

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EXPRESSÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM *Escherichia coli* SOB O CONTROLE
DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DO *OPERON LAC***

VANESSA CORRÊA FRANCO

MANAUS – AM

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VANESSA CORRÊA FRANCO

**EXPRESSÃO DE FOSFATASE ALCALINA EM *Escherichia coli* SOB O CONTROLE
DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DO *OPERON LAC***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS – AM

2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F825e Franco, Vanessa Corrêa
Expressão de fosfatase alcalina em Escherichia coli sob o controle do sistema de regulação do operon lac / Vanessa Corrêa Franco. 2014
58 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. expressão enzimática. 2. Fosfatase Alcalina. 3. Operon lac. 4. escherichia coli (bactéria) . 5. sistema de regulação. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico:

Ao Grande Arquiteto do Universo que me deu a fé que eu precisava para acreditar que todo movimento é e gera progresso, que nada escapa da Lei de Evolução e que a paciência, persistência e força de vontade são de extrema importância nessa jornada.

“Inteligente significa já saber sentir, pensar e agir integradamente segundo o que indica concomitantemente a ciência, através do método preciso pela ordem dos fatos; a filosofia, através do rigor e exatidão das deduções no mínimo óbvias, lógicas e racionais; bem como a religião, através da noção exata de moral, ética e estética elevadas, aliadas à noção exata de bons sentimentos.”
(Jair Tércio)

“Onde não falta Vontade, existe sempre um caminho.”

(J.R.R. Tolkien)

AGRADECIMENTOS

Ao Pai pela vida e à Mãe Mestra e Serva Natureza pela Manutenção da Vida que permitiram o meu agir, e assim, meu movimento.

À minha família, especialmente minha mãe e meu marido, que foram meu amparo, minha força e o sentido de tudo para que eu acreditasse no meu potencial.

Aos amigos e irmãos que souberam ter paciência nos meus momentos de ausência, física ou mentalmente, e, além disso, me deram todo apoio emocional necessário para concluir mais uma etapa na minha vida.

Ao Mestre Dr. Spartaco Astolfi Filho que sempre que possível esteve ao meu lado para dividir um pouco da sua sabedoria e conhecimento científico, sempre paciente, e que com poucas palavras conseguia simplificar o complexo.

A todos os professores da pós-graduação que fizeram parte significativa na construção dos meus conhecimentos científicos e biotecnológicos.

Às professoras da minha graduação em Ciências Biológicas, que me inspiraram e influenciaram profissionalmente, e por elas, também, que estou aqui. Especialmente a Prof. Lucivana Mourão, Prof. Luciana Cassa e Prof. Roseane Moraes - vocês foram, são e sempre serão meu referencial e exemplo.

A todos os meus colegas de laboratório que compartilharam não só o mesmo espaço e tempo comigo, como também seus conhecimentos, suas alegrias, a amizade e a simpatia. Mas devo um agradecimento mais que especial à Enedina Assunção, à Anita Souza e ao Edson Júnior, pois sem o auxílio deles o caminho teria sido muito mais árduo.

Aos colegas de disciplinas que compartilharam momentos de dificuldades, de desespero e de vitória, é claro! Sempre provando que no final tudo há de dar certo.

Aos doutores desta banca, que prontamente aceitaram o convite para avaliar e enriquecer este presente trabalho.

À coordenação do PPGBIOTEC pelo auxílio e paciência nas questões administrativas, assim como os servidores da Secretária do PPGBIOTEC, especialmente à Nubiane Truicy, assim como a Ângela Neiva.

À queridíssima Dona Regina, pelos cafés e ouvidos sempre amorosos, que me animava toda tarde.

Ao CNPq pelo apoio e bolsa concedida.

E à todos aqueles que direta e indiretamente me auxiliaram a chegar onde cheguei, minha eterna e sincera gratidão.

RESUMO

A fosfatase alcalina tem como função catalisar a hidrólise de um fosfomonoéster, e assim, possui a propriedade de remover grupos de fosfatos 5' de DNA e RNA, o que faz dela uma importante ferramenta para engenharia genética. A expressão do gene da fosfatase alcalina de *E. coli* foi obtida clonando-se o gene no plasmídeo pBR322. Posteriormente o gene estrutural *phoA* foi transferido para o vetor pAC92, derivado do pUC18, onde sua expressão ficou parcialmente regulada, originando o plasmídeo recombinante capaz de programar em *E. coli* maior nível de expressão. Porém este vetor possui a necessidade do controle da expressão com glicose no meio, do contrário, o excesso da enzima no periplasma causa a morte celular das hospedeiras. Em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologias de DNA da UFAM um vetor denominado pULA foi construído a partir da obtenção da região promotora do pAC92, com operador restaurado, clonado em um vetor denominado de pUN, este sendo o pUC18 modificado sem o gene de β -galactosidase e sem sua região promotora/operadora de origem. O presente trabalho descreve a expressão da fosfatase alcalina de *E. coli* por meio do sistema de expressão regulável do pULA, assim como a purificação desta enzima. Dessa forma, o gene *phoA* foi subclonado no vetor pULA com sucesso, dando origem ao vetor pUNF, que se apresentou estável e funcional, regulado pela indução do IPTG. A melhor expressão da enzima no sistema em questão, ocorreu em meio com concentração de 0,05% de glicose, com um 1mM de IPTG e após 18 horas de indução.

ABSTRACT

Alkaline phosphatase function is to catalyze the hydrolysis of a phosphomonoester, and thus has the property of removing phosphate groups 5' DNA and RNA, making it an important tool for genetic engineering. Expression of the *E. coli* alkaline phosphatase gene was obtained by cloning the gene into plasmid pBR322. Subsequently *phoA* structural gene was transferred to the vector pAC92 derivative of pUC18 where its expression was regulated partly yielding the recombinant plasmid capable of programming in *E. coli* highest level of expression. But this vector has the need to control the expression with glucose medium, otherwise the excess of the enzyme in the periplasm causes cell death of the host. In work carried out in the Laboratory of Technologies of DNA called a vector UFAM Pula was built from obtaining pAC92 promoter region, restored operator, cloned in a vector called pUN, this being the modified pUC18 lacking the gene for β - galactosidase and without its promoter region / operator of origin. This paper describes the expression of the alkaline phosphatase of *E. coli* by means of the adjustable jumps expression system and purification of this enzyme. Thus, the *phoA* gene was subcloned into the vector jumps successfully, yielding the vector pUNF, which appeared stable and functional, regulated by the induction of IPTG. The best expression of the enzyme in the system in question occurred in the middle with a concentration of 0.05 % glucose, with 1 mM IPTG and after 18 hours of induction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS:

Figura 01 – Modelo de Fosfatase Alcalina de *E. coli* em 3D.

Figura 02 – Esquema da hidrólise de fosfomonoésteres catalisada pela Fosfatase Alcalina.

Figura 03 – Esquema da reação de clivagem do fosfato do p-nitrofenilfosfato catalizado pela fosfatase alcalina.

Figura 04 – Esquema estrutural do operon *lac* e das regiões reguladoras.

Figura 05 – Esquema e funcionamento do operon *lac* e das proteínas que influenciam no sistema.

Figura 06 – Representação da composição principal de um vetor de expressão.

Figura 07 – Mapas parciais dos vetores pCH2 (a) e pAC92 (b).

Figura 08 – Representação do vetor pPHOA originado a partir do pAC92 e do gene *phoA*.

Figura 09 – Esquema representativo do vetor pULA.

Figura 10 – Região PIS e seus elementos funcionais em destaque.

Figura 11 – Esquema dos métodos realizados no presente trabalho.

Figura 12 – Representação do vetor comercial pGEM[®]-T.

Figura 13 – Sequencia nucleotídica do múltiplo sítio do vetor pGEM-T.

Figura 14 – Perfil eletroforético de amostras dos vetores que foram utilizados.

Figura 15 – Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do gene *phoA*.

Figura 16 – Perfil Eletroforético dos produtos digeridos e purificados.

Figura 17 – Mapa físico do plasmídeo pUNF.

Figura 18 – Placas de clones transformados com o vetor pUNF.

Figura 19 - Placas de clones transformados com o vetor pUNF.

Figura 20 – Gel de poliacrilamida – SDS-PAGE com amostras de fosfatase alcalina após termoprecipitação e antes da cromatografia.

Figura 21 – Gel de poliacrilamida – SDS-PAGE com amostras de fosfatase alcalina após cromatografia.

- QUADROS:

Quadro 1 – Situações que podem ocorrer na célula e como o *operon lac* responde a elas.

Quadro 2 – Reagentes utilizados na PCR, as suas concentrações finais e volumes utilizados nesse protocolo.

Quadro 3 – Reagentes utilizados na primeira digestão do pULA com *HindIII*.

Quadro 4 - Reagentes utilizados na primeira digestão do pGEM-T com *HindIII*.

Quadro 5 – Reagentes utilizados na segunda digestão do pULA com *BamHI*.

Quadro 6 – Reagentes utilizados na segunda digestão do pGEM-T+phoA com *BamHI*.

Quadro 7 – Reagente e os respectivos volumes para o sistema de ligação com o vetor comercial pGEM-T e o amplicon phoA.

Quadro 8 – Reagentes e seus respectivos volumes para o sistema de ligação com o vetor pULA com o amplicon phoA.

Quadro 9 – Reagentes utilizados na PCR de colônias, as suas concentrações finais e volume utilizado nesse protocolo.

Quadro 10 – Reagentes e seus respectivos volumes utilizados para o sistema de dosagens enzimáticas.

Quadro 11 - Reagentes e seus respectivos volumes para o sistema de reta padrão para P-NitroFenol.

- GRÁFICOS:

Gráfico 1 - Crescimento de *E. coli* com o plasmídeo pUNF em função de diferentes concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultivo.

Gráfico 2 – Reta padrão de ABS_{405nm} em função da concentração do P-NitroFenol e a equação da reta.

Gráfico 3 - Teste enzimático das amostras de clones com pUNF cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na ausência de IPTG (indutor).

Gráfico 4 - Teste enzimático das amostras de clones com pUNF cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na presença de 1mM de IPTG.

Gráfico 5 - Teste enzimático de clones com pUNF cultivados em 0,05% de glicose e diferentes concentrações de IPTG após 4 horas de indução.

Gráfico 6 - Teste enzimático de clones com pUNF cultivados em 0,05% de glicose e diferentes concentrações de IPTG após 16 horas de indução.

Gráfico 7 - Teste enzimático dos clones do pUNF cultivados e induzidos nas melhores condições testadas nos dois compartimentos: extra-celular (sobrenadante) e intra-celular (*pellet*).

Gráfico 8 - Atividade enzimática das frações purificadas de fosfatase alcalina.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Å – Ångström

°C – Celsius

g – Giros

g/l – Grama por litro

IPTG – Isopropil-tio-galactosídeo

kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

M – Molar

mM – milimolar

mg/mL – miligrama por mililitro

mL – Mililitro

mL/L – mililitro por litro

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanograma

nm – nanômetro

O.D. – Densidade óptica

pmol – picomol

rpm – Rotações por minuto

UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Enzimas.....	1
1.1.1 Fosfatase Alcalina.....	2
1.1.2 Utilidade da Fosfatase Alcalina na Biologia Molecular.....	4
1.2 Biologia Molecular e Expressão Gênica.....	5
1.2.1 O <i>Operon lac</i>	6
1.2.2 Vetores de Expressão.....	10
1.2.2.1 Expressão de Fosfatase Alcalina em <i>E. coli</i>	13
1.3 Produção e Purificação de Enzimas.....	16
2. OBJETIVO.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Esquema Experimental Realizado.....	19
3.2 Principais Materiais Utilizados.....	20
3.2.2 Linhagem Bacteriana e Meios de Cultura.....	20
3.2.2 Plasmídeos.....	20
3.2.2.1 pGEM [®] -T.....	20
3.2.2.2 pPHOA.....	22
3.2.2.3 pULA.....	22
3.2.3 Primers.....	22
3.2.4 Enzimas de Restrição.....	23
3.2.5 Soluções.....	23
3.3 Métodos Utilizados.....	24
3.3.1 Extração Plasmidial.....	24
3.3.2 Amplificação da Região Estrutural do gene da Fosfatase Alcalina por PCR.....	25
3.3.3 Sistema de Digestão Plasmidial.....	26
3.3.4 Purificação de DNA do Gel de Agarose por Eletroforese.....	28
3.3.5 Sistema de Ligação.....	29

3.3.5.1	Ligação do Amplicon <i>phoA</i> no PGEM®-T.....	29
3.3.5.2	Ligação do Amplicon <i>phoA</i> no pULA.....	29
3.3.6	Preparação de Bactérias eletrocompetentes.....	30
3.3.7	Transformação por Eletroporação.....	30
3.3.8	PCR de Colônias.....	31
3.3.9	Análise da Expressão Enzimática.....	32
3.3.9.1	Curva de Crescimento Bacteriano em Diferentes Concentrações de Glicose.....	32
3.3.9.2	Dosagem Enzimática.....	33
3.3.9.2.1	Análise da Expressão da Fosfatase Alcalina em Função das Condições de Ativação e Indução.....	34
3.3.9.2.2	Reta Padrão.....	34
3.3.10	Purificação da Fosfatase Alcalina de <i>E. coli</i>	35
3.3.10.1	Cultivo de <i>E. coli</i> transformada com pUNF.....	35
3.3.10.2	Extração da Enzima do periplasma e termoprecipitação de proteínas contaminantes.....	35
3.3.10.3	Diálise e Cromatografia de Troca Iônica.....	36
3.3.10.4	Análise das Frações por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1	Construção do Vetor pUNF.....	39
4.2	Amplificação da Região Estrutural do Gene da Fosfatase Alcalina por PCR.....	40
4.3	Isolamento do vetor pULA e do inserto <i>phoA</i>	41
4.4	Clonagem da Região Estrutural do Gene <i>phoA</i> no plasmídeo pULA.....	41
4.5	Transformação Genética.....	42
4.6	Análise e Melhoramento da Expressão da Enzima Fosfatase Alcalina.....	43
4.7	Purificação.....	50
4.8	Atividade Enzimática da Enzima.....	51
5.	CONCLUSÕES.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Enzimas

Muitos trabalhos com enzimas vêm sendo desenvolvidos desde a primeira vez que a catálise biológica foi descrita no final de 1700, com a digestão da carne pelas secreções do estômago. (Nelson & Cox, 2006).

Mas Voet & Voet *apud* Vanhanem (2001) afirmam que o termo “enzima” só começou a ser utilizado em 1876 com William Kuhne, e é derivado de uma palavra grega que significa “no fungo”, pois Kuhne queria descrever a ocorrência de algum princípio responsável pelos processos fermentativos na presença de leveduras.

Desde então, catalisadores altamente efetivos são alvos de grande interesse por parte da ciência e da tecnologia, onde a maioria, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de Ácidos Ribonucléicos (RNA) catalíticos, são proteínas. (Nelson & Cox, 2006).

Esse interesse ocorre por que ainda de acordo com Nelson & Cox (2006), as reações biológicas tendem a ser lentas sem a ação de catalisadores, já na presença dos mesmos, é proporcionado um ambiente específico dentro do qual as reações possam ocorrer mais rapidamente e de forma eficiente.

E além de atuarem em reações biológicas em um indivíduo vivo, as enzimas são importantes, também, em aplicações industriais. Estão presentes na produção de alimentos e bebidas, de fibras têxteis, na indústria de papel, na produção de etanol, na indústria farmacêutica e de cosméticos, na medicina em diagnósticos, entre outros nichos (Bon *et al.*, 2008).

Furigo Junior (2001) cita quais são as principais características das enzimas que as tornam tão importantes nas mais diversas áreas:

- São produtos biológicos;
- Possuem alto grau de especificidade;
- Suas reações são baratas e seguras;

- São altamente eficientes;
- Biodegradáveis e,
- Exigem um baixo consumo de energia.

