

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Expressão de proteínas recombinantes em bactérias

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

(NHZ6006-18)



Universidade Federal do ABC

De busca no pubmed

- ▶ Para sistema de expressão em bactérias: 50655 artigos

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 recombinante em quantidade (mini ou midiprep).
4. Preparo das células competentes de expressão recombinantes.
5. Cultura das células com o constructo recombinante para expressão das proteínas, após a transformação.
6. Purificação e avaliação da expressão.

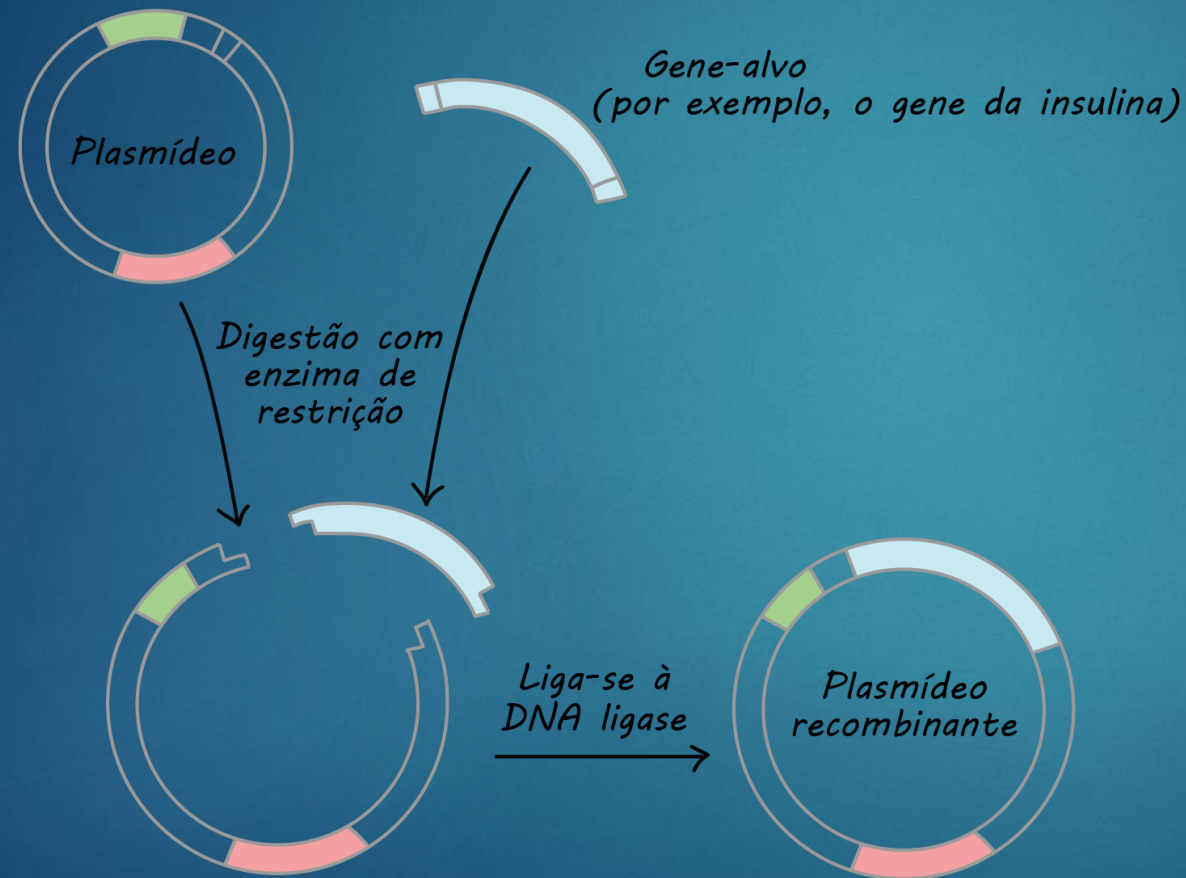
Comparativos dos sistemas de expressão em microorganismos

Parâmetro	Bactéria (<i>E.coli</i>)	Levedura (<i>Pichia pastoris</i>)
Tempo de expressão	Horas	Dias
Vetor insere-se no DNA genômico	Não – plasmídeo	Sim
Transformação da célula competente	Choque térmico – química. Eletroporação	Choque térmico – química. Eletroporação
Indução da expressão	IPTG – NaCl – Temperatura	Metanol
Proteínas ou peptídeos de fusão	Sim	Sim

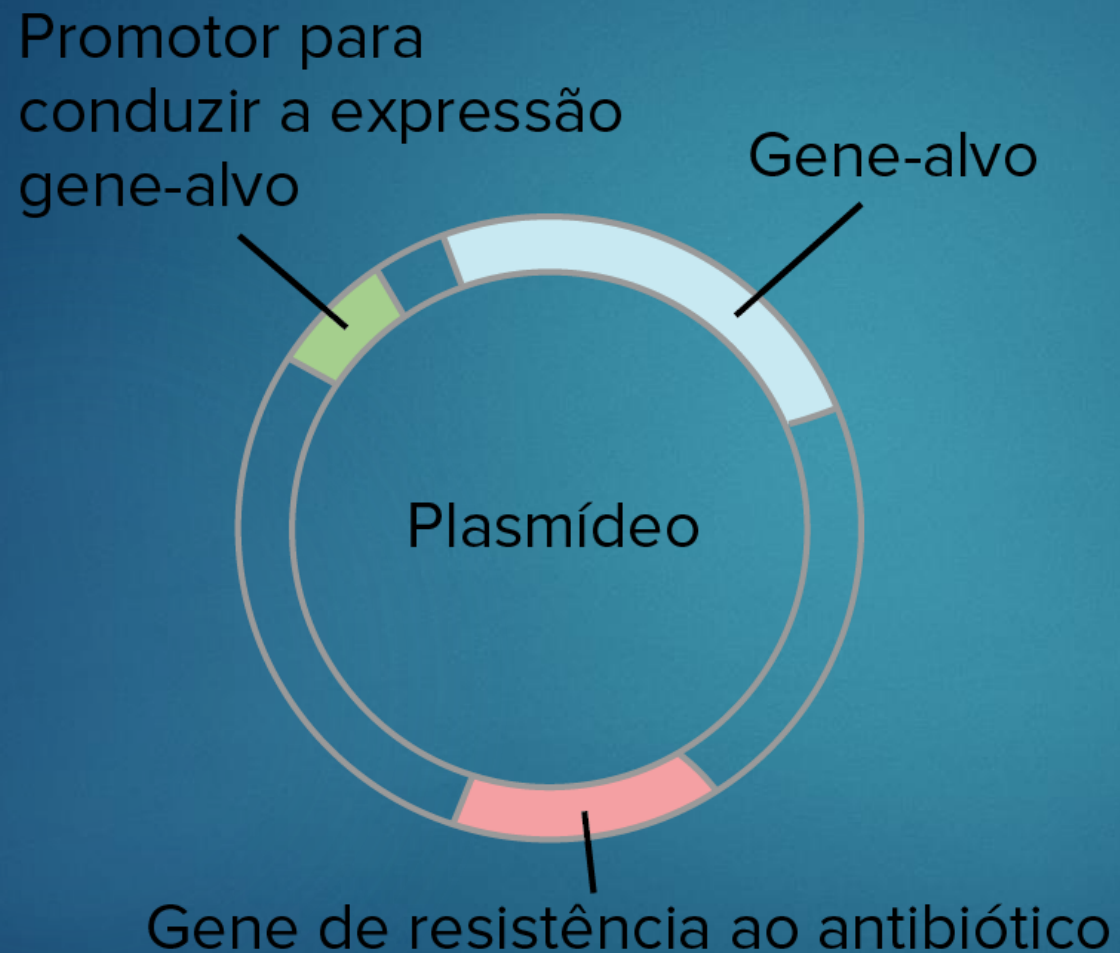
1 – Amplificação do gene e inserção no vetor

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)).

