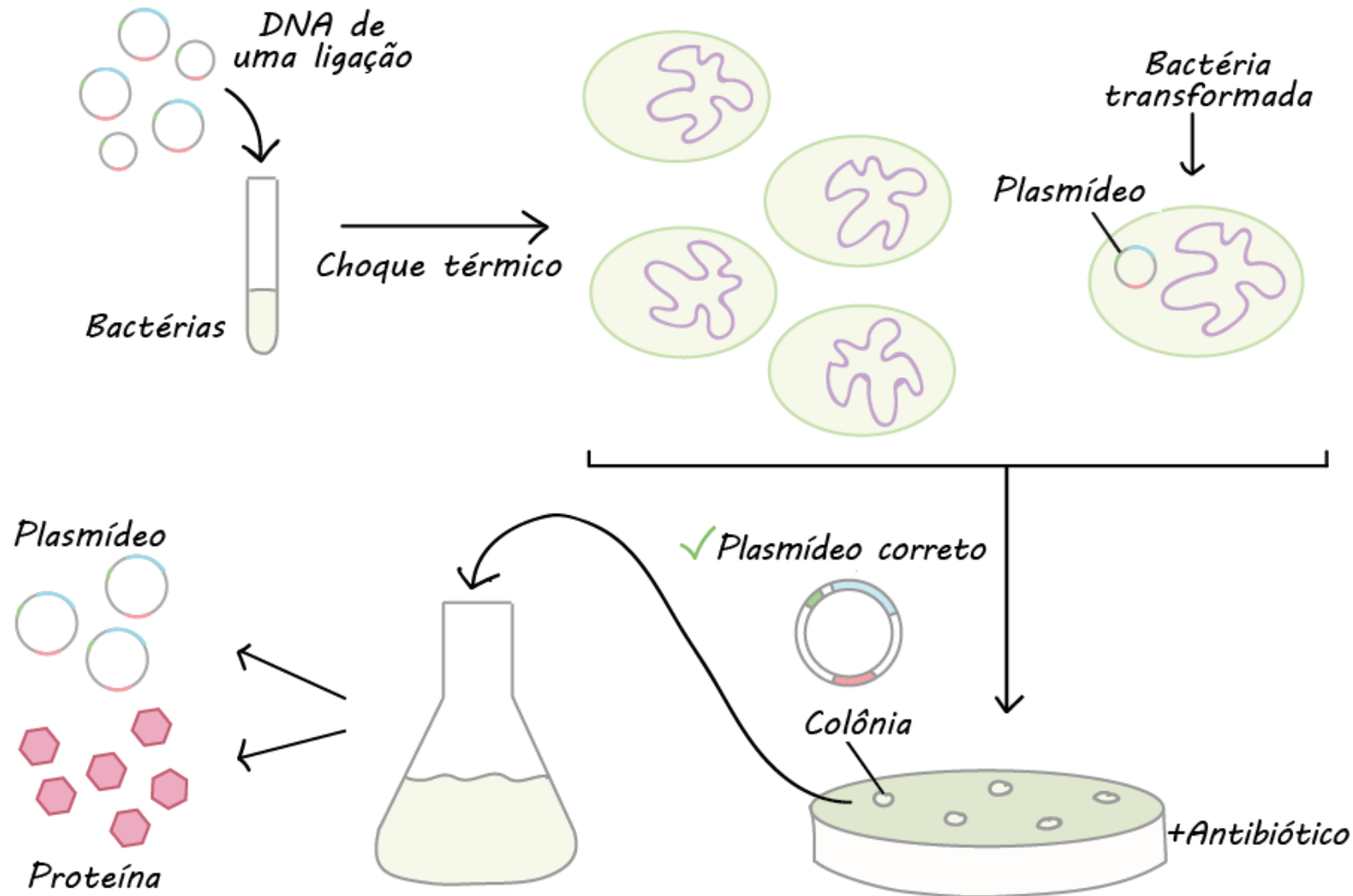
T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
Kan coding sequence	3986-4798
f1 origin	4894-5349