1.1.1. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina de *E. coli* (EC. 3.1.3.1) é uma enzima ativa na forma homodimérica (figura 1), onde a cada monômero há a presença de um sítio ativo que estão a 32Å de distância um do outro (Boulangier & Kantrowitz, 2003).

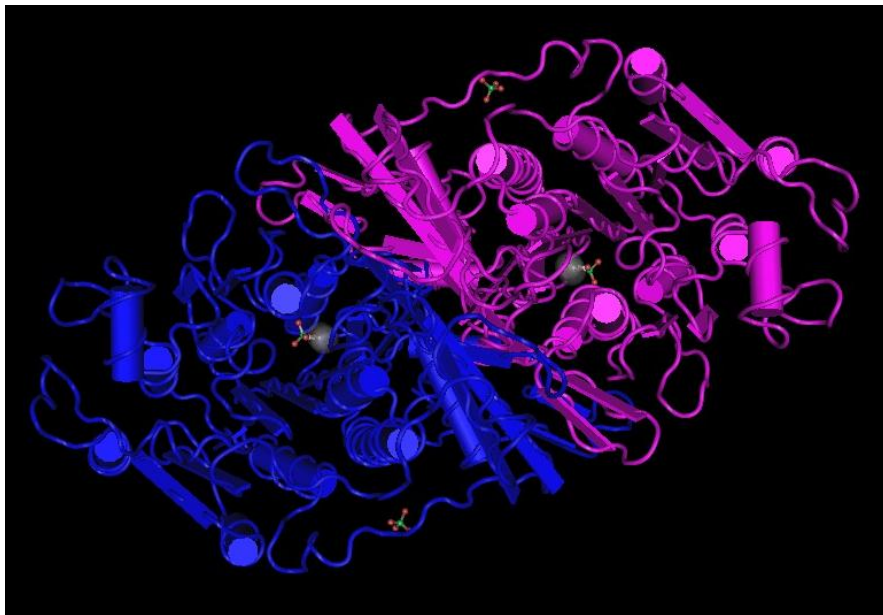


Figura 1 – **Modelo de Fosfatase Alcalina de *E. coli* em 3D.** Em azul e rosa estão os monômeros e em bolas cinzas estão os íons metálicos (MMDB).

É caracterizada como uma metaloenzima, pois emprega um íon metálico de magnésio e dois de zinco, para realizar seu papel, que é o de catalisar a hidrólise de um fosfomonoéster em um fosfato inorgânico e mais um álcool correspondente (figura 2) (Holtz *et al.*, 2000).

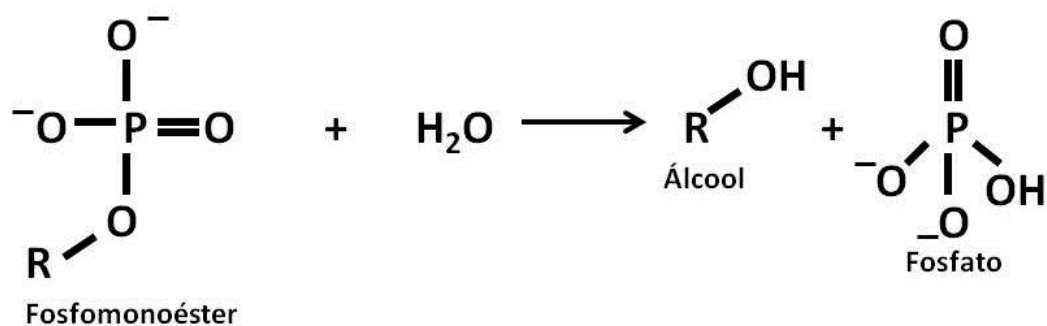


Figura 2 - Esquema da hidrólise de fosfomonoésteres catalisada pela Fosfatase Alcalina.

Ela é amplamente encontrada na natureza, desde em bactérias até no homem, tendo sua importância por ser uma enzima hidrolítica e uma fosfomonoesterase não específica (Boulanger & Kantrowitz, 2003). Holtz & Kantrowitz (1999) destacam que a fosfatase alcalina de *E. coli* serve como um protótipo para todas as outras.

Sendo importante citar, então, que de acordo com COLEMAN (1992) o valor do peso molecular da fosfatase alcalina de *E. coli* é de 56kDa. Sua estrutura primária foi determinada por CHANG *et al.* (1986), e foi constatado que ela possui 471 aminoácidos, incluindo uma sequência sinal de 21 aminoácidos.

Pesquisas de BRADSHAW *et al.* (1981) sobre a estrutura secundária desta enzima demonstraram que quase metade dos resíduos se apresentam como α -hélices e o restante se divide aproximadamente em 13% e 16% como β -folha e curvatura β , respectivamente.

A fosfatase alcalina é uma enzima periplasmática, sendo inativa quando está dentro do citoplasma, só após atravessar a membrana plasmática que há a remoção da sequência de sinal da enzima, permitindo a formação de pontes dissulfeto, da dobra para dimerização e a incorporação de íons (Kamitani *et al.*, 1992). Além disso, o ambiente reduzido do citoplasma prejudica a formação de pontes dissulfeto em proteínas estáveis, pois para o mesmo ocorrer é necessário de oxidação (Bassette *et al.*, 1999).

1.1.2. Utilidade da Fosfatase Alcalina na Biologia Molecular

Com a propriedade de remover grupos de fosfatos 5' de DNA e RNA, a fosfatase alcalina é uma importante ferramenta para biologia molecular, assim como para engenharia genética. É comumente usada para marcação radioativa de ácidos nucleicos, para evitar a re-ligação de extremidades de vetores em procedimento de clonagem molecular de genes e como um componente de sistemas conjugados de diagnóstico por imunodeteção (Caldeira, 2010).

Para analisar a atividade da enzima pode-se utilizar um substrato cromorgânico chamado p-nitrofenilfosfato, que é incolor. Porém reage com a fosfatase alcalina e transforma o substrato em p-nitrofenol que em pKa ideal tem uma coloração amarelada (fig. 3), o mesmo pode ser detectado por espectrofotometria de absorbância a 405nm (Caldeira, 2010 e Bianconi, 2006).

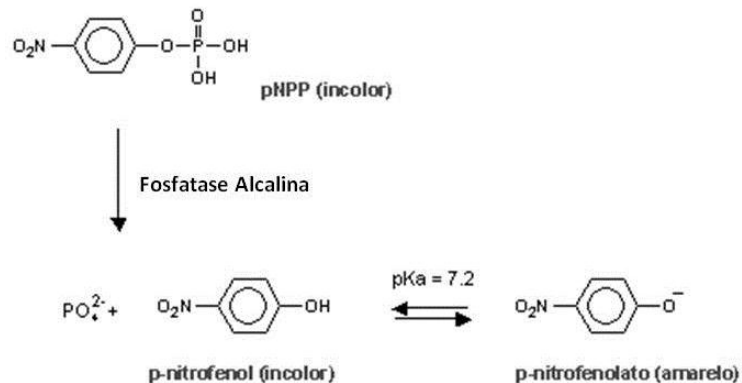


Figura 3 - Esquema da reação da clivagem do fosfato do p-nitrofenilfosfato catalizada pela fosfatase alcalina (Bianconi, 2006).

Segundo Azevedo *et al.* (2003), há várias fontes de fosfatase alcalina para serem utilizadas em biologia molecular, entre elas:

- Fosfatase alcalina bacteriana – BAP (*Bacterial Alkaline Phosphatase*)

Essa fosfatase alcalina possui uma alta termoestabilidade, podendo se manter ativa até acima 95°C, e a 65°C por mais de uma hora. Ensaios feitos com essa enzima normalmente seguem as seguintes condições: 37°C por 30 minutos em tampão de pH 8 à 8,5 (Invitrogen Corporation, 2002 e Tomazic-Allen S. J., 1991).

- Fosfatase alcalina de intestino de novilho – CIP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*)

Já essa fosfatase possui condições parecidas com a BAP, é utilizada à 37°C por 30 minutos a 1 hora, também tampão de pH 8, mas pode ser inativada por meio de choque térmico à 65°C por 15 minutos se houver EDTA no meio (Invitrogen Corporation, 2006).

- Fosfatase alcalina de camarão – SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)

A fosfatase alcalina de camarão, ou SAP, funciona em pH 10.5 e sua temperatura ótima é 37°C e é facilmente inativa à 65°C por 5 minutos (Affymetrix, 2013).

Esse gene, *phoA*, está localizado precisamente a 8.6 minutos do genoma da *E.coli* (Wambale *et al.*, 2010). Tem a sua transcrição sendo controlada por três genes de regulação positiva, *phoB*, *phoM* e *phoR*, sendo esse último funcionando como regulador negativo também, além disso outros genes estão envolvidos com o transporte da fosfatase alcalina (Makino *et al.*, 1985).

1.2. Biologia Molecular e Expressão Gênica

Experimentos realizados em 1973, por Herbet Boyer e Stanley Cohen, já com o conhecimento da estrutura da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA), evidenciaram os potenciais e as possibilidades que a partir de então a ciência tinha, construindo moléculas de DNA recombinantes *in vitro* (Farah, 2007).

Essa nova área da Biologia Molecular, veio a se chamar Engenharia Genética e com ela nasceu um conjunto de técnicas e de ferramentas, principalmente de origem biológicas.

A construção de moléculas de DNA recombinantes tem várias utilidades, uma delas é a de obtenção de grandes quantidades de proteínas de interesse biotecnológico.

O procedimento se baseia em extrair fragmentos de DNA do genoma de um organismo doador, com o fim de obter genes de interesse para então esses serem inseridos individualmente em vetores de clonagem de replicação autônoma, como os plasmídeos bacterianos. Por sua vez, esses vetores ligados aos genes de interesse são introduzidos através de técnicas de transformação em um microorganismo hospedeiro, como uma cepa de bacteriana, por exemplo, que com pouca energia pode formar vários clones recombinantes, e assim replicar os genes em questão (Griffiths *et. al.*, 2000).

Os sistemas de expressão costumam ser tão eficientes e produzem tanta proteína heteróloga que acabam matando as células hospedeiras, por isso a expressão regulada é muito importante para o desenvolvimento das pesquisas e obtenção dos produtos biotecnológicos. Desta forma é possível manter o clone viável e cultivar a célula hospedeira antes de induzir a expressão da proteína heteróloga.

1.2.1. O Operon lac

LODISH (2005) explica que o maquinário responsável para regular a expressão de gene se chama *operon* e que funciona reprimindo ou ativando a transcrição dependendo de mudanças nutricionais ou físicas no meio em que o organismo está inserido. Ele destaca, ainda que um dos exemplos mais típicos de regulação da expressão gênica em bactéria é o *operon lac*.

Células de *E. coli* preferem metabolizar glicose, então para que seja sintetizado o mRNA do *operon lac* - responsável pelo metabolismo de lactose – o ambiente deve ser de glicose indisponível, ou de baixa concentração e lactose disponível.

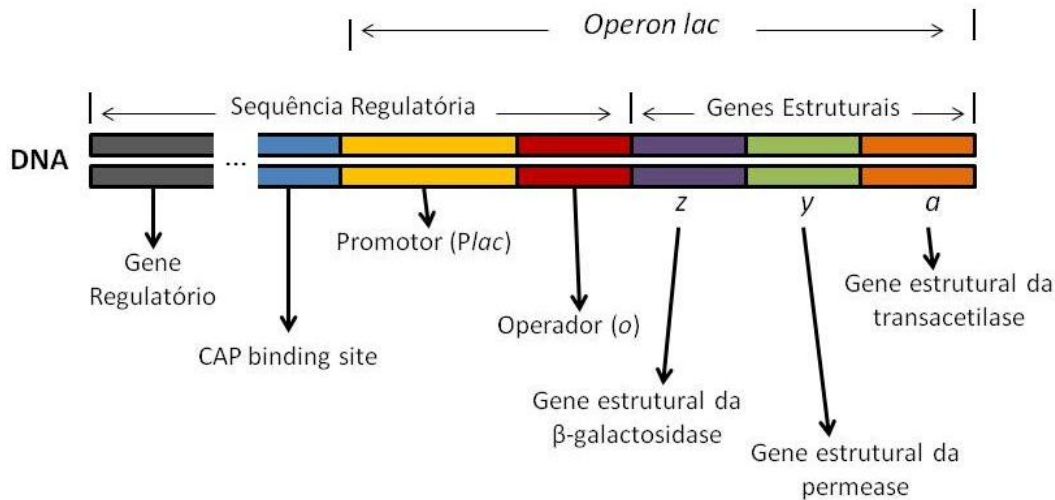


Figura 4 – Esquema estrutural do operon *lac* e das regiões reguladoras.

O *operon lac* (figura 4) é composto por um sítio promotor, por um operador e por três genes estruturais, que são o Z (que codifica a β -galactosidase), o Y (permease) e o A (transacetilase).

Além deles existem dois genes regulatórios que influenciam no funcionamento do *operon lac* através do sítio de ligação da RNA polimerase. Uma é responsável pela síntese da CAP, ou, Proteína Ativadora de Operons Catabólicos, que recebe o cAMP (um mensageiro secundário, produzido a partir de ATP). O complexo formado cAMP-CAP liga-se próximo ao promotor do *operon* e facilita a fixação da RNA polimerase ao DNA, ativando o processo de transcrição, sendo que o nível de cAMP aumenta quando há ausência de glicose no interior da célula. E a outra sequência regulatória é responsável pela síntese do repressor *lac*, que interage com o operador do *operon*, impedindo, dessa forma, a ligação da RNA polimerase ao sítio promotor. Mas quando há lactose, ou o seu análogo sintético, o IPTG no meio, o repressor é inativado, soltando-se do operador. Dessa forma podemos dizer que existem as seguintes situações e suas consequências colocadas no quadro 1 abaixo.

Quadro 1 – Situações que podem ocorrer na célula e como o *operon lac* responde a elas.

	Glicose	Lactose (IPTG)	O que acontece
1	Presente	Ausente	Não ocorre expressão/Expressão Basal
2	Ausente	Ausente	Baixa Expressão
3	Presente	Presente	Baixa Expressão
4	Ausente	Presente	Alta Expressão

Na situação 1, há glicose no sistema e não há lactose, assim, não expressão, ou uma expressão mínima, de valores insignificantes, no qual denominamos de expressão basal. Nessa situação o *operon lac* não é ativado e está reprimido, pois não há cAMP no interior da célula e o repressor se liga ao operador, não havendo lactose para impedi-lo. Enquanto que na situação 2, tanto a glicose quanto a lactose estão ausentes e nesse caso há uma baixa expressão, pois apesar do sistema estar ativado, o operador continua reprimido pela ausência de lactose.

Já na situação 3, inverso da situação anterior, a expressão continua baixa, pois ainda que o sistema esteja induzido pela presença de lactose no meio que impede o funcionamento do repressor, a presença de glicose inativa o *operon lac* por não haver a formação do complexo cAMP-CAP. Enquanto que na situação 4 há uma alta expressão, onde o mecanismo do *operon lac* atinge seu maior desempenho, já que ele está tanto ativo quanto induzido.