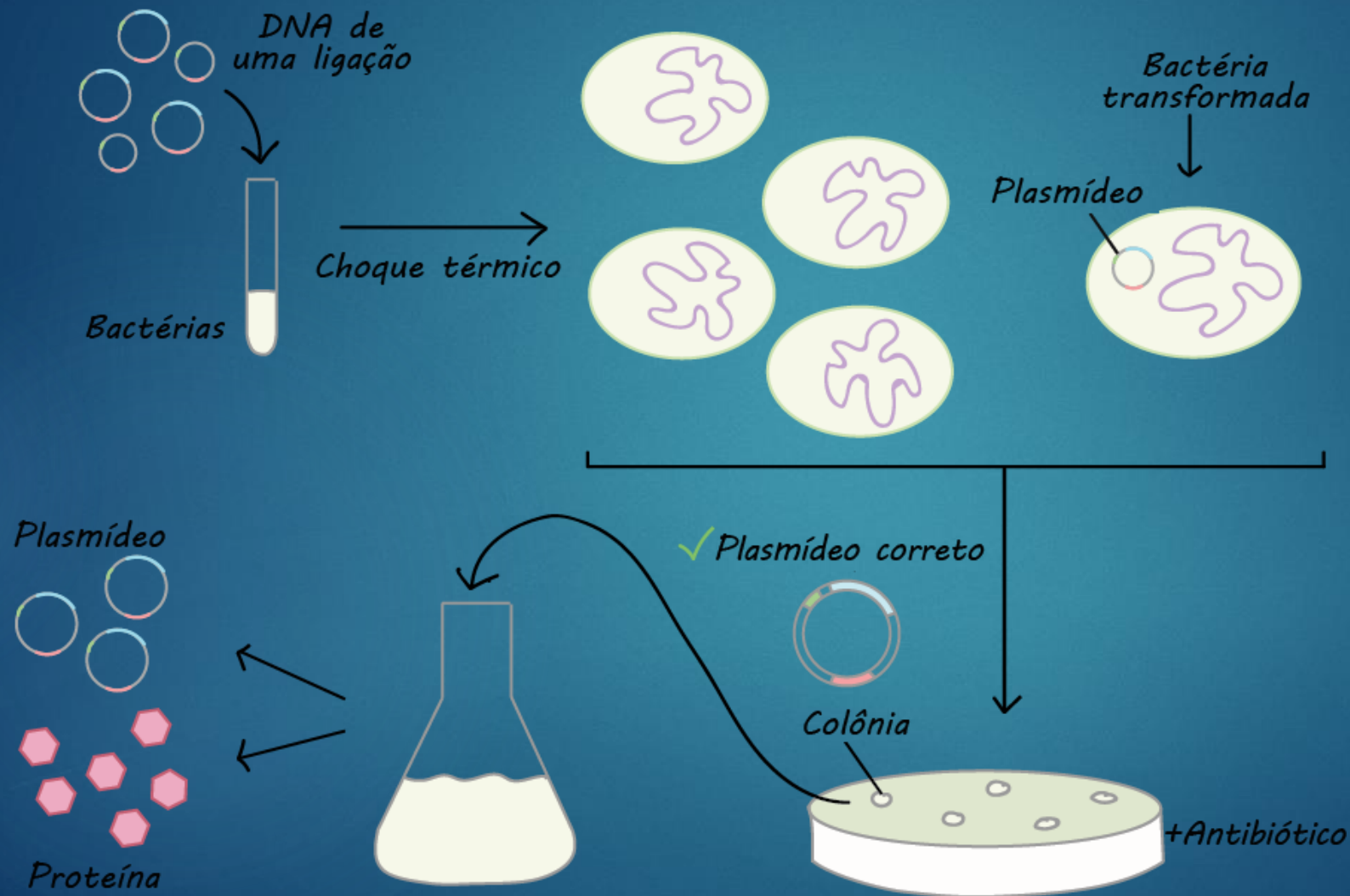
Inserção do fragmento amplificado no vetor