Transformação da célula competente



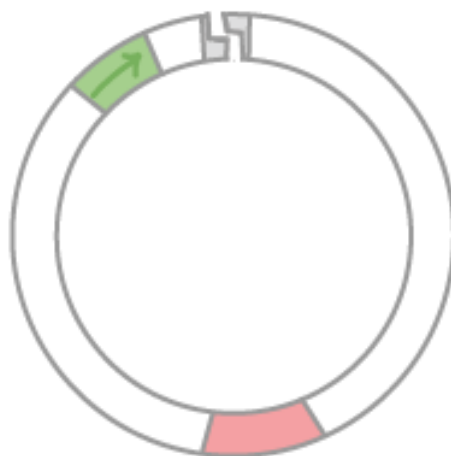
Multiplicação do constructo



Verificar a clonagem



✓ O gene se encaixa na direção correta

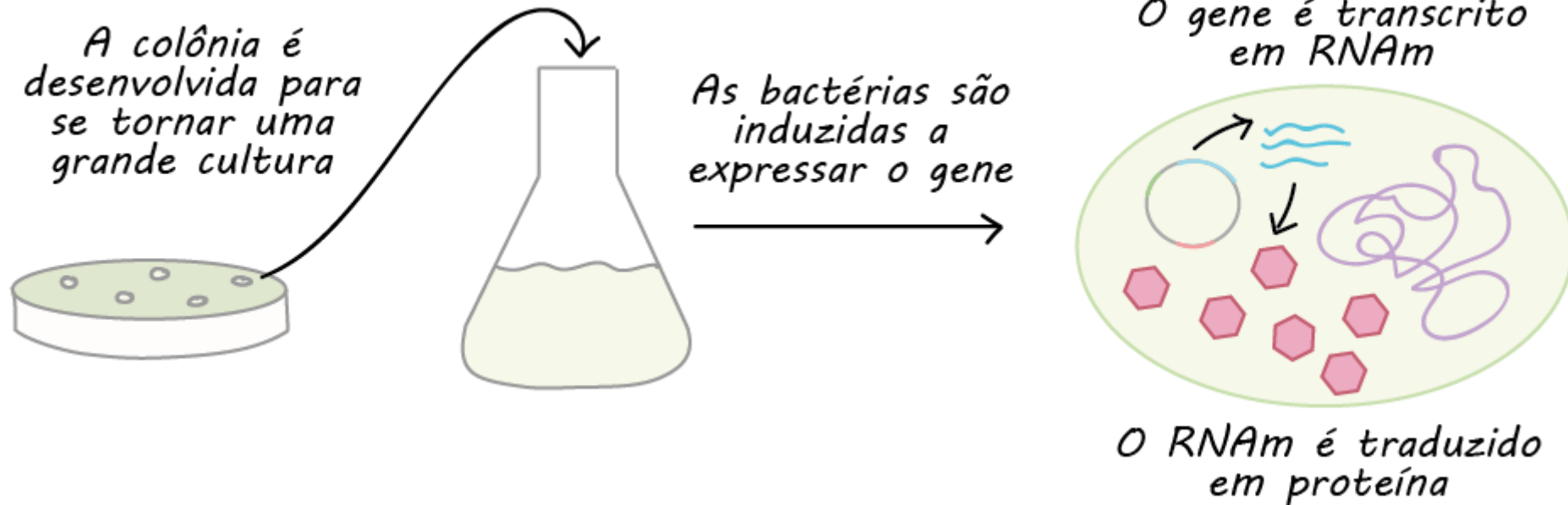


✗ O plasmídeo se fecha



✗ O gene se encaixa na direção contrária

Expressão da proteína

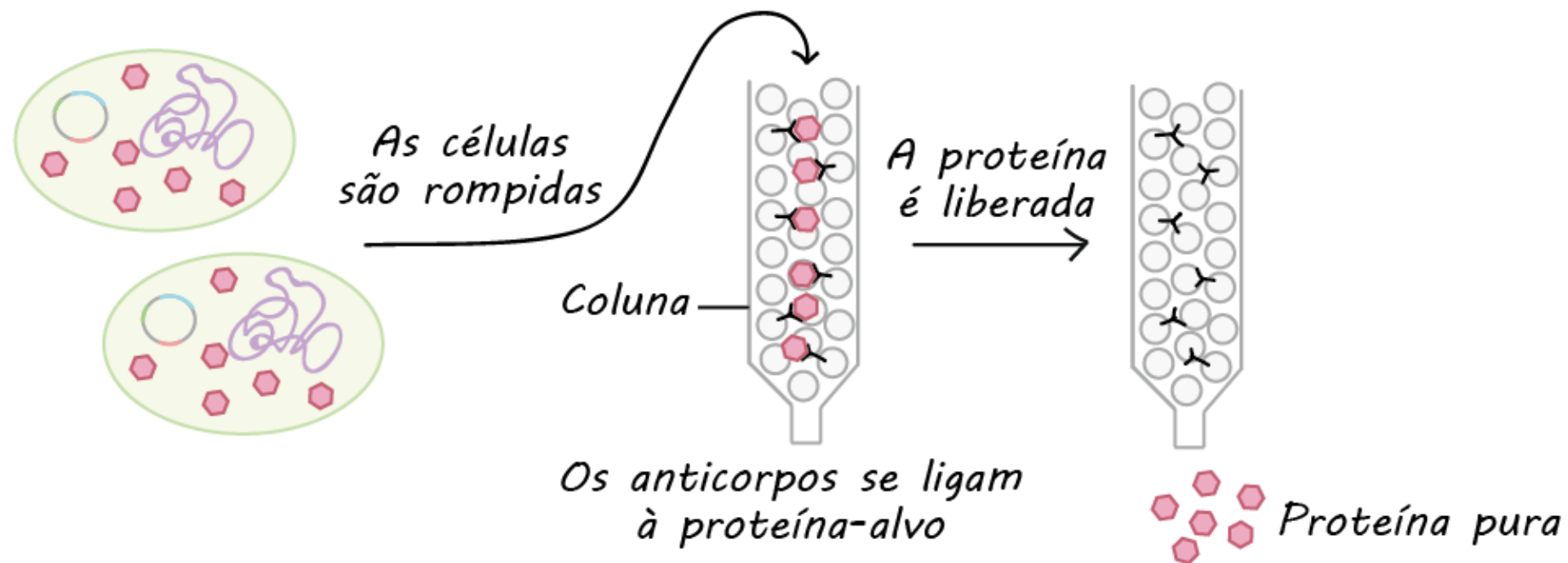


Expressão da proteína- métodos de indução

Para o pET-26b(+), o sistema de indução padrão é baseado no promotor T7, mas existem diversas outras estratégias dependendo da sua linhagem de E. coli e do objetivo do projeto:

- 1) Indução Química por IPTG: É o método clássico para o promotor T7 (presente no pET). O IPTG mimetiza a lactose e inativa o repressor lacI, liberando a transcrição. É um sistema de "tudo ou nada" e muito forte.
- 2) Autoindução (Meio ZYM-5052): Utiliza uma mistura de açúcares (glicose, lactose e glicerol). A expressão é inibida pela glicose e iniciada automaticamente quando a glicose acaba e a célula passa a metabolizar a lactose. É ideal para alta densidade celular sem monitoramento constante.
- 3) Indução Térmica: Utiliza promotores sensíveis ao calor (como o pL ou pR do fago Lambda). A expressão é disparada ao aumentar a temperatura de 30°C para 42°C, evitando o custo de reagentes químicos.
- 4) Sistema Arabinose (pBAD): Oferece um controle muito mais fino ("titulável"). A quantidade de proteína produzida é proporcional à dose de L-arabinose adicionada, sendo excelente para proteínas tóxicas.
- 5) Indução por Titulação de Magnésio ou Fosfato: Utilizado em biorreatores industriais para reduzir custos, onde a exaustão de um nutriente no meio dispara o promotor específico.
- 6) Como o pET-26b(+) foca em secreção, o IPTG é o padrão, mas a autoindução costuma ser superior para melhorar o enovelamento no periplasma.

Purificação da proteína



Questões

- 1- Como é feita a construção de um vetor para expressão de proteínas recombinantes ?
- 2 – Cite métodos de indução da expressão de acordo com o vetor utilizado.