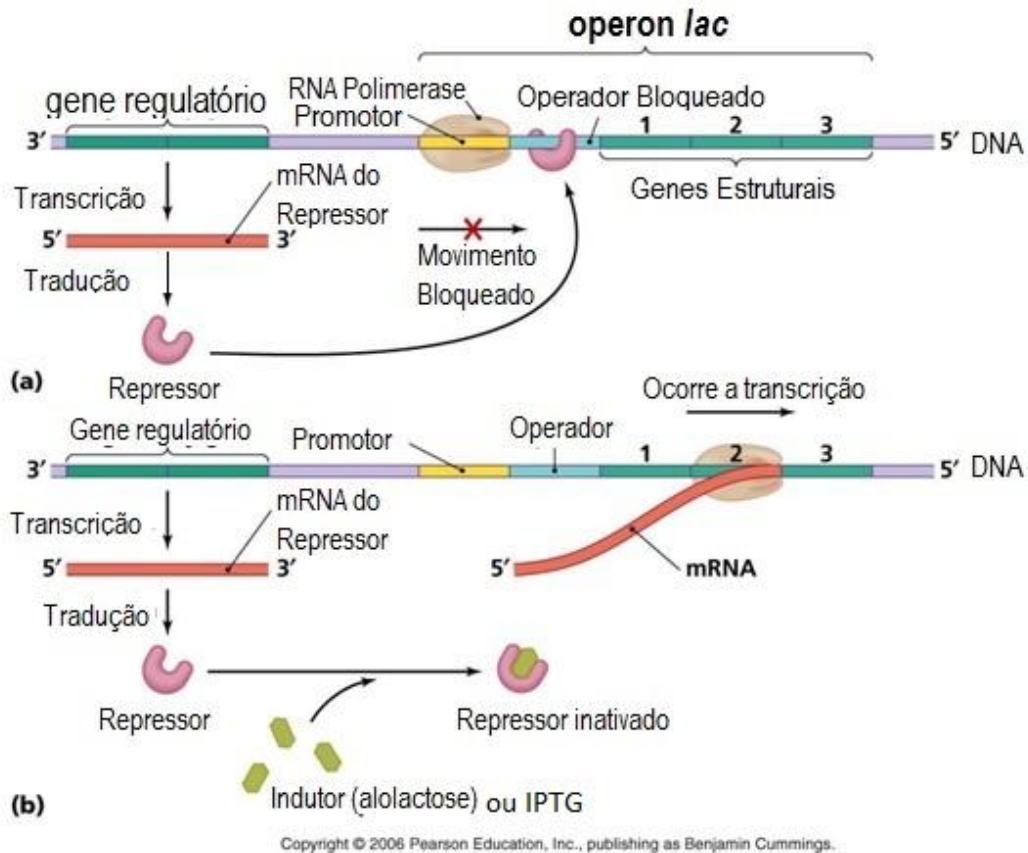


Figura 5 – Esquema do funcionamento do operon *lac* e das proteínas que influenciam no sistema. (a) Quando há presença de glicose no meio e ausência de lactose, o sistema não é ativo e há ação do repressor que bloqueia o operador, impedindo a RNA polimerase e em consequência da expressão dos genes estruturais. (b) Quando há ausência da glicose e presença da lactose/IPTG, o sistema é ativo e induzido onde o operador fica livre para a ligação da RNA polimerase (Cummings, 2006).

Quando os genes estruturais são expressos, há formação das proteínas que participam na metabolização da lactose, para que o organismo consiga obter energia necessária para seu funcionamento.

Na figura 5 são mostrados os elementos e como eles funcionam na regulação do operon *lac* quando há presença/ausência de glicose e presença/ausência da lactose, onde o repressor e o indutor são fundamentais. Todas essas características do operon *lac*, fazem de seu sistema regulatório uma das ferramentas mais comuns para regulação da expressão gênica na engenharia genética.

1.2.2. Vetores de expressão

De acordo com Carvalho & Recco-Pimental, 2007, os vetores/plasmídeos de clonagem molecular são DNA circulares, dupla fita, capazes de autorreplicação e de se manter em células bacterianas ou eucarióticas como leveduras, e em sua maioria possuem genes que codificam resistência a antibióticos, como a ampicilina, por exemplo. E foi a manipulação genética que trouxe para a realidade laboratorial um expressivo número de vetores com diferentes aplicações.

Existem critérios para escolher o vetor certo a ser utilizado na pesquisa de interesse, são eles (Preston, 2003):

- ✓ Tamanho do inserto de interesse – Vetores em geral, principalmente os de alto número de cópias, conseguem carregar até 15kB de DNA, acima disso é preciso selecionar outros tipos de vetores, como os cosmídeos ou os vetores virais derivados do bacteriófago lambda (λ);
- ✓ Número de cópias – O número de cópias de clones depende, também, da capacidade de replicação do plasmídeo. Se o interesse da clonagem é o de manutenção e amplificação para depois manipular o gene, é importante que o vetor tenha a capacidade de alto número de cópias;
- ✓ Incompatibilidade – Esse caso é para a possibilidade da necessidade de haver dois plasmídeos em uma mesma célula, por exemplo, algumas cepas de *E. coli* já possuem um plasmídeo auxiliar, nesse caso é importante verificar se há incompatibilidade com o plasmídeo que se deseja inserir, pois caso haja uma competição entre as funções dos dois, é comum haver perda de algum plasmídeo durante o crescimento da célula;
- ✓ Marcador Seletivo – Podendo haver mais de um por vetor, são genes presentes no vetor que codificam proteínas que conferem resistência a antibióticos, a metais pesados ou que levam à síntese de nutrientes essenciais para a célula. Dessa forma, escolhendo o marcador seletivo

corretamente, é possível distinguir os clones de interesse das colônias sem plasmídeos, ou ainda, evitar contaminação, por exemplo;

- ✓ Sítios de Clonagem – São locais únicos onde se ligam as enzimas de restrições que cortam o vetor de forma a facilitar a inserção do gene de interesse. Muitos vetores possuem um MSC, ou seja, um múltiplo sítio de clonagem, uma área do vetor onde há uma alta concentração de sítios para diferentes enzimas de restrição;
- ✓ Funções específicas do Vetor – Há vetores de clonagem, que são bons em obter alto número de cópias, mas as vezes, há a necessidade de além dos clones, obter o produto do gene inserido, ou seja, o vetor deve possuir o aparato suficiente para expressão do gene, e ainda, de secreção da proteína expressada.
- ✓ Promotor - É importante também, saber o tipo de promotor que compõe o vetor selecionado, pois o promotor é o elemento responsável pela ligação da RNA polimerase a fita de DNA permitindo a transcrição. Os promotores mais utilizados são aqueles intitulados de fortes, pois sintetizam mais cópias de mRNAs.
- ✓ Operador – De acordo com a necessidade, a presença do operador é fundamental, pois é nessa região em que o repressor se liga ao DNA, impedindo que ocorra a transcrição.

Vetor de Expressão

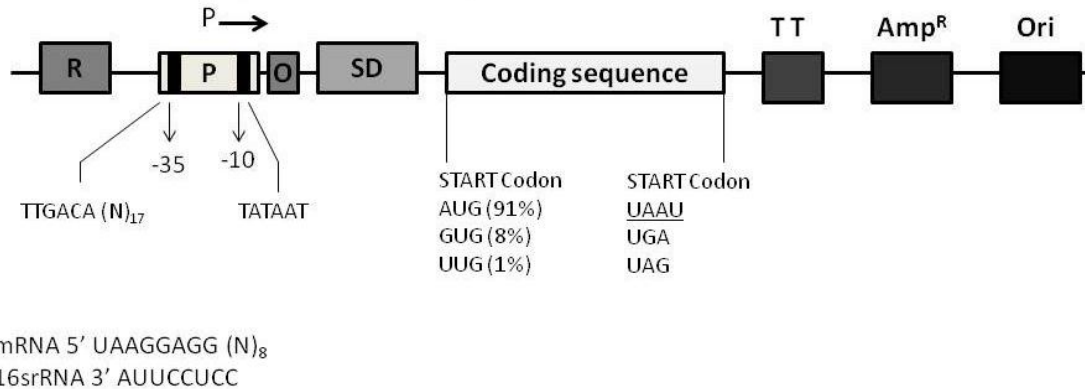


Figura 6 – **Representação da composição principal de um vetor de expressão:** (R) Gene Regulador; (P) Promotor (com as regiões -35 e -10); (O) Operador; (SD) Sequência de Shine-Dalgarno; (TT) terminador de transcrição; (Amp^R) gene de resistência a ampicilina e a (Ori) origem de replicação.

Um vetor de expressão precisa possuir alguns elementos fundamentais para seu bom funcionamento. Na figura 6 podemos observar quais são eles: o gene regulador, as regiões -35 e -10 que fazem parte do promotor, a sequência Shine-Dalgarno que é o sítio de reconhecimento do ribossomo, a região de término de transcrição, o gene de resistência a ampicilina (ou de algum outro antibiótico) e a origem de replicação que vai garantir a replicação do vetor na hospedeira.

Há outros elementos considerados importantes também, como a presença de um múltiplo sítio de clonagem (MSC) que facilita a inserção do gene exógeno e a presença de uma sequência codificadora para o peptídeo sinal, que dirige o processo de secreção da proteína quando necessário (Alberts *et al.*, 2008).

1.2.2.1. Expressão de Fosfatase Alcalina em *E. coli*

A expressão do gene da fosfatase alcalina de *E. coli* foi obtida clonando-se o gene diretamente no sítio *Pst*I do pBR322 originando-se o plasmídio pCH2, sendo o gene estrutural *phoA* fusionado ao gene da β -lactamase. Posteriormente, esse gene foi transferido para o vetor pAC92 (figura 7), derivado do pUC18, onde sua expressão ficou parcialmente regulada por um promotor híbrido entre o promotor *lac* (*lac*^{*}) e o promotor do gene de α -amilase de *Bacillus subtilis*, originando o plasmídeo recombinante pPHOA (figura 8) capaz de programar em *E. coli* maior nível de expressão que pCH2.

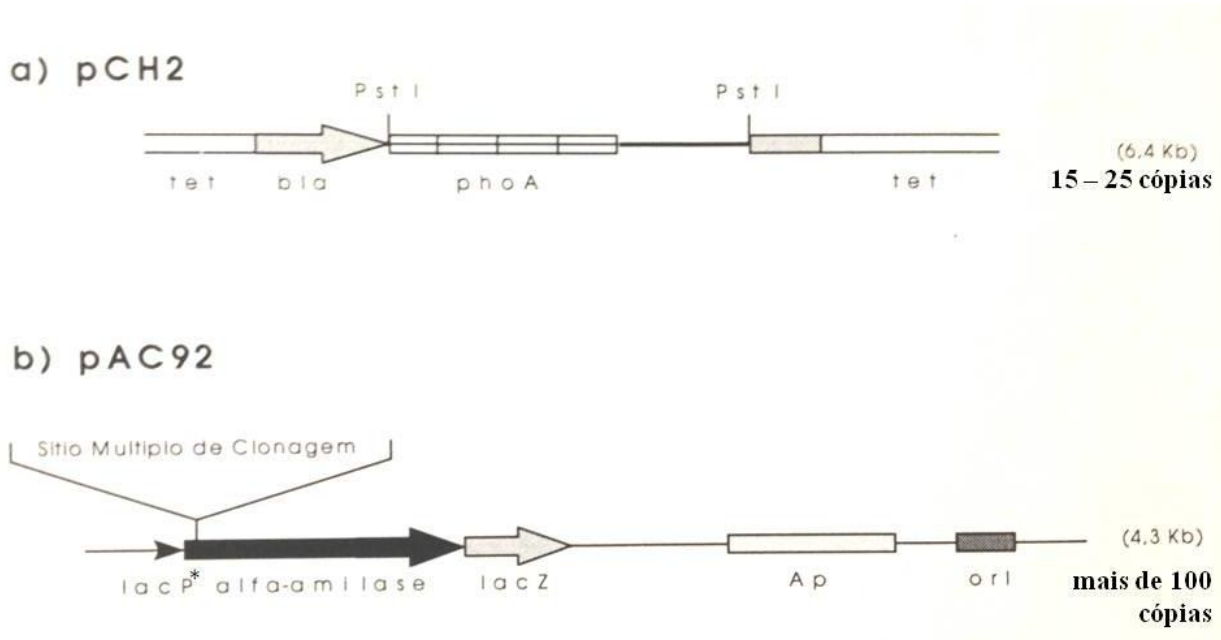


Figura 7 – Mapas parciais dos vetores pCH2 (a) e pAC92 (b). (a) É composto por um gene de resistência à tetraciclina (*tet*); gene da β -lactamase (*bla*) e gene da fosfatase alcalina (*phoA*). (b) É composto por promotor (*lacP*^{*}); gene da α -amilase (α -amilase); gene da β -galactosidase (*lacZ*); gene de resistência à ampicilina (*Ap*) e origem de replicação (*ori*). Fonte: Bertolini, 1997.

Porém, o plasmídeo pPHOA não possui o sistema de controle da expressão do *operon lac* completo, pois na construção do pAC92 o operador foi parcialmente deletado. Portanto, a proteína repressora não pode se ligar para manter o sistema reprimido, e como consequência há uma alta expressão gênica com características

suicidas para a bactéria hospedeira, já que a alta concentração da enzima expressa se torna tóxica para a mesma (Barros, 1996).

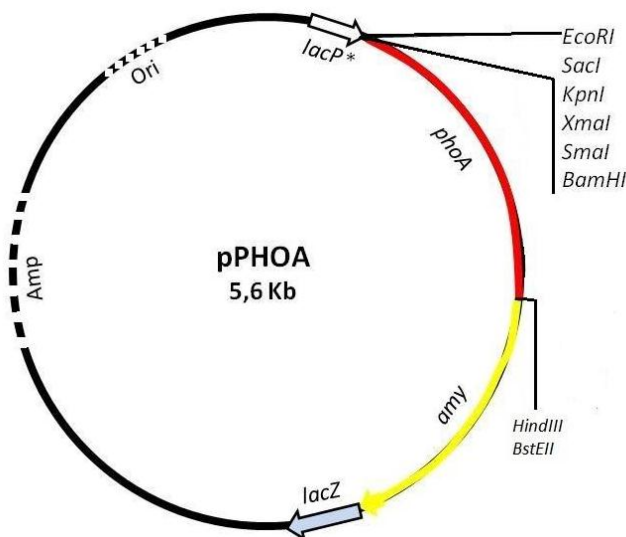


Figura 8 – Representação do vetor pPHOA originado a partir do pAC92 e do gene phoA. Em vermelho o gene phoA entre os sítios de restrição BamHI e HindIII; em amarelo o gene de alfa-amilase. A seta branca indica a presença do lacP*; a seta azul clara, o lacZ; e os pontilhados indicam a presença do marcador de seleção (amp) e da origem de replicação (ori).

Bertolini (1997) mostrou a alta expressão de fosfatase alcalina em *E. coli* com o vetor pPHOA, mas também destacou a necessidade do controle da expressão fazendo testes com diferentes concentrações de glicose no meio, do contrário, sem esse controle, o excesso da fosfatase alcalina no periplasma causava a morte celular das hospedeiras, e como consequência, a perda de massa celular que prejudicava a purificação da fosfatase alcalina.

Em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologias de DNA da UFAM (dados não publicados) um vetor denominado pULA foi construído a partir da região promotora do pAC92, com operador restaurado, clonado em um vetor denominado de pUN, este sendo o pUC18 modificado sem o gene de β -galactosidase e sem sua região promotora/operadora de origem (Assunção, 2009).

Na figura 9 vemos o esquema do vetor de expressão/secreção pULA e seus principais elementos em destaque.