Vetor e inserto



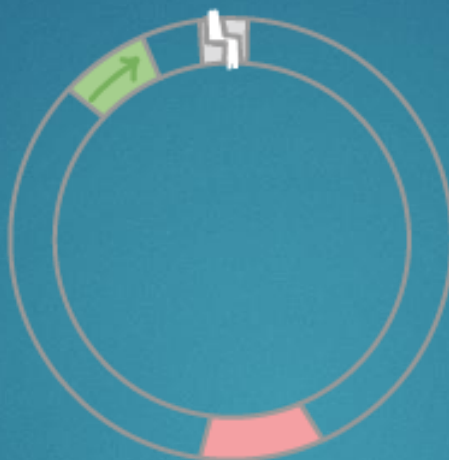
Multiplicação do constructo



Verificar a clonagem



✓ O gene se encaixa na direção correta

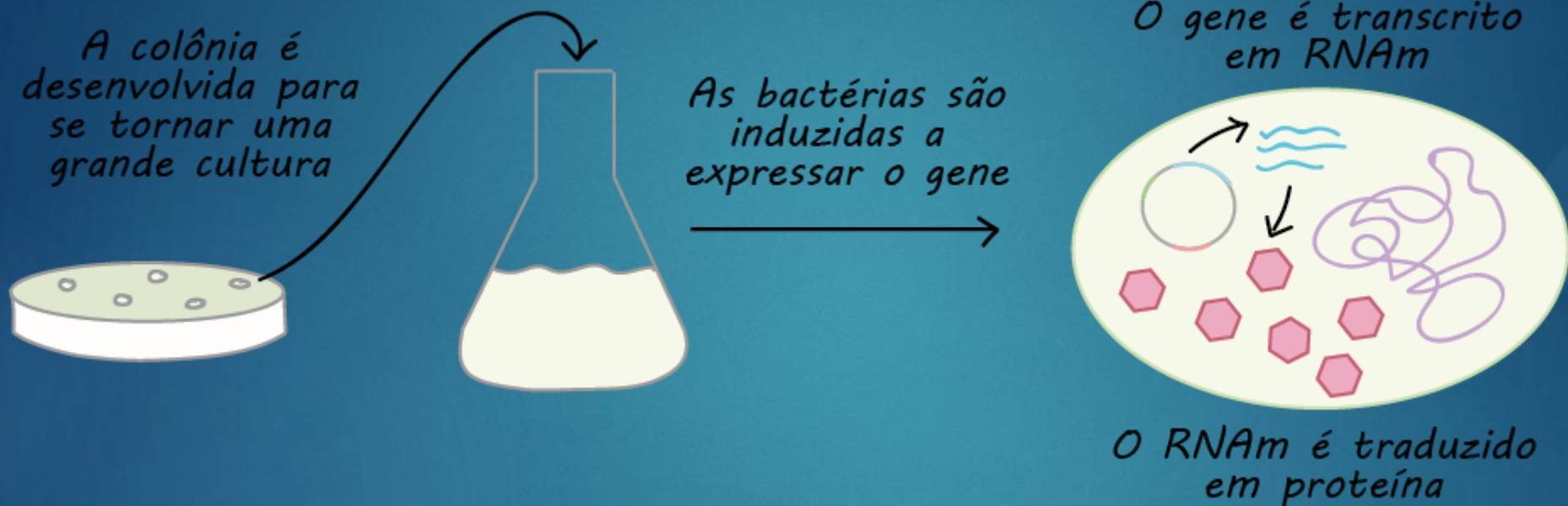


✗ O plasmídeo se fecha

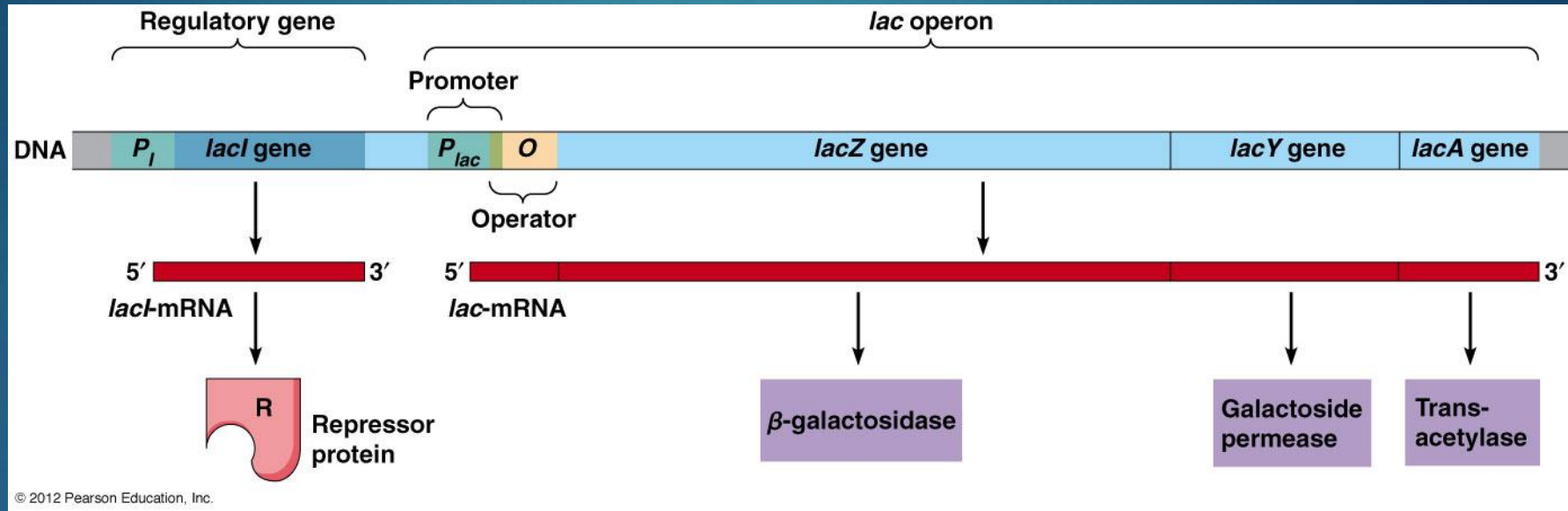


✗ O gene se encaixa na direção contrária

Expressão da proteína

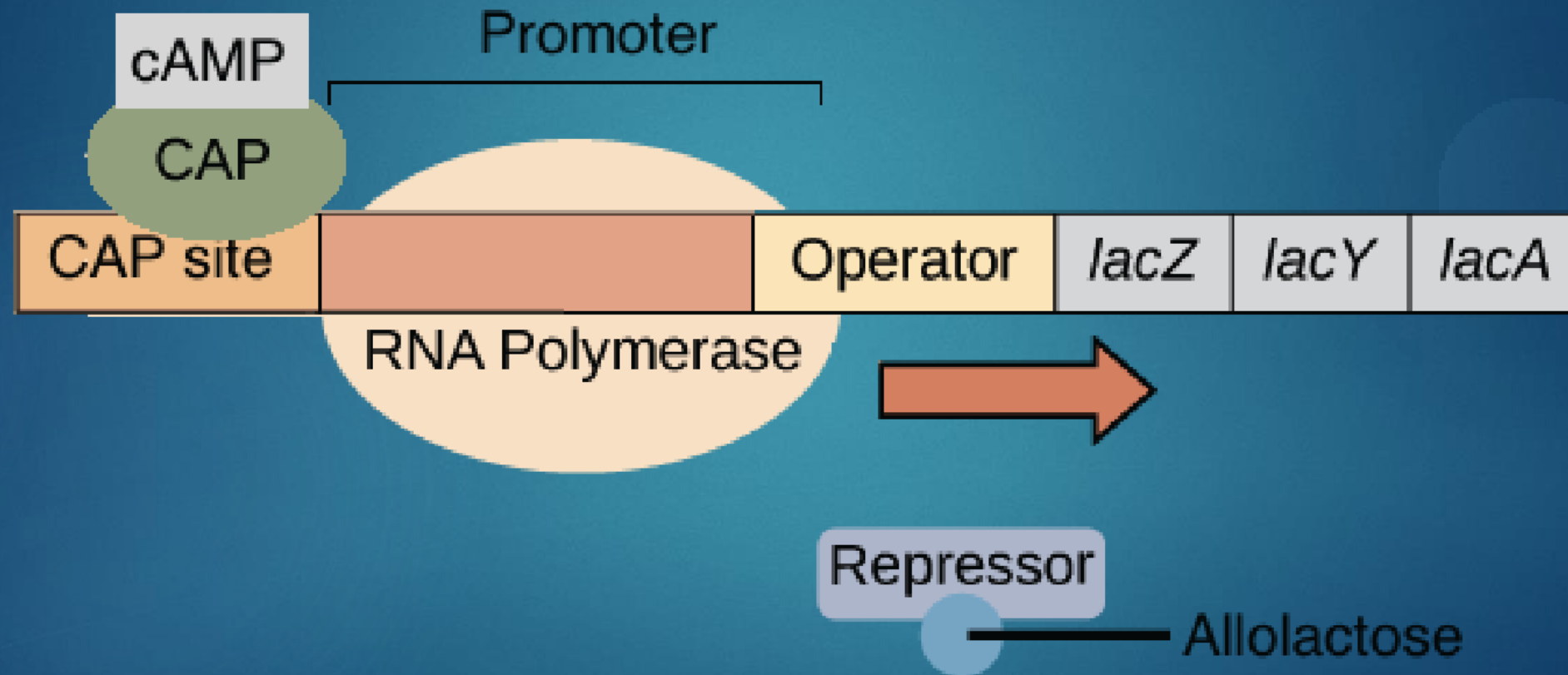


Operon Lac

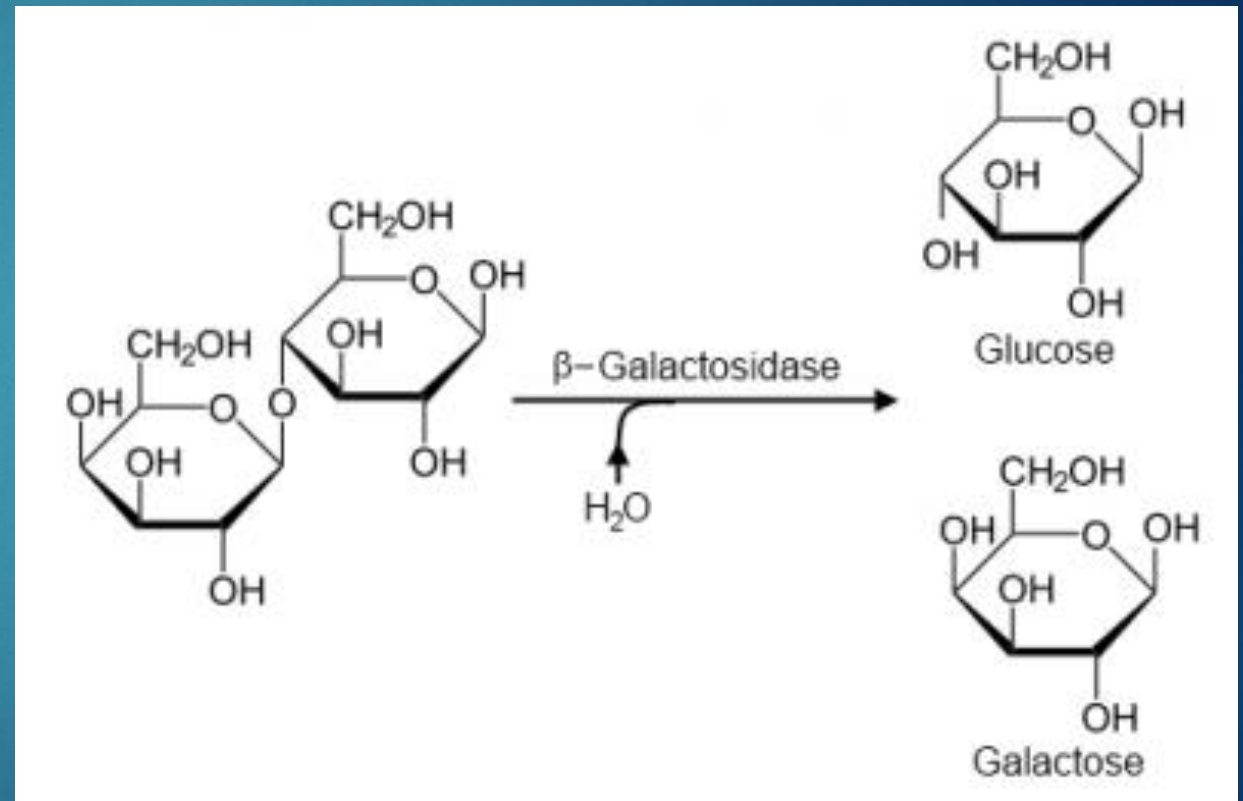
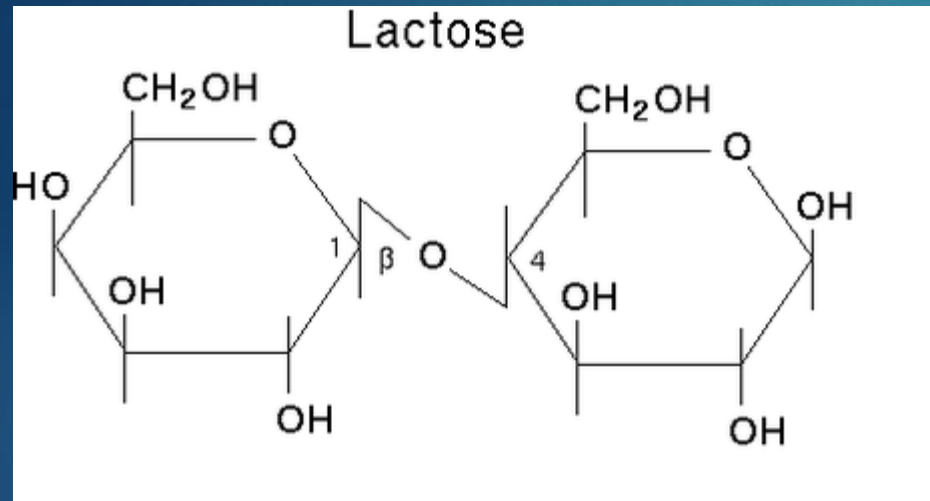


Operon Lac

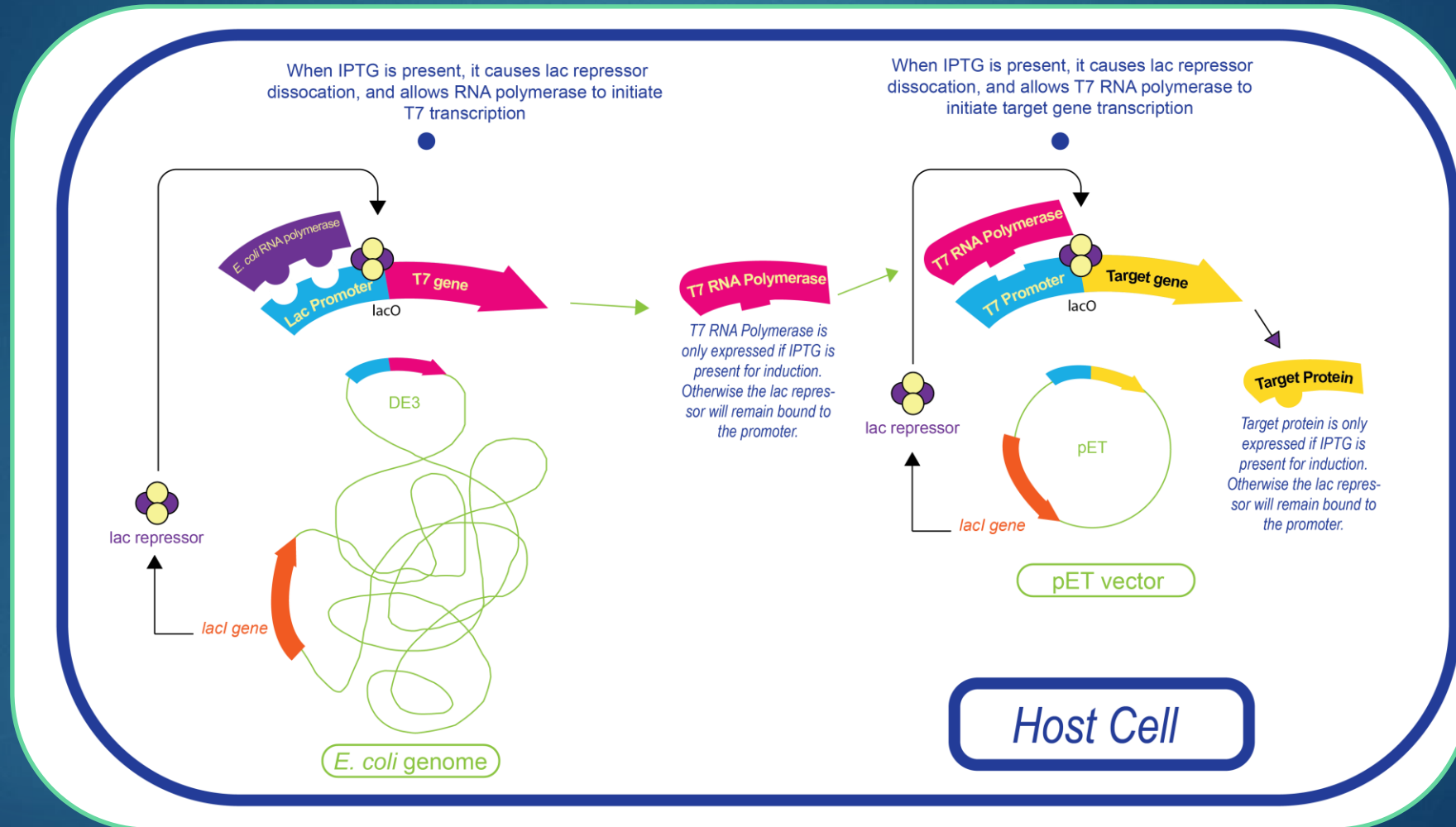
Glucose absent, lactose present:



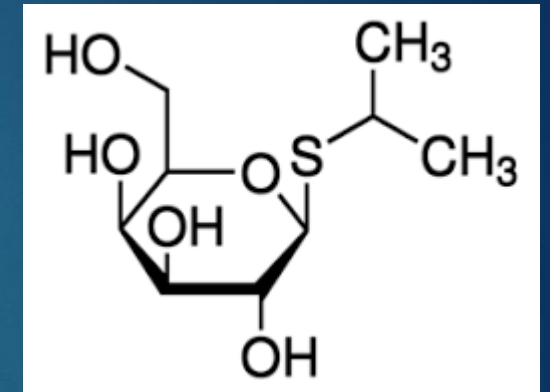
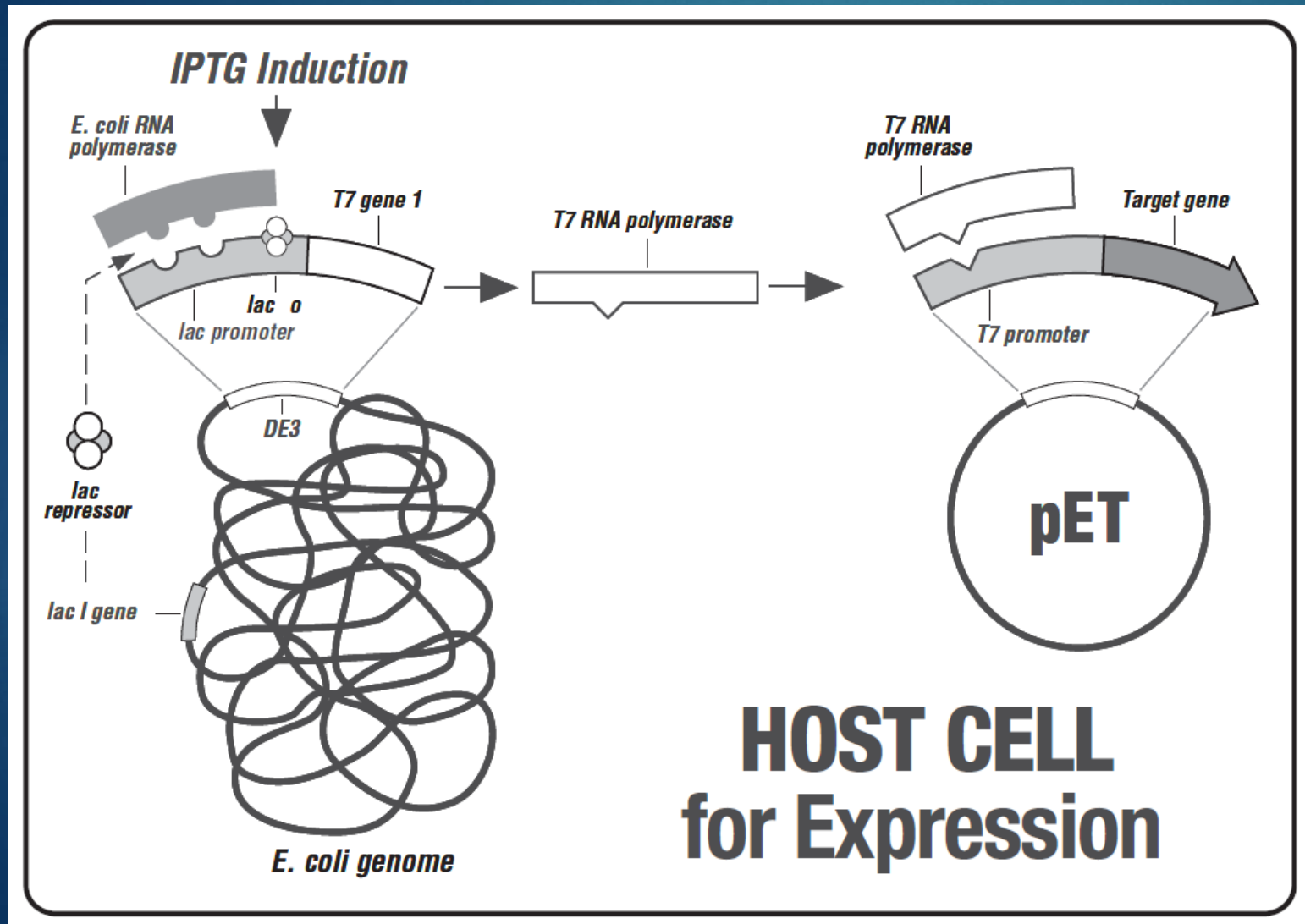
Operon Lac