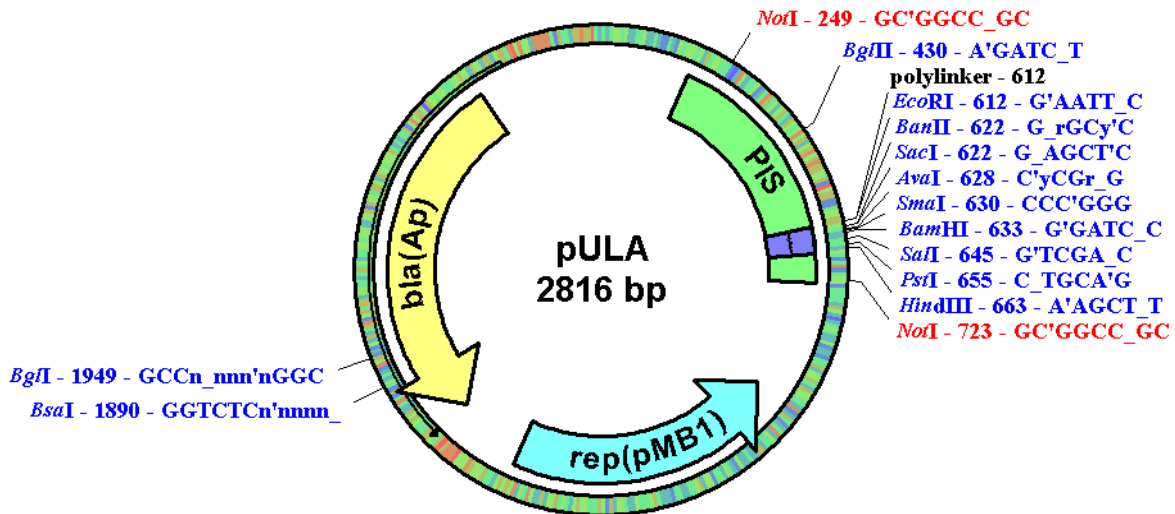


Figura 9 – **Esquema representativo do vetor pULA**. Em verde a sequência PIS que corresponde ao cassete reparado a partir da região promotora do vetor pAC92; em azul escuro o MSC (Múltiplo sítio de Clonagem); em amarelo o gene de resistência para ampicilina e em azul claro a origem de replicação.

Abaixo, na figura 10, o cassete da região PIS com os seus elementos em destaque.

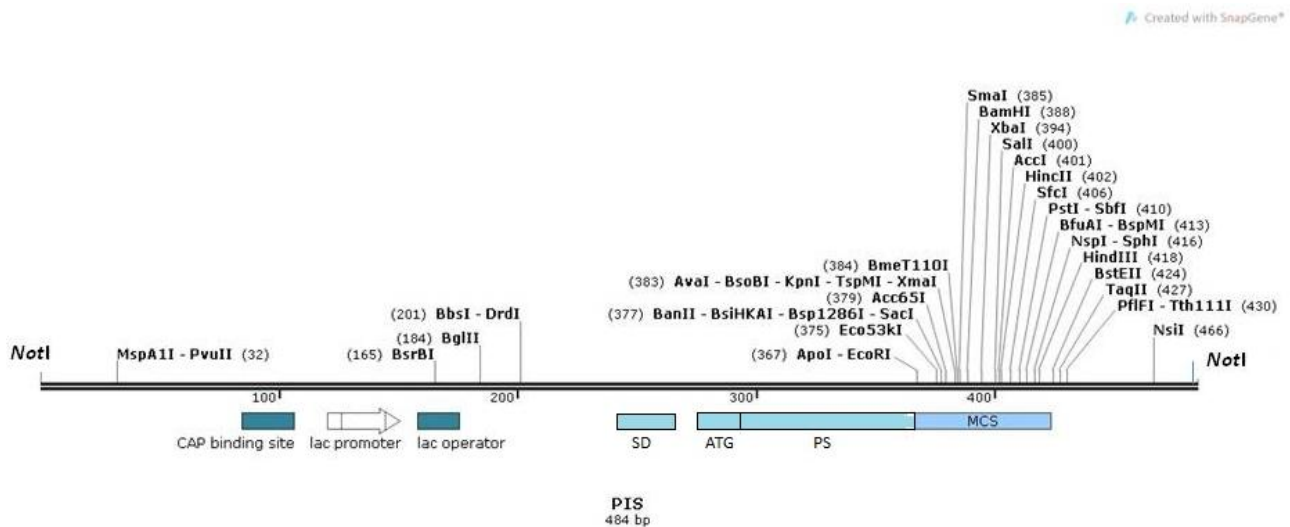


Figura 10 – **Região PIS e seus elementos funcionais em destaque**. Sítio da CAP; Promotor *lac*, operador *lac*, SD – Shine-Dalgarno, ATG – códon de iniciação, PS – região que codifica o peptídeo sinal de α -amilase e MCS – Sítio de Múltipla Clonagem.

1.3. Produção e Purificação de Enzimas

Para a produção enzimática recombinante é comum a necessidade de testar e analisar qual o melhor meio para o crescimento das hospedeiras, para então conseguir o melhor desempenho de expressão e produção enzimática.

No final do processo fermentativo, normalmente a preparação enzimática ainda não possui a homogeneidade proteica necessária para ser utilizada em aplicações biotecnológicas e principalmente para uso medicinal e analítico. Dessa forma, existem alguns procedimentos que tem como objetivo purificar o material, ou seja, a enzima de interesse. Alguns exemplos de procedimentos podem ser citados como a cristalização, a eletroforese, os diversos tipos de cromatografias e a extração líquido-líquido (Bon *et alii.*, 2008).

Cummins *et al.* (2011) destaca a cromatografia de troca iônica, que permite a separação de moléculas a partir das diferenças em suas cargas, pois é um procedimento que tem um amplo espectro de aplicação em diferentes amostras, custo moderado, forte capacidade de resolução e facilidade de automação.

No presente trabalho é descrita a expressão da fosfatase alcalina de *E. coli* por meio de um sistema de expressão regulável seguida da purificação da enzima.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Expressar a enzima fosfatase alcalina em *Escherichia coli* utilizando-se em vetor de expressão regulável e purificar a enzima.

2.2. Específicos:

- Clonar a região estrutural do gene *phoA* no vetor de expressão e secreção pULA em *E. coli*.
- Expressar a enzima em *E. coli* utilizando-se o sistema de regulação do operon *lac* do vetor pULA.
- Analisar a expressão da fosfatase alcalina em diferentes condições.
- Purificar a enzima e demonstrar sua atividade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.1. Esquema experimental realizado

O esquema experimental utilizado está demonstrado a seguir na figura 11.

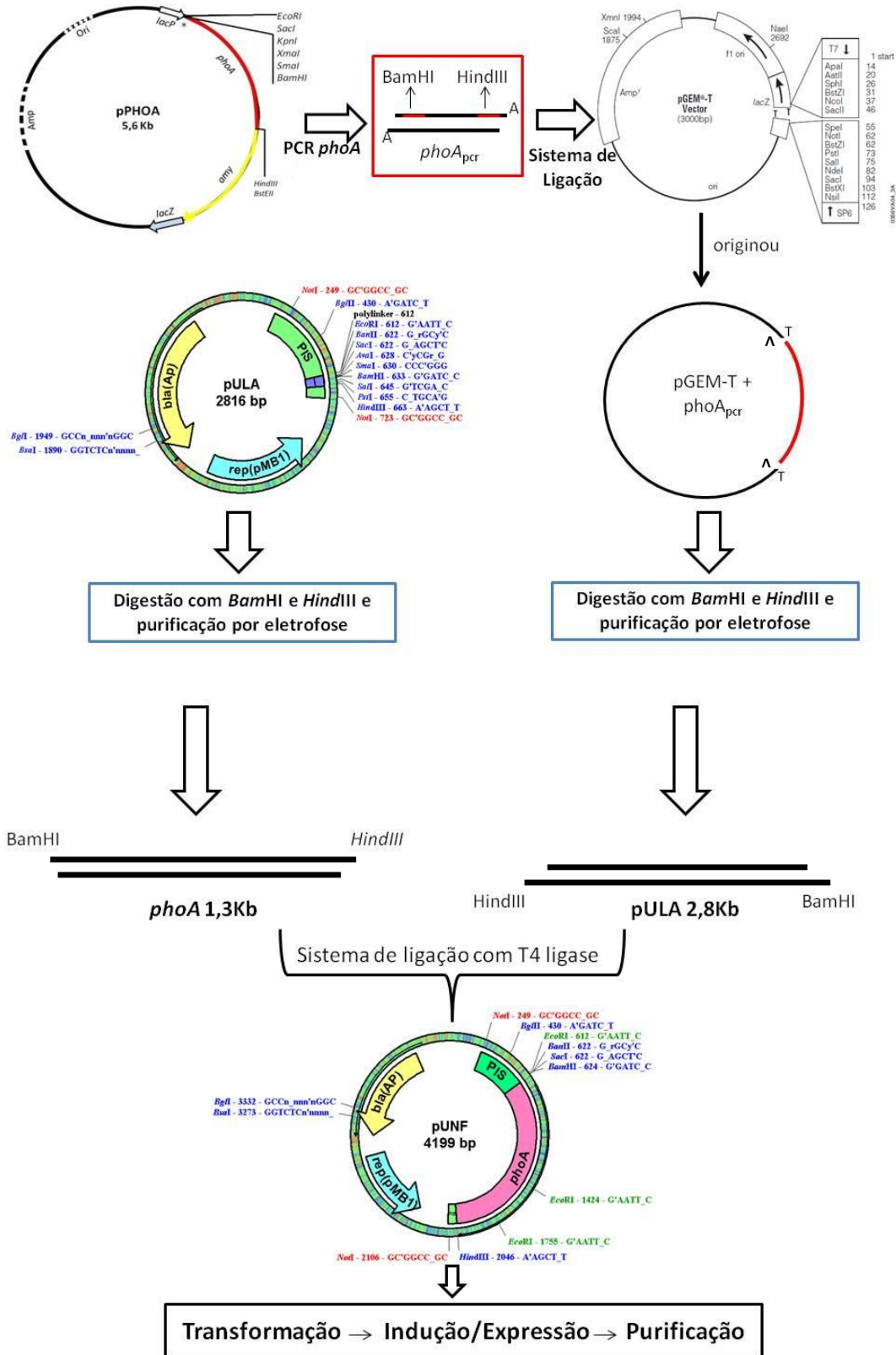


Figura 11 – Esquema dos métodos realizados no presente trabalho.

3.2. Principais materiais utilizados

3.2.1. Linhagem bacteriana e meios de cultura

Utilizou-se a cepa DH5 α F'IQ de *Escherichia coli* (Invitrogen Corporation) de Hanahan (1983), seu genótipo segue abaixo:

F⁻ ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZ* Δ M15 *zzf::Tn5* [KmR].

Foram utilizados em todos experimentos desse trabalho os meios de cultura líquido ou sólido de Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram o pGEM[®]-T, pPHOA e pULA descritos em detalhes nos itens a seguir:

3.2.2.1. pGEM[®]-T

Para clonar um gene de interesse em um vetor específico muitas vezes é necessário clonar antes o produto da PCR do fragmento de interesse em um vetor comercial. Um dos vetores utilizados nesse caso explicitado é o pGEM[®]-T (figura 12), que possui timina nas extremidades 3'-terminal e é linear (Promega Corporation, 2010). Como o produto de PCR possuir adenina em suas extremidades, facilmente este é clonado no vetor em questão.

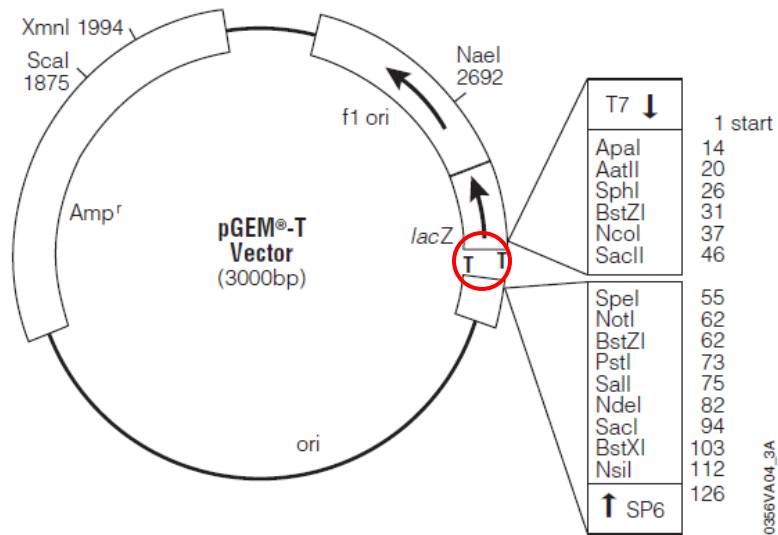


Figura 12 – Representação do vetor comercial pGEM®-T. Destaque para as extremidades abertas com timina.

Segue abaixo a figura 13 com a sequencia nucleotídica do múltiplo sítio de clonagem do vetor pGEM®-T:

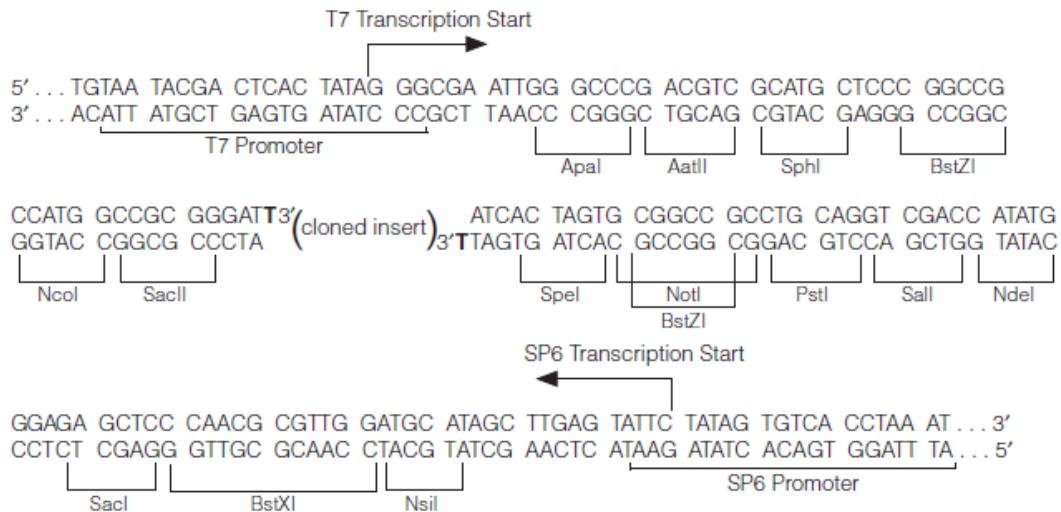


Figura 13 - Sequencia nucleotídica do múltiplo sítio do vetor pGEM-T.

3.2.2.2. pPHOA

O pPHOA (figura 8, pág. 21) que possui: *lacP** como promotor; gene da α -amilase com o Sítio Múltiplo de Clonagem; *lacZ* que é o gene para β -galactosidase; Amp, gene de resistência à ampicilina e uma origem de replicação, além do gene estrutural *phoA*, utilizado nesse trabalho (Barros *et al.*, 1996).

3.2.2.3. pULA

O pULA (figura 9, pág. 20) foi construído no Laboratório de Tecnologia de DNA da UFAM por Maia (2008, não publicado) e foi selecionado para esse trabalho por ele ser um vetor expressão e secreção, com a capacidade completa de regulação pelo *operon lac*. Dessa forma a expressão da enzima, fosfatase alcalina, pode ser induzida artificialmente.

3.2.3. Primers

Os oligonucleotídeos utilizados como primers neste trabalho foram o PHOA1 e o PHOA2, pois os mesmos foram sintetizados a partir do fragmento do gene *phoA* da linhagem K12 de *E. coli*. Encontra-se nesses oligonucleotídeos os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III, para assim facilitar a inserção do fragmento amplificado por PCR no vetor de expressão/secreção, pULA.

PHOA1: 5' TCGGCGGATCCTGCTCAGGGCGATATTACT 3'

*Bam*HI

PHOA2: 5' CGGCCCAAGCTTATTTAGCCCCAGAGCGGC 3'

*Hind*III

3.2.4. Enzimas de Restrição

Nesse trabalho foram utilizadas duas enzimas de restrição: *HindIII* e *BamHI*, para digerir o vetor pULA e o gene estrutural *phoA*, para então serem ligados por suas extremidades.