Uso do operon Lac no vetor



PET system



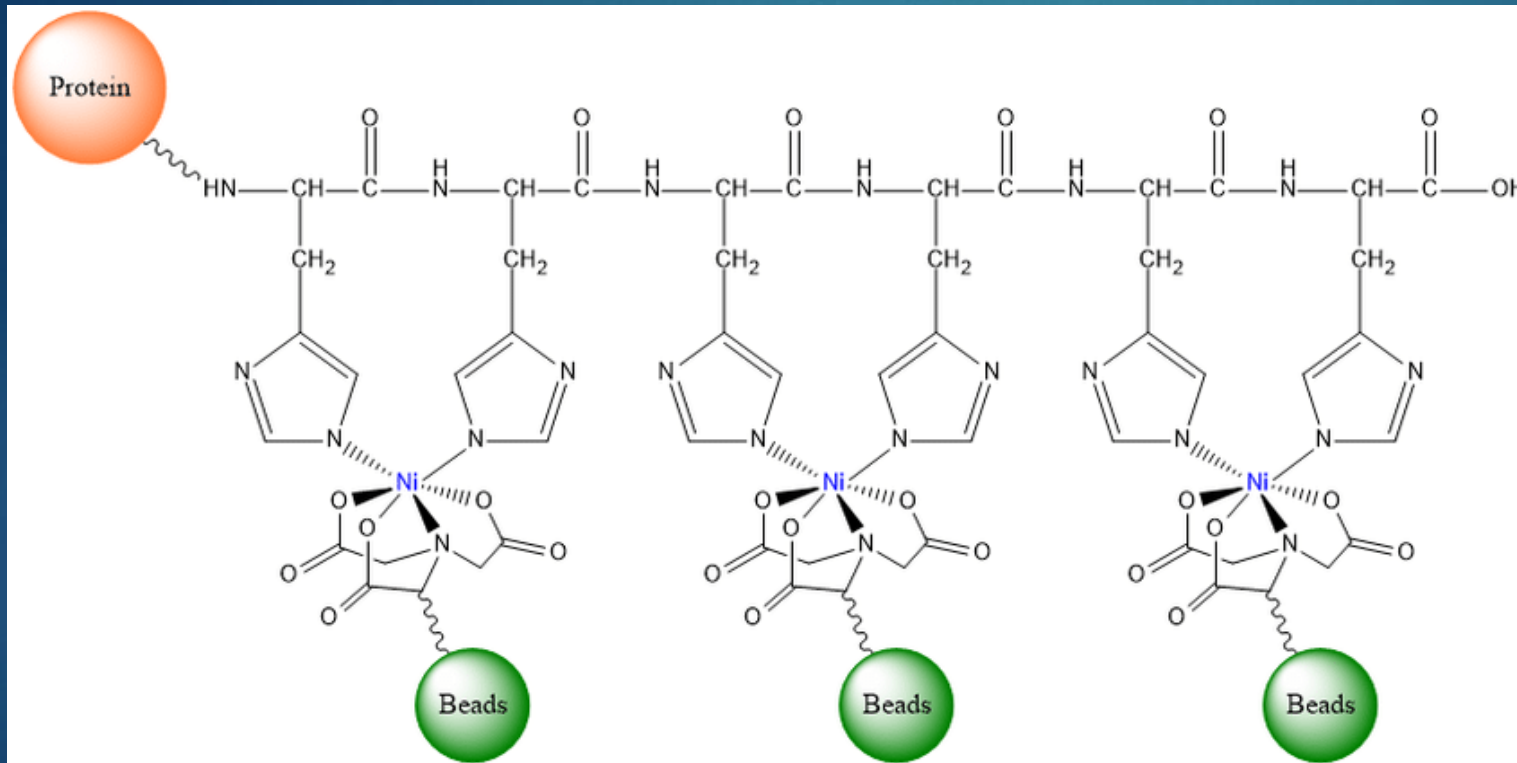
Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

Caudas de Fusão

- Cauda de Histidina (6 histidinas) - purificação
- GST (glutathione S-transferase) – proteína - purificação
- SUMO – proteína (Solubilidade)
- AXX ou XXA proteínas (Solubilidade)

Caudas de Fusão

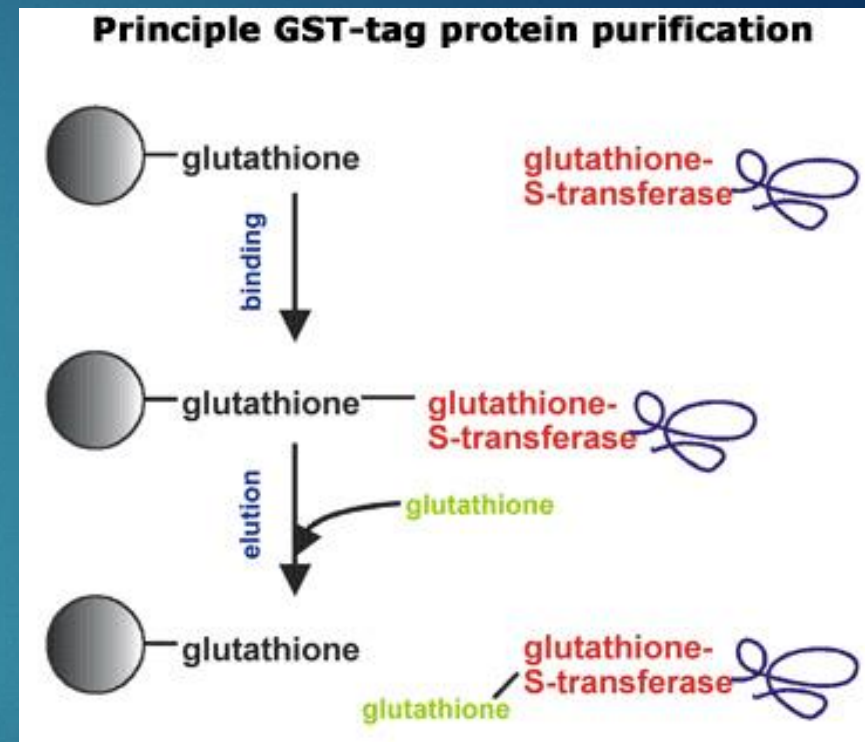
Ex: Cauda de Histidina



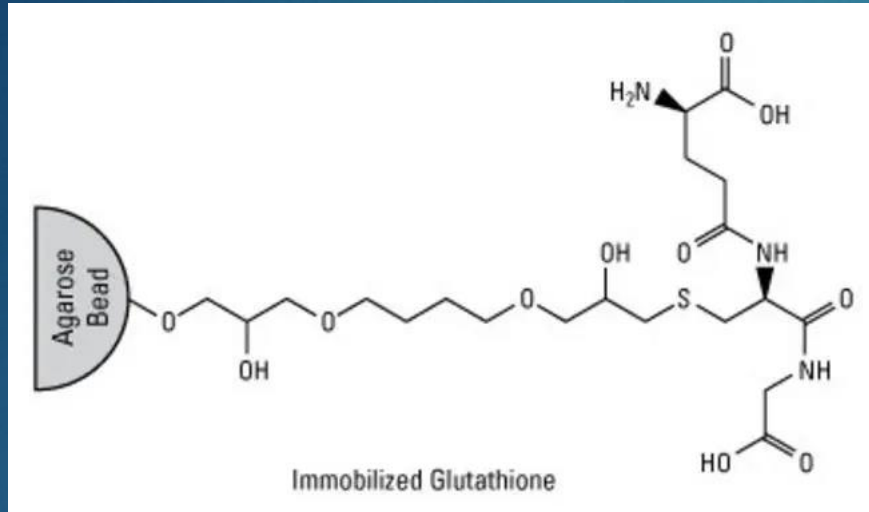
Caudas de Fusão

Ex:

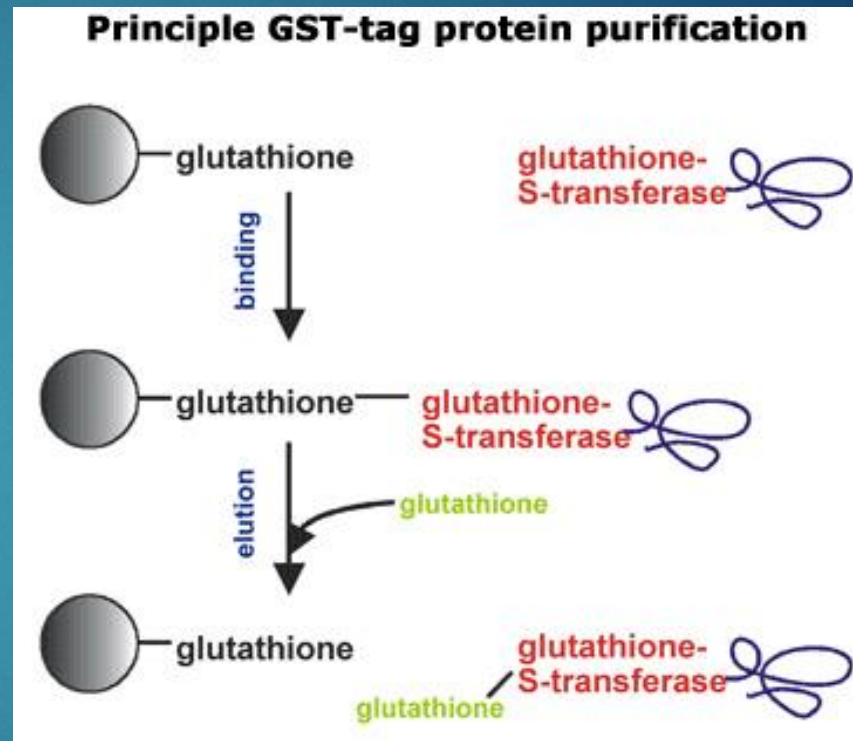
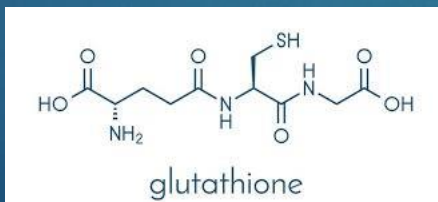
A glutathione S-transferase (GST) é uma proteína de 211 aminoácidos que é encontrada na maioria dos organismos. A GST é frequentemente integrada nos vetores de expressão para produzir a cauda de fusão dentro dos sistemas de expressão de proteínas de *E. coli*. A cauda de GST é uma cauda proteica grande de aproximadamente 26 kDa, e pode ser expressa em células de bactérias, leveduras, mamíferos e insetos. A cauda de GST é vantajosa quando é necessário proteger a proteína recombinante da clivagem da protease intracelular, e quando há a necessidade de aumentar a solubilidade da proteína marcada. Além disso, a proteína GST fornece uma cauda de alta afinidade para fácil purificação e para experimentos de pull-down utilizando resinas de afinidade baratas que são realizadas em condições brandas de diluição.



Caudas de Fusão



ácido glutâmico, cisteína e glicina,



Cepas de expressão - bactérias

Control	Vector	Host strain	Selection	Promoter	Fusion tags	Protease site	Insert (protein size)	Included with vector/series	Cat. No.
A	pET-14b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7	His•Tag [®]	T	β-gal 118kDa	pET-3, 5, 12, 14b, 17b, 17xb, 20b, 23	69674
B	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	T	β-gal 118kDa	pET-11, 15b, 21, 22b, 25b	69257
C	pET-16b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	X	β-gal 119kDa	pET-16b	69675
D	pET-19b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	E	β-gal 119kDa	pET-19b	69676
E	pET-28b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag T7•Tag [®]	T	β-gal 119kDa	pET-9, 24, 26b, 27b, 28	69258
F	pET-29b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	S•Tag [™]	T	β-gal 119kDa	pET-29	69259
G	pET-30b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag S•Tag	T, E	β-gal 121kDa	pET-30	69554
H	pET-31b(+)	BLR(DE3)pLysS	amp cam, tet	T7lac	KSI		none 14.8kDa	pET-31b	69966
J	pET-32a(+)	BL21(DE3)	amp	T7lac	Trx•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 20.4kDa	pET-32	69030
K	pET-34b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	CBD _{clm} •Tag S•Tag	T, E	β-gal 138kDa	pET-34b, 35b, 36b, 37b, 38b	70125
L	pET-39b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	DsbA•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 32.2kDa	pET-39b, 40b	70463
M	pET-33b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag PKA site T7•Tag	T	β-gal 120kDa	pET-33b	70514
N	pET-41b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	GST•Tag [™] His•Tag S•Tag	T, E	none 35.6kDa	pET-41, 42	70535
O.1*	pET-43.1b(+)	BL21(DE3)	amp	T7lac	Nus•Tag [™] His•Tag S•Tag HSV•Tag [®]	T, E	none 66.4kDa	pET-43.1, 44	70965

Abbreviations: amp = ampicillin or carbenicillin, kan = kanamycin, cam = chloramphenicol, tet = tetracycline

T = thrombin, X = Factor Xa, E = enterokinase

* Induction control O (70833-3) has identical characteristics as O.1 with the exception that pET-43b(+) was provided.

Cepas de expressão - bactérias

Control	Vector	Host strain	Selection	Promoter	Fusion tags	Protease site	Insert (protein size)	Included with vector/series	Cat. No.
A	pET-14b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7	His•Tag®	T	β-gal 118kDa	pET-3, 5, 12, 14b, 17b, 17xb, 20b, 23	69674
B	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	<i>T7lac</i>	His•Tag	T	β-gal 118kDa	pET-11, 15b, 21, 22b, 25b	69257
C	pET-16b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	<i>T7lac</i>	His•Tag	X	β-gal 119kDa	pET-16b	69675
D	pET-19b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	<i>T7lac</i>	His•Tag	E	β-gal 119kDa	pET-19b	69676
E	pET-28b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	His•Tag T7•Tag®	T	β-gal 119kDa	pET-9, 24, 26b, 27b, 28	69258
F	pET-29b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	S•Tag™	T	β-gal 119kDa	pET-29	69259
G	pET-30b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	His•Tag S•Tag	T, E	β-gal 121kDa	pET-30	69554
H	pET-31b(+)	BLR(DE3)pLysS	amp cam, tet	<i>T7lac</i>	KSI		none 14.8kDa	pET-31b	69966
J	pET-32a(+)	BL21(DE3)	amp	<i>T7lac</i>	Trx•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 20.4kDa	pET-32	69030
K	pET-34b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	CBD _{clos} •Tag S•Tag	T, E	β-gal 138kDa	pET-34b, 35b, 36b, 37b, 38b	70125

Cepas de expressão - bactérias

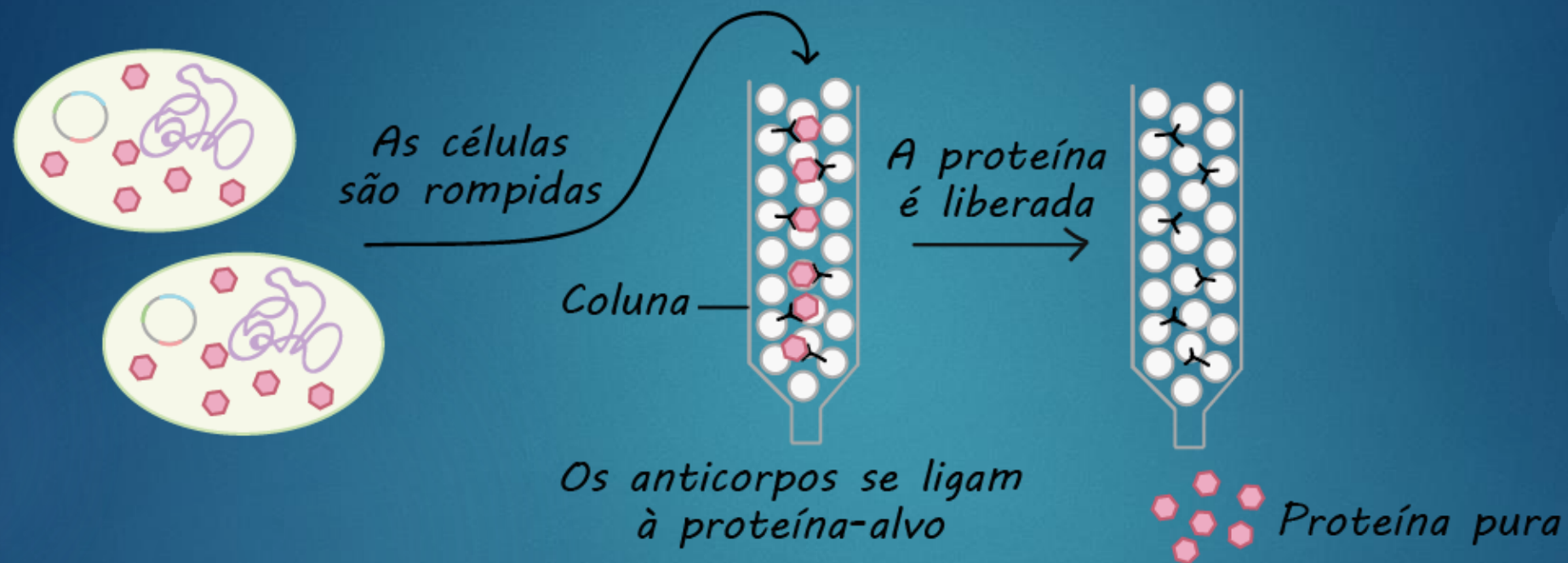
L	pET-39b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	DsbA•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 32.2kDa	pET-39b, 40b	70463
M	pET-33b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	His•Tag PKA site T7•Tag	T	β-gal 120kDa	pET-33b	70514
N	pET-41b(+)	BL21(DE3)	kan	<i>T7lac</i>	GST•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 35.6kDa	pET-41, 42	70535
O.1*	pET-43.1b(+)	BL21(DE3)	amp	<i>T7lac</i>	Nus•Tag™ His•Tag S•Tag HSV•Tag®	T, E	none 66.4kDa	pET-43.1, 44	70965

Abbreviations: amp = ampicillin or carbenicillin, kan = kanamycin, cam = chloramphenicol, tet = tetracycline

T = thrombin, X = Factor Xa, E = enterokinase

* Induction control O (70833-3) has identical characteristics as O.1 with the exception that pET-43b(+) was provided.