3.2.5. Soluções

- Soluções utilizadas em géis de agarose em eletroforese
 - Tampão TEB 10x: Tris-base de HCl 108g/L; ácido bórico 55g/L; EDTA 3,75g/L; pH8.
 - Tampão de amostra 5x: Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0.125% e TEB.
 - Brometo de etídeo 10mg/mL.
- Soluções utilizadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE em eletroforese
 - Tampão Tris-Glicina 10x: Tris 250mM, Glicina 2,5M pH 8,3 e SDS 1%.
 - Acrilamida/bis-acrilamida 30%: proporção de 29 de acrilamina por 1 N,N'-metilenobisacrilamida (p/p).
 - Tampão 5x: Tris-HCl 25mM pH 8,3; Azul de Bromofenol 0,1%; glicerol 10%; SDS 2% e β -mercatoetanol 100mM.
 - Solução Azul Brilhante de Coomassie G 250: azul brilhante de coomassie 0,3%, etanol 50% e ácido acético 10%.
 - Solução Descorante: etanol 10% e ácido acético 7%.
 - Solução Fixadora: metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,1%.
 - Solução Tiosulfato de Sódio: tiosulfato de sódio 0,02%.
 - Solução de Prata: nitrato de prata 2g/L e formaldeído 210 μ L/L.

- Solução Reveladora: carbonato de sódio 60g/L, tiosulfato de sódio 8g/L e formaldeído 1,3ml/L.

- Solução Bloqueio da Revelação: metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,1%.

- Soluções para purificação e análise da atividade enzimática

- Tampão A 2x: TrisHCl 100mM pH 7,5 e MgCl₂ 2mM.

- Tampão B 1x: TrisHCl 20mM pH 7,4 e MgCl₂ 1mM.

- Estoques de Antibióticos

- Estoque de Ampicilina: 100mg/mL.

- Estoque de Kanamicina: 50mg/mL.

3.3. Métodos utilizados

3.3.1. Extração Plasmidial

Para extração dos plasmídeos pPHOA e pULA, clones foram cultivados em 5ml de meio líquido LB, com 100µ/ml de ampicilina e à 37°C com agitando-se à 170rpm durante a noite.

Após o crescimento bacteriano a extração plasmidial foi feita com a utilização de do *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* da GE Healthcare.

Para observação da quantificação de DNA foi feito uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, com utilização do tampão de amostra 5x, tampão TEB 1x e brometo de etídeo 5µg/mL, de acordo com o método a seguir (Azevedo, 2003):

- A solução de agarose 0,8% em TEB 1x e o brometo de etídeo foram transferidos para uma cuba horizontal de corrida, e perpendicularmente foi colocado um pente de acrílico com a intenção de formar 6 a 12 poços;

- Após a solidificação do gel, o pente é retirado e é colocado tampão TEB até que o gel fique submerso;
- Com auxílio de micropipeta automática aplicou-se as amostras de DNA misturadas com tampão azul de bromofenol nos poços do gel;
- Conectou-se a cuba a cabos de fonte de tensão, onde haja uma migração do pólo negativo para o positivo;
- E após o fim da corrida é necessário uma análise expondo o gel à uma luz UV.

3.3.2. Amplificação da Região Estrutural do Gene da Fosfatase Alcalina por PCR.

A região estrutural foi amplificada a partir do plasmídeo pPHOA por PCR utilizando-se os primers: PHOA 1 e PHOA 2. O sistema de PCR está mostrado no quadro 2 abaixo:

Quadro 2 – Reagentes utilizados na PCR, as suas concentrações finais e volume utilizado nesse protocolo.

Reagentes	Volume
MgCl ₂ (25mM)	2,5µl
Tampão (10x)	2,5µl
dNTPs (2,5mM)	2,5µl
Primer PHOA 1 (10ng ---- 5pmol)	1µl
Primer PHOA 2 (10ng ---- 5pmol)	1µl
DNA <i>phoA</i> (10ng)	1µl
H ₂ O deionizada	14,2µl
<i>Taq</i> polimerase (2,5µ/µl)	0,3µl
Volume Final	25µl

A PCR constituiu-se de 30 ciclos no termociclador sendo de:

- 94°C por 5 minutos
 - 94°C por 1 minuto
 - 60°C por 45 segundos
 - 72°C por 90 segundos
 - 72°C por 5 minutos
 - Conservado a 4°C
- } 30 ciclos

Após o PCR o amplicon de 1,3Kb foi clonado em *E. coli* utilizando-se o vetor pGEM[®]-T.

3.3.3. Sistema de Digestão Plasmidial

Os plasmídeos pULA e pGEM[®]-T+*phoA* foram duplamente digeridos com *HindIII* e *BamHI*, conforme descrito a seguir:

1° Sistema de Digestão do pULA com *HindIII*.

Quadro 3 – Reagentes utilizados na primeira digestão do pULA com *HindIII* e controle, assim como os volumes de cada.

Reagentes	Controle	pULA / <i>HindIII</i>
H ₂ O MilliQ	49µL	18µL
<i>HindIII</i> 20U	-	6µL
Tp 10x	6µL	6µL
BSA 10X	-	-
Plasmídeo 20µg	5µL	30µL
Volume Final	60µL	60µL

Incubou-se a 37°C por 2 horas e depois a seguir a 85°C por 20 minutos para inativação da enzima de restrição.

1° sistema de Digestão dos produtos de pGEM[®]-T+*phoA* com *HindIII*.

Quadro 4 - Reagentes utilizados na primeira digestão do pGEM[®]-T+*phoA* com *HindIII* e controle, assim como os volumes de cada

Reagentes	pGEM [®] -T+ <i>phoA</i> / <i>HindIII</i>
H ₂ O MilliQ	38µL
DNA 20µg	10µL
Tp 10x	6µL
<i>HindIII</i> 20U	6µL
Volume Final	60µL

Incubou-se por 2 horas a 37°C e depois a 85°C por 20 minutos para inativação da enzima de restrição.

Após a primeira digestão, para purificar o DNA fez-se uma precipitação por acetato de amônia que consiste em acrescentar em cada tubo, acetato de amônia 7,5M 10% pH 8 e etanol PA absoluto 2,5 V (112,5µl). Incubou-se a -20°C por 30 minutos, centrifugou-se por mais 30 minutos, descartou-se o sobrenadante, acrescentou-se Etanol 70% gelado, centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante novamente e secou-se em fluxo laminar.

2° Digestão do plasmídeo pULA com *BamHI*:

Quadro 5 - Reagentes utilizados na segunda digestão do pULA com *BamHI* e controle, assim como os volumes de cada.

Reagentes	Controle	pULA / <i>BamHI</i>
H ₂ O deionizada	48 µL	42 µL
<i>BamHI</i> 20U	-	6 µL
Tp 10x	6 µL	6 µL
BSA 10x	6 µL	6 µL
pULA	-	Microtubo purificado
Volume Final	60 µL	60 µL

Repetiu-se o procedimento da primeira digestão.

2º Digestão do pGEM[®]-T+*phoA* com *Bam*HI:

Acrescentou-se 21 µL de H₂O deionizada em cada tubo e junta-se em um tubo só fazendo um volume de:

Quadro 6 - Reagentes utilizados na segunda digestão do pGEM[®]-T+*phoA* com *Bam*HI e controle, assim como os volumes de cada.

Reagentes	Controle	pGEM [®] -T+ <i>phoA</i> / <i>Bam</i> HI
H ₂ O deionizada	48 µL	42 µL
<i>Bam</i> HI 20U	-	6 µL
Tp 10x	6 µL	6 µL
BSA 10x	6 µL	6 µL
pGEM [®] -T+ <i>phoA</i>	-	Microtubo purificado
Volume Final	60 µL	60 µL

Incuba-se a 37°C por 2 horas e após a 85°C por 20 minutos.

A dupla digestão dos plasmídeos com as enzimas foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3.4. Purificação de DNA do gel de agarose por eletroforese

Após a eletroforese dos sistemas de digestão, purificou-se do gel o DNA, para tal foi usado o *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* da GE Healthcare após cortar as bandas do gel, aparentes pela UV, correspondentes ao tamanho do plasmídeo pULA e do aplicon *phoA*.

3.3.5. Sistema de Ligação

Foram necessários dois sistemas de ligação na realização deste trabalho. Um com o pGEM-T e outra com o vetor pULA.

3.3.5.1. Ligação do amplicon *phoA* no pGEM[®]-T

O sistema de ligação foi feito para inserir o inserto do gene *phoA*, digerido com *Hind*III e *Bam*HI e purificado por eletroforese, no vetor purificado pULA, também digerido com ambas as enzimas e também purificado por eletroforese. Porém faz-se necessário um intermediário, o vetor pGEM-T que é comercial e já vem linearizado com T nas extremidades facilitando a inserção do gene de interesse nessas extremidades, o sistema segue os reagentes e os volumes a seguir:

Quadro 7 – Reagentes e os respectivos volumes para o sistema de ligação com o vetor comercial pGEM[®]-T e o amplicon *phoA*.

Reagentes	Volume
Tampão 2x	5µl
pGEM [®] -T (50ng)	1µl
<i>phoA</i> (100ng)	2µl
T4 ligase (3U/µl)	1µl
Volume Final (completa com H ₂ O, se necessário)	10µl

3.3.5.2. Ligação do amplicon *phoA* no pULA

Após a ligação e a comprovação através análise em gel de agarose que o inserto foi inserido, este foi retirado do vetor pGEM-T a partir da digestão já descrita, então foi feito o sistema de ligação deste inserto no vetor pULA, o sistema de ligação segue de acordo com o protocolo abaixo:

Quadro 8 – Reagentes e seus respectivos volumes para o sistema de ligação do plasmídeo pULA com o amplicon *phoA*.

Reagentes	Volume
pULA purificado (100ng)	4 µL
Amplicon <i>phoA</i> (100ng)	15 µL
Tampão 10x (+ATP)	2 µL
T4 DNA Ligase 40U/µL	1 µL
Volume Final	24 µL

Seguiu-se com o mesmo protocolo de precipitação por acetato de amônio, ressuspensando-se em 5 µL de H₂O deionizada.

3.3.6. Preparação de Bactérias Eletrocompetentes

A linhagem de bactéria utilizada para eletroporação foi a *E. coli* DH5αF'IQ. Para preparar as células para eletroporação um clone foi cultivado (pré-inóculo) em 25ml de meio LB líquido com kanamicina a 37°C a 150rpm durante a noite. Em seguida inoculou-se 2ml do pré-inóculo em 300ml de LB líquido e o cultivo processou-se a 37°C a 150rpm até a cultura alcançar 0,4 de O.D.₆₀₀. Depois a cultura foi colocada no gelo por 30 minutos e dividiu-se em tubos para que pudessem ser centrifugados a 3.800 g por 8 minutos à 4°C. A seguir descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os sedimentos com glicerol 10% estéril e gelado, então repetiu-se a centrifugação e a ressuspensão com glicerol 10% por até mais 6 vezes e após a última centrifugação ressuspendeu-se apenas em 1ml de glicerol 10% e por fim para armazenou-se em alíquotas de 100µl, em freezer a - 70°C.

3.3.7. Transformação por eletroporação

Duas transformações foram realizadas neste trabalho, a primeira após a ligação do pGEM[®]-T e do amplicon *phoA*, e a segunda do plasmídeo pULA com o *phoA*. As transformações ocorreram conforme as etapas abaixo:

- 1- Degelar as células competentes (DH5αF'IQ) para eletroporação, lentamente no gelo;
- 2- Utilizar 1µL (~100ng) do princípio transformante (pUNF);
- 3- Eletroporar a 1900 volts na cuveta de 1mm (deixar a cuveta no gelo antes da eletroporação, para que esfrie);
- 4- Acrescentar 1ml de LB líquido;
- 5- Recuperou-se as células incubando-as por 1 hora a 37°C;
- 6- Plaquear em meio seletivo;
- 7- Deixar as colônias crescerem a 37°C overnight;

3.3.8. PCR de colônias

Depois que os clones recombinantes cresceram fez-se uma PCR com primeiramente um mix.

Quadro 9 – Reagentes utilizados na PCR de colônia, as suas concentrações finais e volume utilizado nesse protocolo.

Reagentes	Volume
MgCl ₂ (25mM)	2,5µl
Tampão (10x)	2,5µl
dNTPs (2,5mM)	2,5µl
Primer PHOA 1 (10ng ---- 5pmol)	1µl
Primer PHOA 2 (10ng ---- 5pmol)	1µl
DNA (10ng)	Colônias no palito
H ₂ O deionizada	15,2µl
<i>Taq</i> polimerase (2,5µ/µl)	0,3µl
Volume Final	25µl

Para a colocação do DNA, fez-se distribuição do mix nos microtubos e transferiu-se com palito parte de colônias isoladas na placa para o microtubo. No termociclador selecionou-se o seguinte ciclo:

95°C 2 minutos

95°C 10 segundos }
55°C 40 segundos } 30 ciclos
72°C 40 segundos }

72°C 5 minutos

4°C ∞

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0,8%, para confirmar a presença do amplicon correspondente a região estrutural do pUNF através do seu tamanho de 4,1Kb.

3.3.9. Análise da expressão enzimática

Para conhecer quais as condições para a melhor expressão enzimática, algumas variáveis foram testadas e analisadas durante o período de crescimento bacteriano dos clones transformados com o plasmídeo pUNF em meio líquido. As variáveis testadas estão descritos nos itens a seguir:

3.3.9.1. Curva de crescimento bacteriano em diferentes concentrações de glicose

A partir do pré-inóculo crescido em 5ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/ml) e 1% de glicose a 37°C, agitação de 170rpm durante a noite, foi feito um sistema com inóculos para analisar o crescimento bacteriano em 6 concentrações de glicose diferentes: 0%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% e 1%. Cada inóculo foi formado por 800µl do pré-inóculo, as concentrações de glicose correspondentes e 20ml de LB líquido. As alíquotas foram retiradas a partir de 2 horas após o começo do cultivo,

sendo 7 pontos retirados de hora em hora e um último ponto após completar 18 horas de crescimento.

As alíquotas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 600nm e os dados foram utilizados para construção de uma curva.

3.3.9.2. Dosagem Enzimática

O sistema para a dosagem enzimática foi montado em uma placa de 96 poços e 200µl de volume, própria para análise de absorvância, e cada poço foi composto conforme o quadro 10.

Quadro 10 - Reagentes e seus respectivos volumes para o sistema de dosagem enzimática das frações purificadas.

Reagentes	Volume
Amostra Enzimática	10µl
Tris-HCl 0,5M pH 8	164µl
p-nitrofenilfosfato 100mM	6µl
Volume Total	180µl

Deixou-se o sistema agir por 30 minutos à 37°C e adicionou-se às amostras 20µl da solução bloqueadora da reação, K₂PO₄ 1M pH 8.

Mediu-se, no final, a absorvância a 405nm em uma leitora automática de microplacas de 96 poços (Thermo Plate) e observou-se a atividade das amostras.

3.3.9.2.1. Análise da expressão da fosfatase alcalina em função das condições de ativação e indução

Dosagens enzimáticas foram feitas após o crescimento bacteriano nas seguintes condições:

- Presença de glicose e ausência de indutor (IPTG);
- Ausência de glicose e ausência de indutor (IPTG);
- Presença de glicose em diferentes concentrações e presença de indutor (IPTG)

em diferentes concentrações;

- Ausência de glicose (0,05%) e presença de indutor (IPTG) em diferentes concentrações.

Esses testes foram realizados com diferentes concentrações de glicose (já citadas) e de IPTG (0mM, 0,1mM, 0,25mM, 0,5mM e 1mM) durante o crescimento bacteriano e indução da expressão.

Para verificar quando e quanto a fosfatase alcalina se localizava no meio extracelular e no interior, em função do tempo de cultivo, um outro experimento foi realizado, nas melhores condições de glicose (0,05%) e de IPTG (1mM).

O cultivo foi dividido em microtubos e estes foram centrifugados por 2 minutos à 12.000g e 4°C. Separou-se o sobrenadante para teste enzimático e o *pellet* foi ressuspensionado com 20µl de Clorofórmio e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente.

Adicionou-se 200µl de Tris HCl 10mM pH8,0 e centrifugou-se por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para teste enzimático.

3.3.9.2.2. Reta Padrão

Para que fosse possível calcular a concentração do produto no meio do ensaio enzimático, assim como a Unidade Internacional (µmol/min) enzimática, foi necessário fazer uma reta padrão, para a partir disso utilizar a equação linear nos cálculos necessários em questão. O quadro 11 abaixo indica como o ensaio da reta foi feito.

Quadro 11 - Reagentes e seus respectivos volumes para o sistema da reta padrão para P-NitroFenol.

	P-NitroFenol 4mM	Tris-HCl 0,5M pH 8	K ₂ PO ₄ 1M pH 8
B	-	180 µl	20 µl
1	0,4 µl	179,6 µl	20 µl
2	0,6 µl	179,4 µl	20 µl
3	1 µl	178 µl	20 µl
4	4 µl	176 µl	20 µl
Volume Final	200µl		

As amostras foram feitas em triplicata e lidas em 405nm.

3.3.10. Purificação da Fosfatase Alcalina de *E. coli*

Para a purificação enzimática e comprovação da atividade da fosfatase alcalina, os procedimentos descritos abaixo foram realizados:

3.3.10.1. Cultivo da *E. coli* transformada com pUNF.

Após analisar e selecionar quais as melhores condições dentre as variáveis já citadas, as culturas foram cultivadas para indução da expressão a partir de um pré-inóculo. Após o inóculo atingir uma O.D.₆₀₀ de 0,6 adicionou-se IPTG 1mM e deixou-se a 37°C, em uma agitação de 170rpm durante 4 horas.

3.3.10.2. Extração da enzima do periplasma e termoprecipitação de proteínas contaminantes.

Após o crescimento das culturas e a expressão ter sido induzida nas melhores condições, foi feito um procedimento para extrair a enzima do periplasma e para precipitar proteínas contaminantes do meio, conforme descrito abaixo (Kilikian & Pessoa, 2005):

- Após 3 a 4 horas da indução com IPTG, a cultura foi dividida em alíquotas de 1,5ml em microtubos;
- Centrifugou-se a 12.000g por 3 minutos à 4°C;
- Após descartar o sobrenadante, adicionou-se mais 1,5ml de cultura nos microtubos e repetiu-se o procedimento de centrifugação;
- Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se clorofórmio (50µl) para ressuspender o *pellet*;
- Após 15 minutos adicionou-se 400µl de Tris-HCl 10mM e centrifugou-se por 10 minutos a 12.000g a 4°C;
- O sobrenadante foi coletado, uma alíquota de 50µl foi separada para testes enzimáticos e ao restante adicionou-se um volume igual ao que restou no microtubo (~350µl) de Tampão A 2x;
- Submeteu-se o sistema a choque térmico de 82°C por 15 minutos e centrifugou-se novamente a 12.000g em 4°C por 30 minutos;
- Coletou-se o sobrenadante para continuar a purificação e descartou-se o sedimento.

3.3.10.3. Diálise e Cromatografia de Troca Iônica

Para a purificação da fosfatase alcalina, foi necessário fazer uma diálise e em seguida uma cromatografia, dessa forma, as amostras proteicas com volume total de 6 ml foram unificadas em um saco de diálise que ficou por 24 horas imerso em tampão B para extrair o excesso de sais da amostra.

Após a diálise, a enzima foi submetida ao cromatógrafo ÄKTA Purifier® da GE Healthcare na coluna de troca iônica Q-Sepharose Fast Flow (QFF) de 1ml, da mesma empresa do cromatógrafo, com um fluxo de 1ml por minuto, frações de 0,5ml e

gradiente de 20 volumes por coluna. A coluna foi equilibrada com o tampão B e a amostra foi eluída em um tampão de Tris-HCl de 0,02 a 0,5M e pH 7,4.

3.3.10.4. Análise das Frações por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE

Para verificar o grau de pureza da enzima e se seu tamanho condiz com a literatura, foi feita uma eletroforese em gel SDS-PAGE, de acordo com Laemmli (1970) e Sambrook *et al.* (1989):

- Primeiro fez-se o gel desnaturante a 12% com H₂O, solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris-HCl 1.5M pH 8.8, SDS 10%, Persulfato de amônia 10% e 4µl de TEMED;

- Inverteu-se o gel nas placas verticais de corrida;

- Preparou-se o segundo gel, o gel de concentração da amostra a 5% com H₂O, solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris-HCl 1.0M pH 6.8, SDS 10%, Persulfato de amônia 10% e 4µl TEMED;

- Inverteu-se o segundo gel completando o sistema.

As amostras proteicas foram preparadas conforme a sequência abaixo:

- Misturou-se 15µl das amostras com 5µl tampão 5x;
- Ferveu-se por 5 minutos as amostras;
- Aplicou-se no gel cerca de 20µl das amostras;
- As placas preparadas com os géis foram colocadas na cuba e submersas em tampão tris-glicina 1x;
- O sistema foi submetido à 200V.

Após o término da eletroforese, corou-se o gel de com nitrato de prata, de acordo com o procedimento:

- Fixador: imergir na solução fixadora por 30 segundos no forno de micro-ondas e agitar por 5 minutos em temperatura ambiente;

- Tiosulfato de sódio: imergir o gel na solução de tiosulfato por 30 segundos no forno de micro-ondas e agitar por 2 minutos em temperatura ambiente;

- Nitrato de Prata: após lavar o gel com H₂O destilada, o gel é imerso na solução de prata por 15 segundos no forno micro-ondas e em agitação por 5 minutos em temperatura ambiente;

- Revelador: imergir na solução reveladora durante 20 a 60 segundos a temperatura ambiente;

- Bloqueio da Revelação: lava-se o gel com a solução STOP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção do vetor pUNF

Para que fosse possível construir esse vetor com expressão gênica regulada do gene *phoA*, foi necessário trabalhar com dois vetores prévios, o pPHOA, que possui o gene para fosfatase alcalina (o *phoA*), e o pULA, que possui o sistema de expressão/secreção e a região regulatória completa do operon *lac* (sítio CAP, promotor e operador).

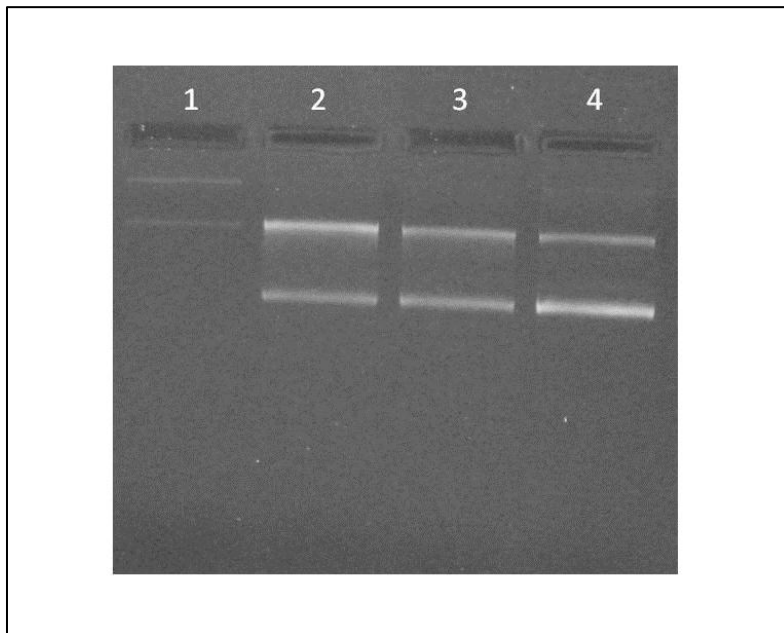


Figura 14 – Perfil Eletroforético das amostras dos vetores que foram utilizados. 1 - pPHOA, 2 a 4 – pULA.

Na figura 14 são apresentados os resultados obtidos a partir da preparação de DNA plasmidial dos vetores pPHOA e pULA.

As bandas do pPHOA apresentam-se em menor quantidade que o pULA e isto está de acordo com o que se conhece pois o pPHOA por ser derivado do pBR322 replica em *E. coli* com menor número de cópias por células (em torno de 20) que o pULA, pois

este último é derivado do pUC18 que atinge maior número de cópias (500 – 700) por células (Allison, 2007).

4.2. Amplificação da região estrutural do gene da fosfatase alcalina por PCR.

O plasmídeo pPHOA foi submetido à técnica de PCR para a amplificação do fragmento que corresponde a região estrutural do gene pPHOA, que codifica a enzima fosfatase alcalina de *E. coli*. Os produtos de 3 diferentes reações de PCR foram então analisados por eletroforese comprovando-se a amplificação de bandas do tamanho, aproximadamente, de 1,3kb, conforme a figura 15, abaixo.

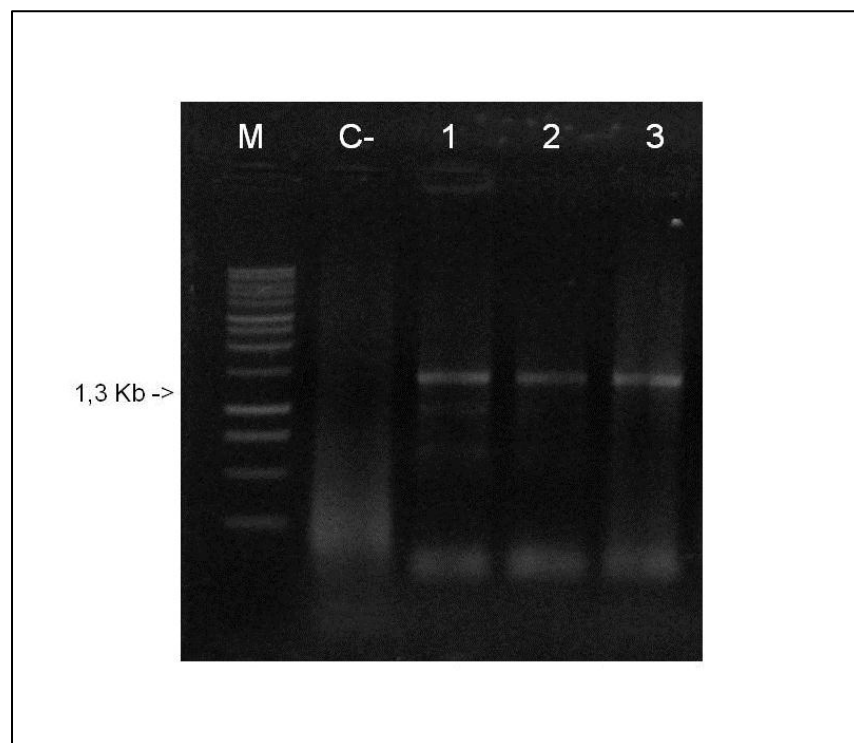


Figura 15 - Perfil eletroforético dos produtos da PCR para amplificação do gene *phoA*. M - Marcador molecular / C- - Controle negativo / 1 a 3 - Amostras amplificadas.

4.3. Isolamento do vetor pULA e do inserto *phoA*

Os plasmídeos pULA e o plasmídeo pGEM[®]-T+*phoA* foram submetidos a dupla digestão enzimática com *Bam*HI e *Hind*III e os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%.

As bandas correspondentes ao pULA linearizado e ao amplicon contendo a região estrutural do gene *phoA* foram cortadas do gel e seus DNAs extraídos.

Alíquotas desses DNAs extraídos e purificados foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e o resultado está mostrado a seguir na figura 16.

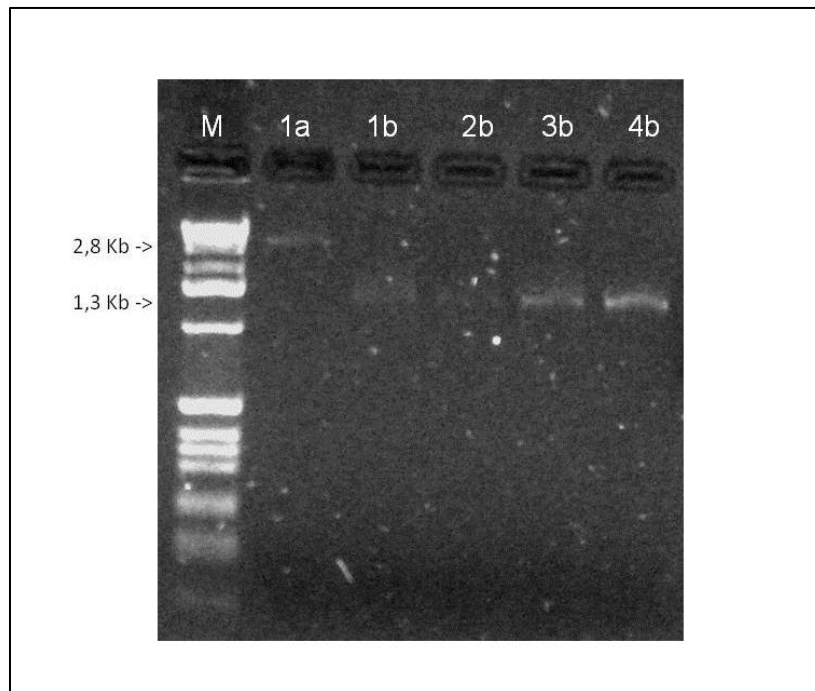


Figura 16 – Perfil eletroforético do vetor e dos insertos purificados. M - Marcador Molecular 1Kb (Fermentas)/ 1a - pULA digerido e purificado / 1b a 4b produto do pGEM[®]-T+*phoA* digerido e purificado.

4.4. Clonagem da região estrutural do gene *phoA* no plasmídeo pULA

Após o gene estrutural da fosfatase alcalina ser purificado, este foi ligado ao pULA, também purificado, formando o plasmídeo recombinante pUNF (figura 17).