Purificação da proteína



Expressão no PET system da novagen

- ▶ 1 – Usa a T7RNA polimerase de bacteriófago
- ▶ 2 – A célula hospedeira precisa ter o genoma da T7RNA polimerase ou receber um plasmídeo com o gene da T7RNA polimerase.
- ▶ 3 – A indução ocorre por uso do IPTG (liga-se ao repressor LACI e permite a expressão do gene sobre o promotor no plasmídeo)

Expressão no PET system da novagen

- ▶ [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-26b\(%2B](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-26b(%2B)

Transformação de bactérias competentes

- ▶ Por eletroporação
- ▶ Por choque térmico

vetor pET 26 B - Novagen

- ▶ vetor pET 26 B - Novagen - Resistência Kan R
- ▶ solução STOCK: Kanamicina 30 mg/mL
- ▶ para uso: 30 µg/mL

- ▶ Pesar 0,03g de Kanamicina para 1 mL de água miliQ
- ▶ $30000\text{ }\mu\text{g}/30\text{ }\mu\text{g} = 1000\text{X}$ concentrado -> Filtrar

Bactérias para expressão

- ▶ BL21 (DE3)
- ▶ **General description**
- ▶ The BL21(DE3) Chemically Competent strains contain the phage T7 RNA polymerase gene linked to the IPTG-inducible promoter, for use with any expression plasmid containing the T7 promoter. (Sigma)

Preparo de placas de meio de cultura LB

- ▶ Preparo de placas LB ágar
- ▶
- ▶ 5g de triptona
- ▶ 2,5 g de extrato de levedura
- ▶ 5g de NaCl
- ▶ 7,5g de ágar
- ▶ 500 mL de H₂O
- ▶
- ▶ Autoclavar e plaquear

Preparo de meio de cultura LB

- ▶ Preparo do meio LB (Luria Broth)
- ▶ 5g de triptona
- ▶ 2,5 g de extrato de levedura
- ▶ 5g de NaCl
- ▶ 500 mL de H₂O
- ▶ Autoclavar e manter em TA

Transformação de bactérias competentes

- ▶ Transformação por choque térmico
- ▶ 200 μL de DH5a competentes + DNA
- ▶ 1. Deixar o tubo com as bactérias no gelo por 30 min. Colocar o DNA no tubo
- ▶ 2. Colocar no banho maria a 42°C (1 min e 30 seg)
- ▶ 3. Colocar no gelo por 2 min
- ▶ 4. Add 800 μL do meio SOC (ou LB)
- ▶ 5. Incubar tubos por 45 min a 37°C .
- ▶ 6. Plaquear
- ▶ Duas placas: 10% ou 100 μL do meio, plaquear depois, centrifugar, máx 2000 rpm, formar pellet, descartar o excesso, deixar aproximadamente 100 μL , ressuspender o pellet e plaquear. Estufa 37°C

Projeto

1. Definir uma proteína que gostaria de realizar a expressão, justificar o porque desta escolha, qual a finalidade, o que quer estudar da proteína.
2. Definir um sistema de expressão (bactéria ou levedura), justificar porque está escolhendo o sistema.
3. Definir um vetor de expressão, quais as características deste vetor, qual o gene de resistência presente, qual antibiótico será utilizado para a seleção, qual a forma de indução.
4. Como a proteína será purificada?
5. Elaborar um projeto escrito – submissão até o fim do curso.
6. Elaborar uma apresentação em slides.

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

(NHZ6006-18)



Universidade Federal do ABC

De busca no pubmed

Para sistema de expressão em leveduras: 20948 artigos

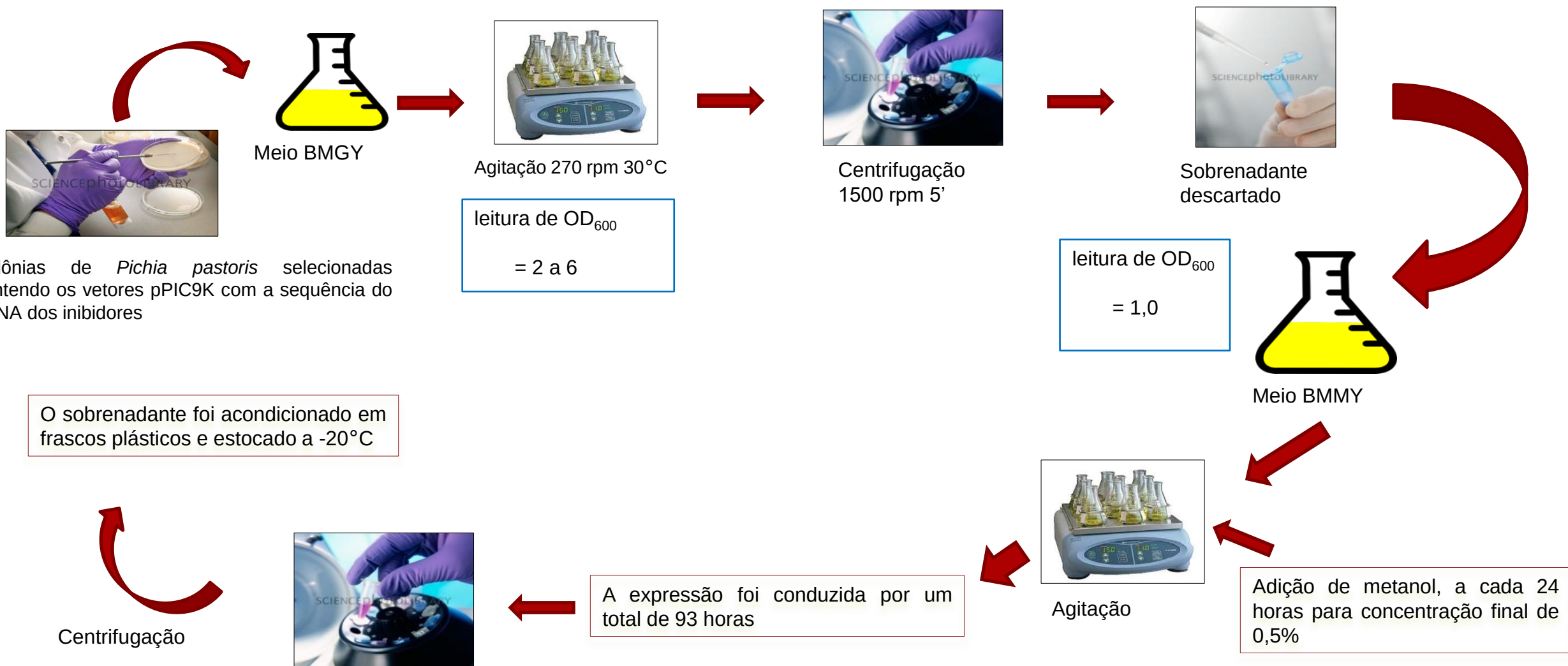
ETAPAS DA EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROORGANISMOS

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

Comparativos dos sistemas de expressão em microorganismos

Parâmetro	Bactéria (<i>E.coli</i>)	Levedura (<i>Pichia pastoris</i>)
Tempo de expressão	Horas	Dias
Vetor insere-se no DNA genômico	Não – plasmídeo	Sim
Transformação da célula competente	Choque térmico – química. Eletroporação	Choque térmico – química. Eletroporação
Indução da expressão	IPTG – NaCl – Temperatura	Metanol
Proteínas ou peptídeos de fusão	Sim	Sim