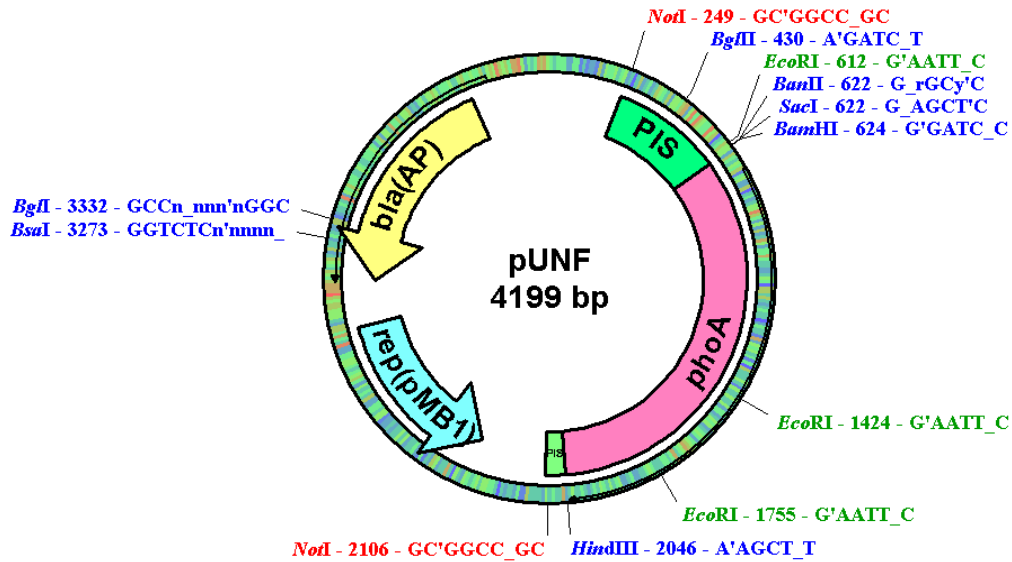
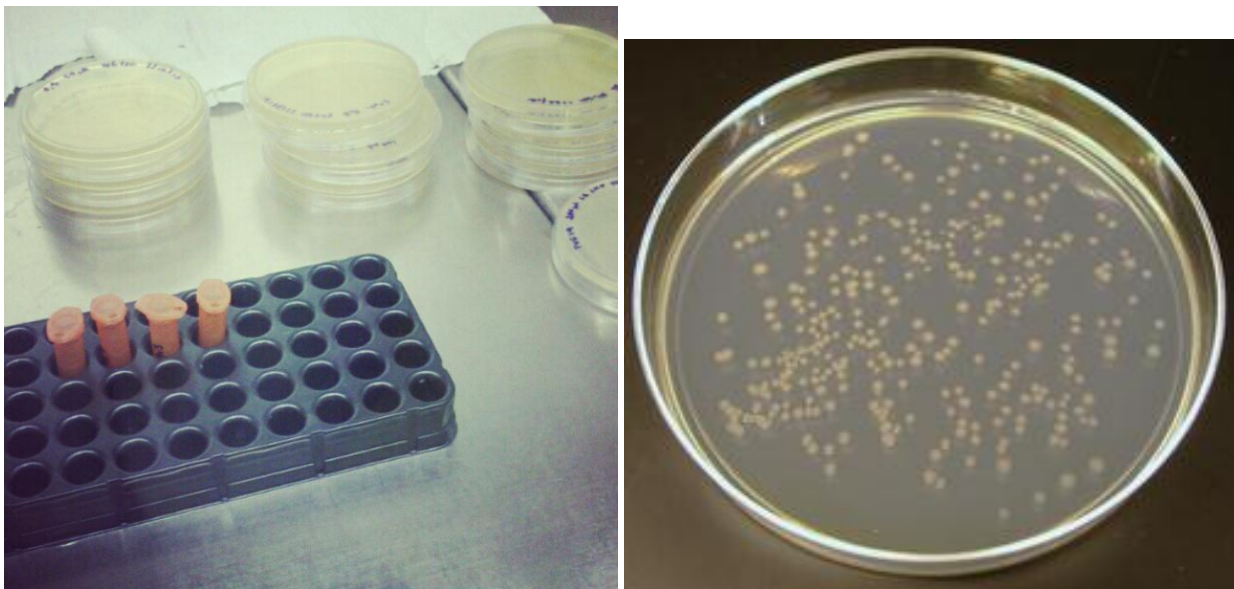


Figura 17 – Mapa físico do plasmídeo pUNF.

4.5. Transformação Genética

A transformação genética ocorreu com uma alíquota do sistema de ligação (1µl) pelo método de eletroporação. O procedimento resultou em cerca de 1000 clones transformados e distribuídos em 10 placas (figura 18e 19).



Figuras 18 e 19 – Placas de clones transformados com o vetor pUNF.

Para escolher os clones recombinantes para dar segmento ao trabalho, 20 clones transformantes foram analisados por PCR de colônias com o par de primer que amplifica a região estrutural do gene *phoA* mostrando que todos os 20 eram recombinantes. Um deles foi selecionado para dar continuidade ao trabalho.

4.6. Análise e Melhoramento da Expressão da Enzima Fosfatase Alcalina

Para análise da expressão do gene *phoA* foi necessário testar algumas variáveis e a primeira delas foi a concentração de glicose no meio de cultivo celular de *E. coli* com plasmídeo pUNF. As concentrações testadas foram: 0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5% e 1% em função do tempo.

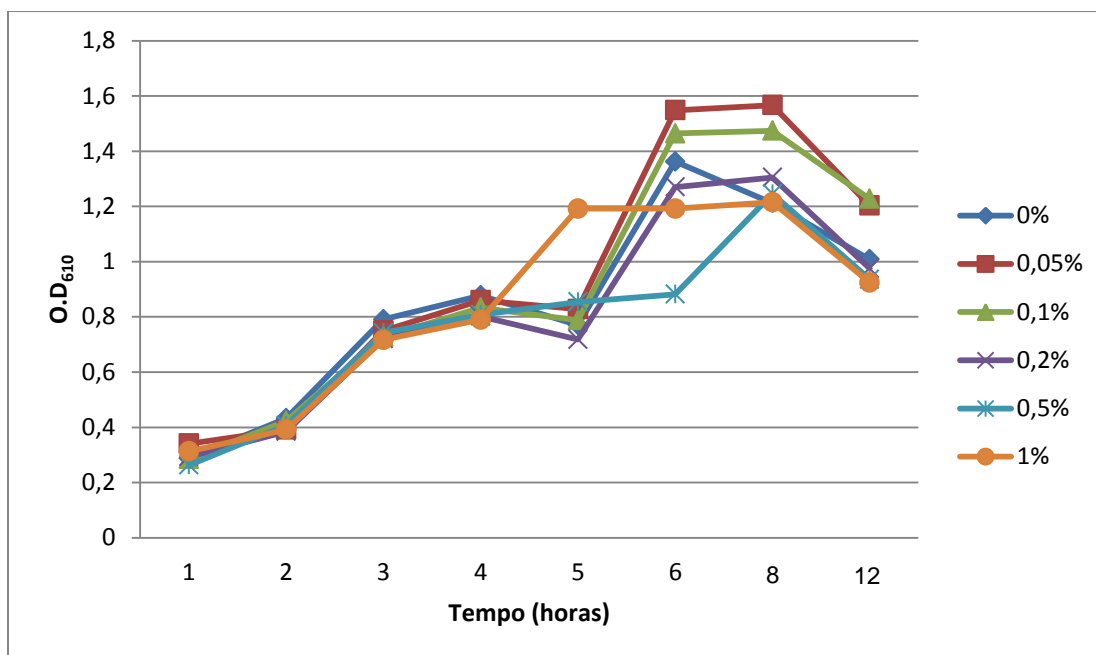


Gráfico 1 – Crescimento de *E. coli* com o plasmídeo pUNF em função de diferentes concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultivo.

O gráfico 1 mostra que não houve grande variação no crescimento das culturas em diferentes concentrações de glicose (a O.D.₆₁₀ variou de 1,2 a 1,6). Sendo que o melhor crescimento ocorreu com 0,05% de glicose.

O produto da reação da BAP utilizando o P-NitroFenilFosfato é o P-NitroFenol (PNFol) que pode ser quantificado espectrofotometricamente medindo-se a absorbância a 405nm (Caldeira, 2010).

O gráfico 2, abaixo mostra a equação da reta que relaciona a ABS_{405nm} , com a concentração de P-NitroFenol (PNFol), utilizada nesse trabalho.

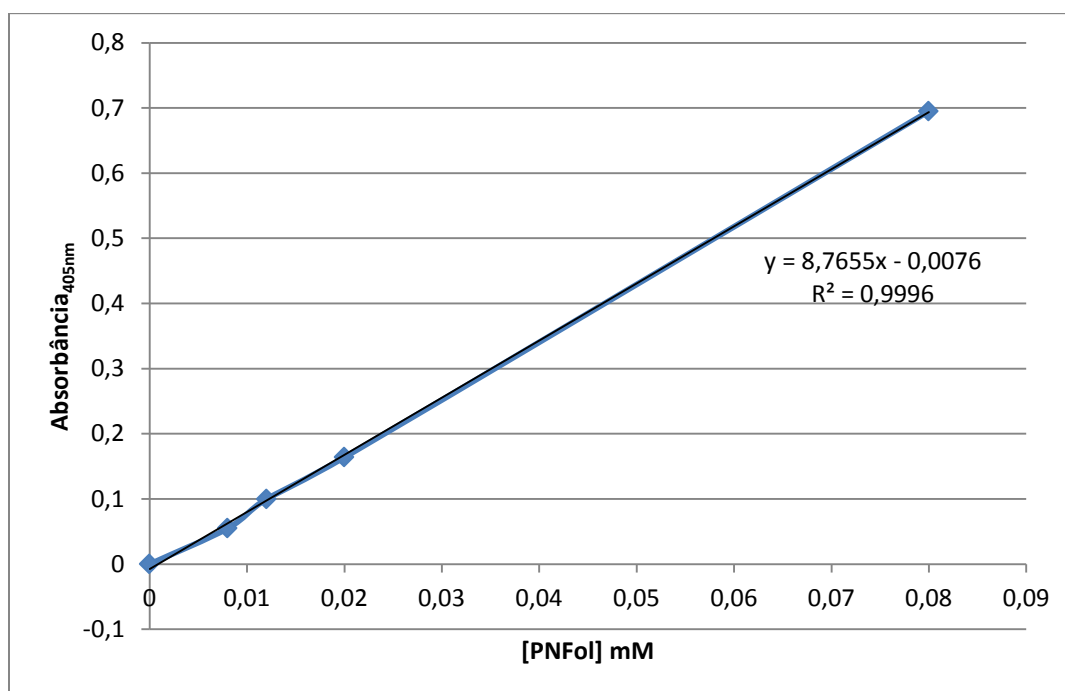


Gráfico 2 – Reta padrão de ABS_{405nm} em função da concentração de P-NitroFenol e a equação da reta.

As culturas realizadas nas diferentes concentrações de glicose sem a presença do indutor (IPTG) tiveram suas atividades enzimáticas analisadas a partir do sobrenadante.

Os resultados estão mostrados no gráfico 3 a seguir, onde observou-se que não houve expressão de valores significativos de BAP nas maiores concentrações de glicose. Esse resultado é compatível com o que se conhece da regulação do *operon lac*, uma vez que devido a presença de glicose o sistema não é ativado pela CAP-Amp e na ausência do indutor o sistema continua reprimido. Por outro lado em concentração baixa (0,05%) ou nula (0%) de glicose o sistema é ativado e já produz níveis significativos de fosfatase alcalina, mesmo na ausência do indutor (IPTG).

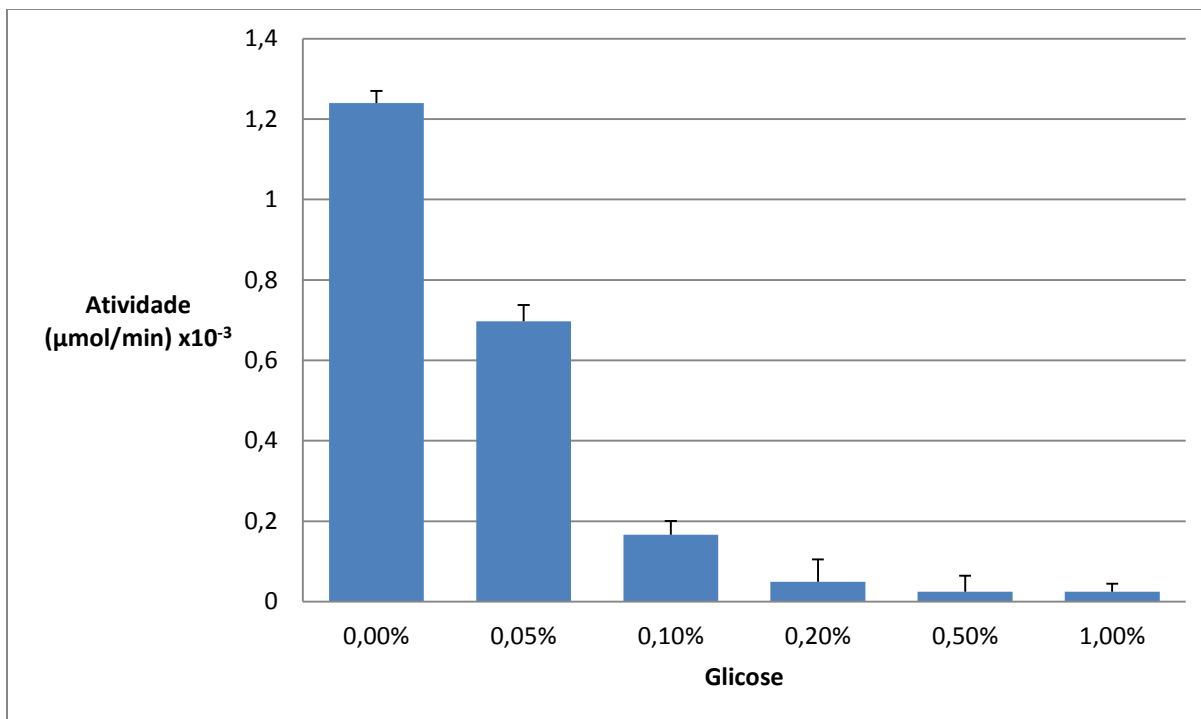


Gráfico 3 – Teste enzimático das amostras de clones com pUNF cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na ausência de IPTG (indutor).

Ainda testando a expressão de fosfatase alcalina em diferentes concentrações de glicose, novos cultivos foram realizados, porém dessa vez na presença do indutor IPTG em uma concentração única de 1mM, pois essa concentração é a comumente utilizada em sistemas de expressão para *E. coli* (Eron, 1971 e Silva 2005).

Após 5 horas em crescimento com glicose, foi adicionado o IPTG e apenas 18hrs depois, verificou-se a atividade enzimática extracelular. O resultado está mostrado no gráfico 4 a seguir.

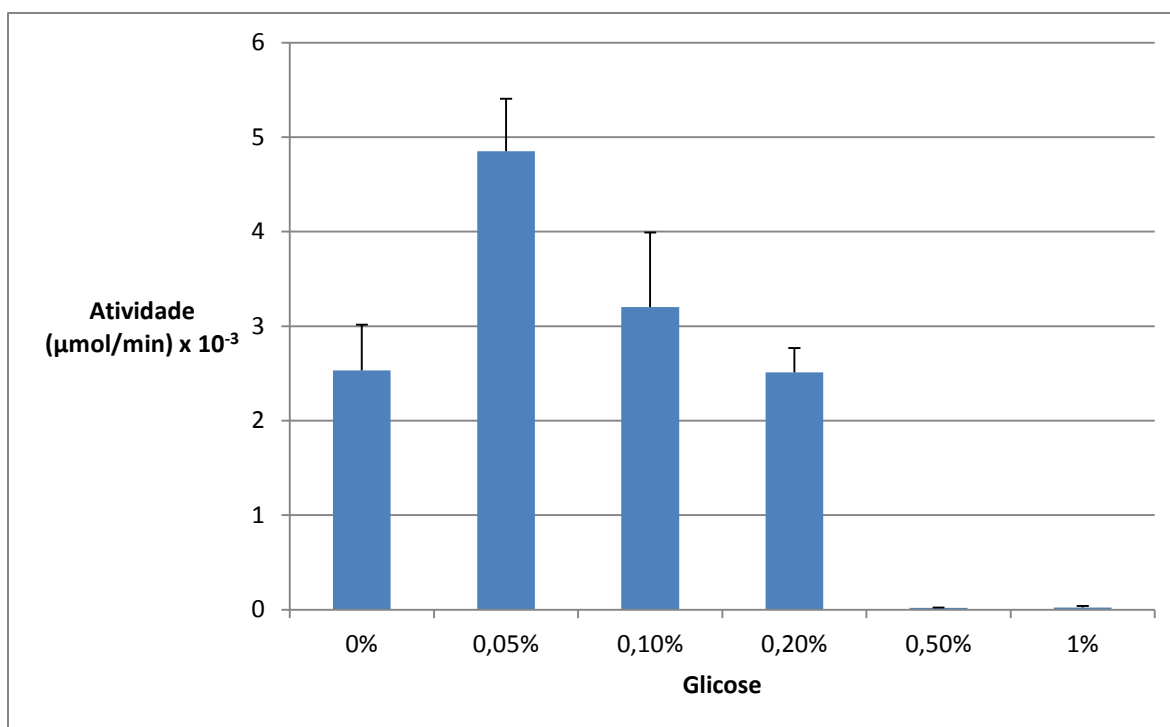


Gráfico 4 – Teste enzimático das amostras de clones com pUNF cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na presença de 1mM de IPTG.