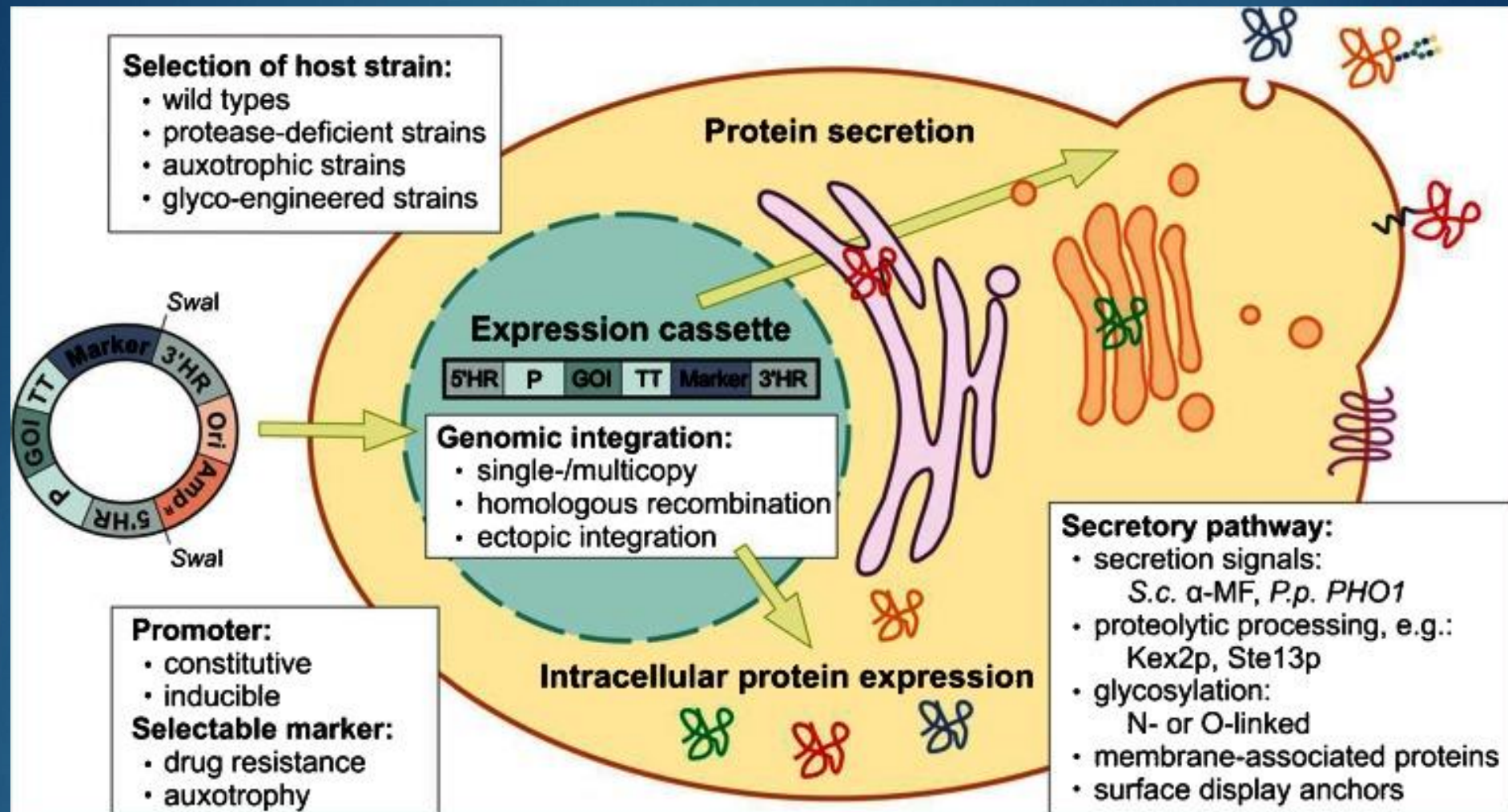
Expressão em Leveduras



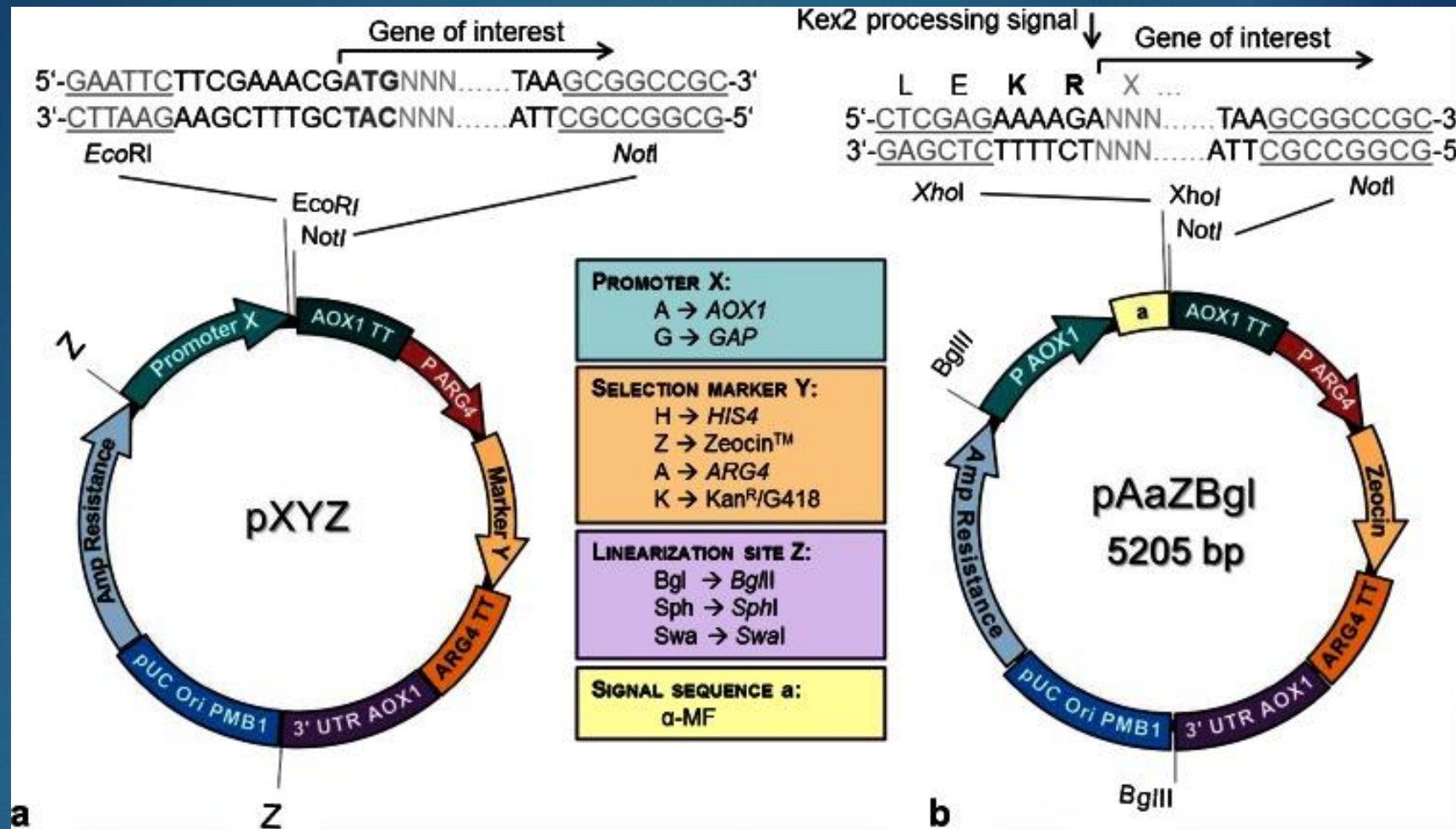
EXPRESSÃO PROTÉICA EM *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é um sistema de grande sucesso para a produção de uma ampla variedade de proteínas recombinantes. Vários fatores contribuíram para sua rápida aceitação, dos quais os mais importantes incluem:

- (1) um promotor derivado do gene álcool oxidase I (AOX1) de *P. pastoris* que é especialmente adequado para a expressão controlada de genes heterólogos;
- (2) a semelhança das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular de *P. pastoris* às de *Saccharomyces cerevisiae*;
- (3) a forte preferência de *P. pastoris* pelo crescimento aeróbico, característica fisiológica que facilita muito sua cultura em altas densidades celulares em relação a leveduras fermentativas;



General considerations for heterologous gene expression in *P. pastoris*. Expression plasmids harbouring the gene(s) of interest (*GOI*) are linearized prior to transformation. Selectable markers (e.g., Amp^R) and origin of replication (*Ori*) are required for plasmid propagation in *E. coli*. The expression level of the protein of interest may depend on (i) the chromosomal integration locus, which is targeted by the 5' and 3' homologous regions (5'HR and 3'HR), and (ii) on the gene copy number. A representative promoter (*P*) and transcription terminator (*TT*) pair are shown. Proper signal sequences will guide recombinant protein for intracellular or secretory expression, and will govern membrane integration or membrane anchoring.



Novel 'Pichia Pool' plasmid sets for intracellular and secretory expression. **a** General features of pXYZ vector for intracellular expression. Letters refer to the choice of promoters (X), selection markers (Y), and restriction enzymes (Z) for linearization. Available elements are shown in boxes. The vector backbone harbours an ampicillin resistance marker and origin of replication for maintenance of the plasmid in *E. coli*. The GOI is *EcoRI*–*NotI* cloned directly after the promoter of choice. The Kozak consensus sequence for yeast (i.e., CGAAACG), should be restored between the *EcoRI* cloning site and the start codon of the GOI in order to achieve optimal translation. In addition, sequence variation within this region will allow fine-tuning translation initiation efficiency. Expression in *P. pastoris* is driven either by the methanol inducible AOX1 or the constitutive GAP promoter. Positive clones can be selected for by antibiotic resistance (i.e., to Zeocin™ or geneticin sulphate) or by selection for His or Arg prototrophy. Selection marker expression is uniformly driven by the ARG4 promoter–terminator pair. **b** Plasmid pAaZBgl from 'Pichia Pool' is shown as an example of a vector made for secretory expression encoding *S. cerevisiae* α-MF signal sequence in front of the GOI cloning site. The Kex2 processing site AAAAGA should be restored between the *XhoI* cloning site and the fusion point of the GOI