No gráfico 4 pode-se destacar que houve uma expressão significativa em concentrações iguais e menores que de 0,2% de glicose no meio. A maior expressão com 1mM de IPTG ocorreu com a concentração de 0,05% de glicose, resultando em atividade de $4,85 \times 10^{-3}$ μmol/min. Esse resultado mostra que para que ocorra a expressão significativa de fosfatase alcalina, não basta que o sistema esteja plenamente induzido (1mM IPTG), mas necessita estar ativado com baixas concentrações de glicose. Isto também está de acordo com o que está descrito do processo de regulação do *operon lac* (Lodish, 2005).

Após verificar e confirmar que para expressão gênica na presença do IPTG o sistema pUNF teve seu melhor desempenho na presença de 0,05% de glicose, novas amostras foram cultivadas com a presença da melhor concentração de glicose, assim

como o melhor tempo de crescimento celular e assim, testes com um gradiente de concentração de IPTG foram realizados.

A seguir padronizou-se a concentração de 0,05% de glicose nos cultivos e variaram-se as concentrações de IPTG – 0.1mM, 0.25mM, 0.5mM e 1mM.

Uma alíquota das amostras foi retirada 4 horas após o acréscimo de IPTG e observou-se que houve pouca expressão em todas concentrações de IPTG, possivelmente porque em 4 horas havia ainda poucas enzimas no meio extracelular, pois as mesmas deveriam estar no ambiente periplasmático. Ainda assim, no gráfico 5, é possível destacar uma maior atividade com a concentração de 1mM de IPTG, com $0,28 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}$.

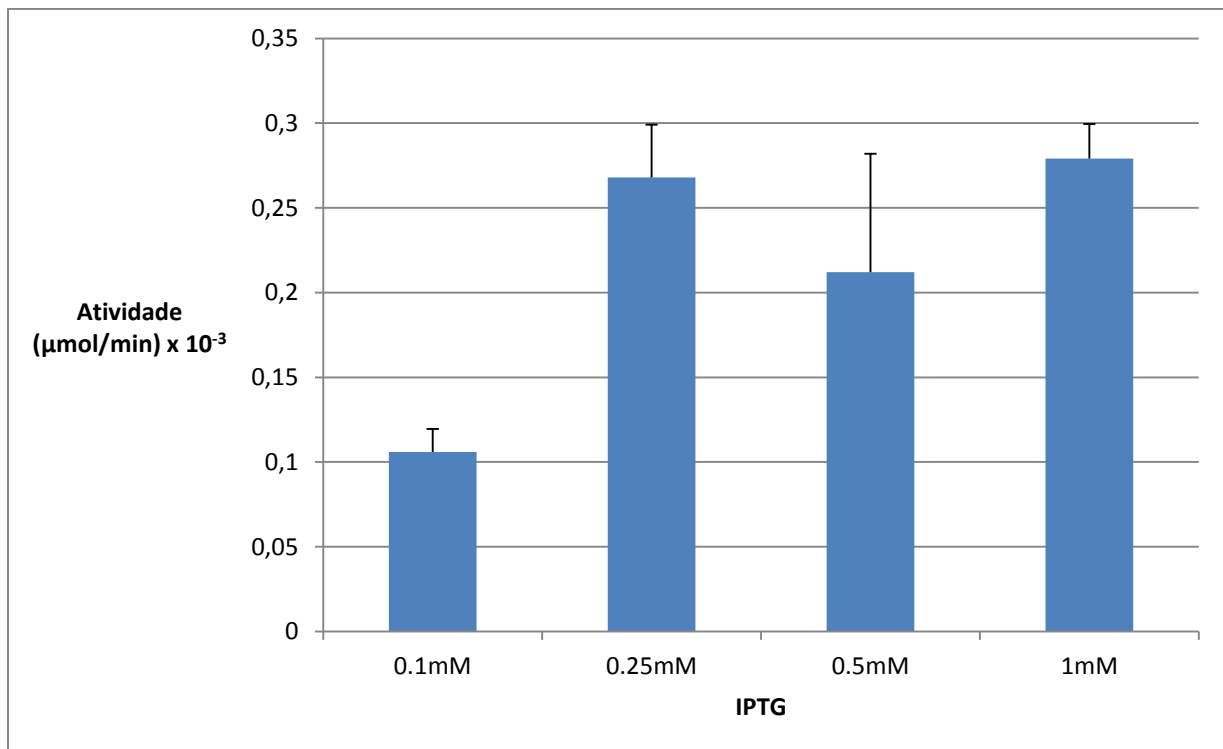


Gráfico 5 – Teste enzimático de clones com pUNF cultivados em 0,05% de glicose e diferentes concentrações de IPTG após 4 horas de indução.

Para testar a hipótese de que com 4 horas de cultivo a BAP estaria ainda no compartimento periplasmático, um novo experimento foi realizado mantendo a glicose

em 0,05%, variando-se o IPTG mas analisando-se a atividade extracelular da BAP após 16 horas de indução. O resultado está mostrado no gráfico 6 a seguir.

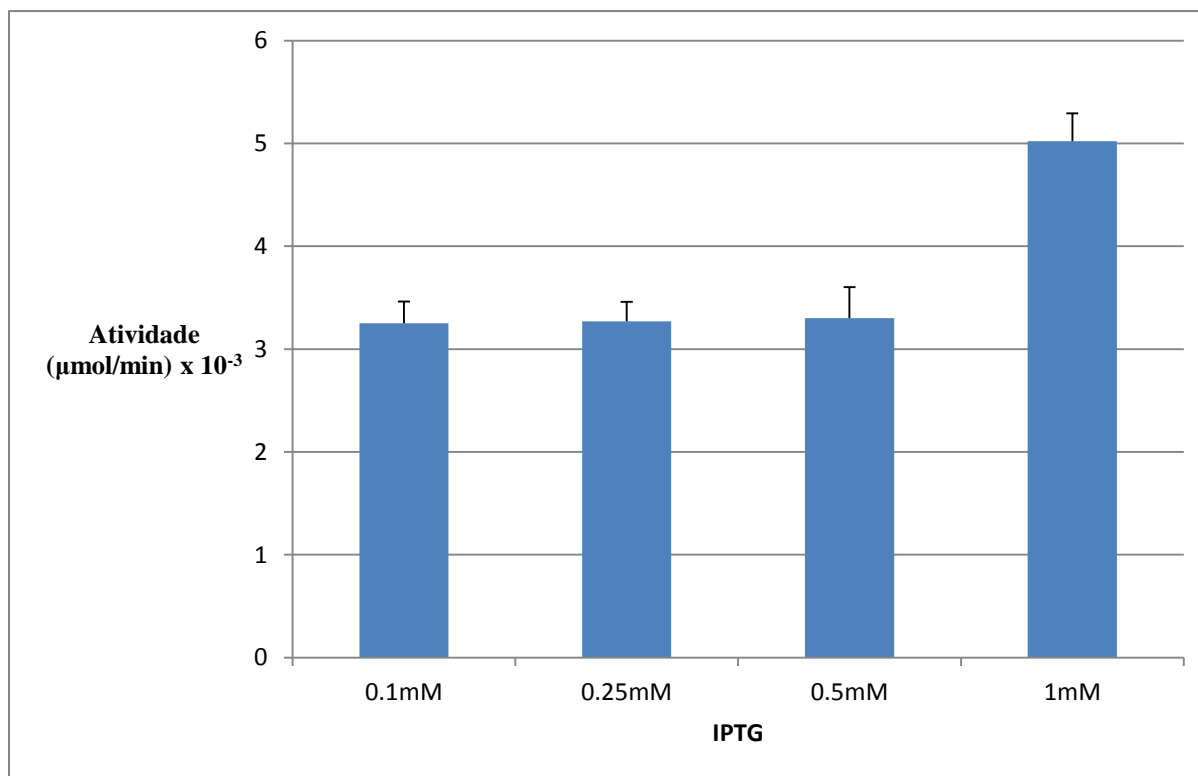


Gráfico 6 - Teste enzimático de clones com pUNF cultivados em 0,05% de glicose e diferentes concentrações de IPTG após 16 horas de indução.

Pode-se observar que a expressão enzimática atingiu seu ápice com 5.02×10^{-3} $\mu\text{mol}/\text{min}$ na concentração de 1mM de IPTG e em baixa concentração de glicose. A atividade extracelular às 16 horas é da ordem de 20 vezes maior que a 4 horas, indicando que a enzima poderia estar sendo retida no periplasma e só passaria para o meio extracelular na fase estacionária da cultura provavelmente devido a lise celular.

Sabendo das melhores condições dentro das variáveis testadas, foi analisada a expressão da fosfatase alcalina em dois compartimentos, intra-celular e extra-celular (meio de cultivo), supondo-se que seria possível, ainda, obter mais enzimas lisando as células íntegras que resistiram por mais tempo ao cultivo. O resultado está mostrado no gráfico 7 a seguir.

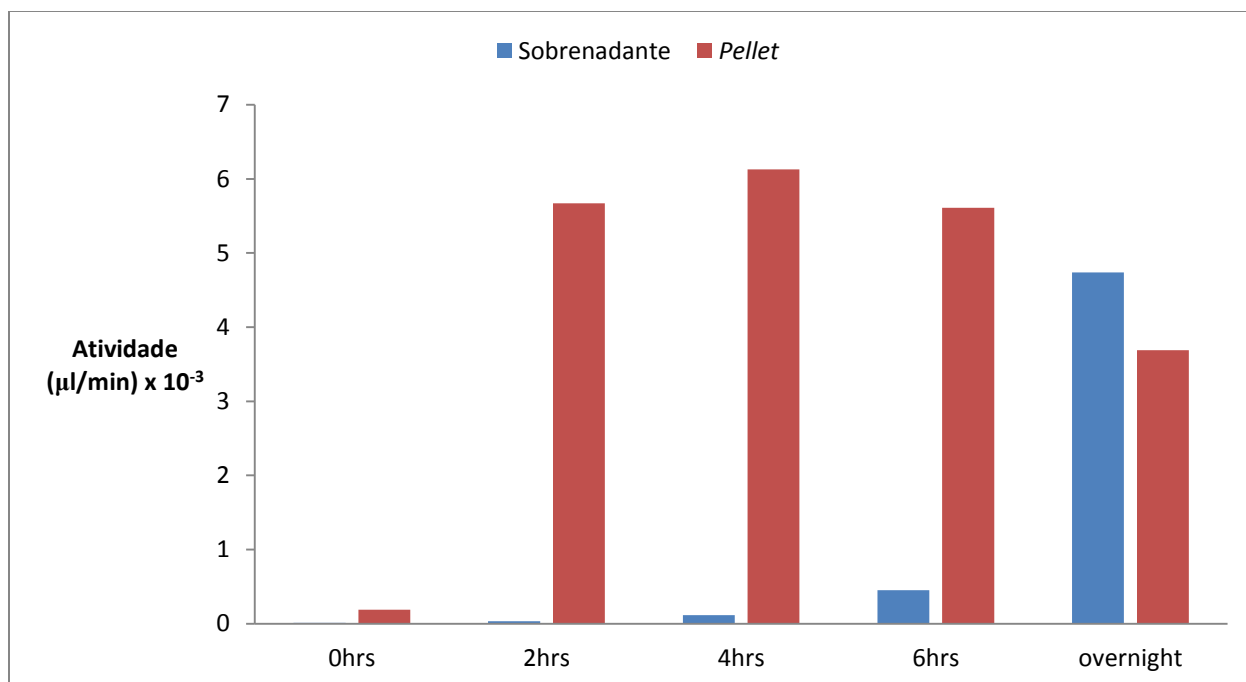


Gráfico 7 – Teste enzimático dos clones do pUNF cultivados e induzidos nas melhores condições testadas nos dois compartimentos: extra-celular (sobrenadante) e intra-celular (*pellet*).

O gráfico mostra claramente que até 6 horas de cultivo, grande parte da fosfatase alcalina permanece intra-celular, possivelmente no periplasma.

Durante o cultivo “*overnight*” boa parte das células de *E. coli* lisariam e a fosfatase alcalina contida no periplasma passaria para o meio extra-celular. Esse resultado explica a baixa atividade de fosfatase alcalina extra-celular na presença de 0,05% de glicose e com diferentes concentrações de IPTG obtidas após 4 horas de indução (gráfico 5, página 57), pois nessas condições, grande parte da enzima estava retida no periplasma.

O resultado sugere também que o processo para purificar a fosfatase alcalina poderia ser mais simples extraíndo-se a enzima do periplasma de células induzidas por 4 horas, pois dessa forma seriam evitados os contaminantes do meio de cultivo e das proteínas citoplasmáticas. Por isso esse procedimento foi utilizado para a purificação da enzima nesse trabalho.

4.7. Purificação

Durante o processo de purificação da BAP, após a terminativação, as proteínas solúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, sendo que o resultado da análise esta mostrado na figura 20 a seguir.

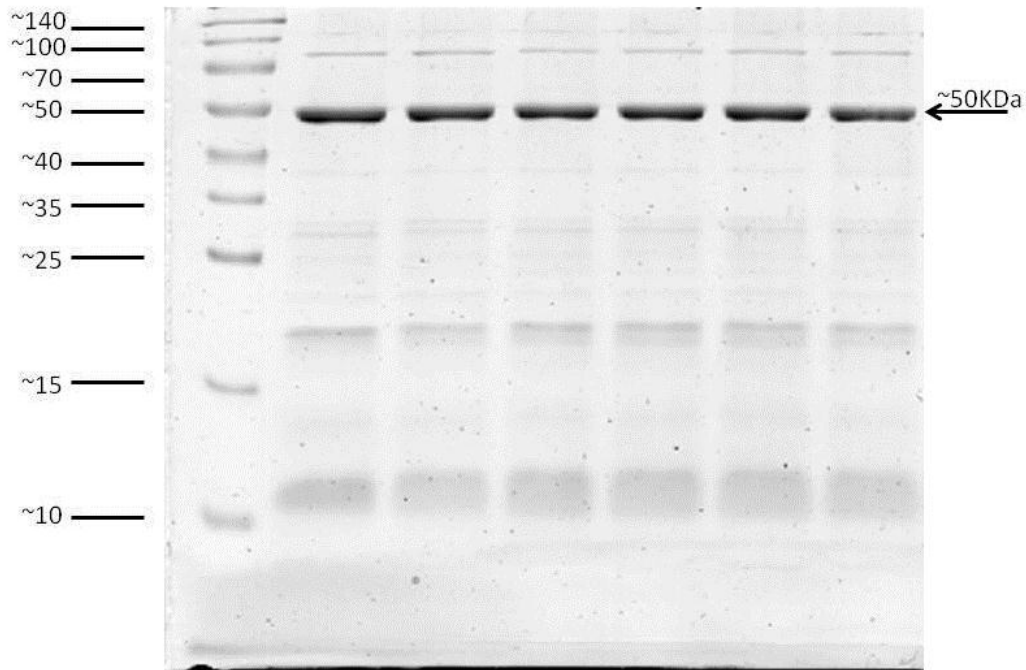


Figura 20 – Perfil eletroforético após termoprecipitação e antes da cromatografia. A faixa com as bandas mais escuras estão localizadas próximas ao que marcador indica 50Kda, dessa forma indicando ser a fosfatase alcalina de *E. coli* já que a mesma possui 56Kda de acordo com a literatura.

Pode-se verificar já nessa etapa de purificação uma banda principal de cerca de 50Kda, provavelmente correspondente a fosfatase alcalina, além de algumas outras bandas coradas menos intensamente.

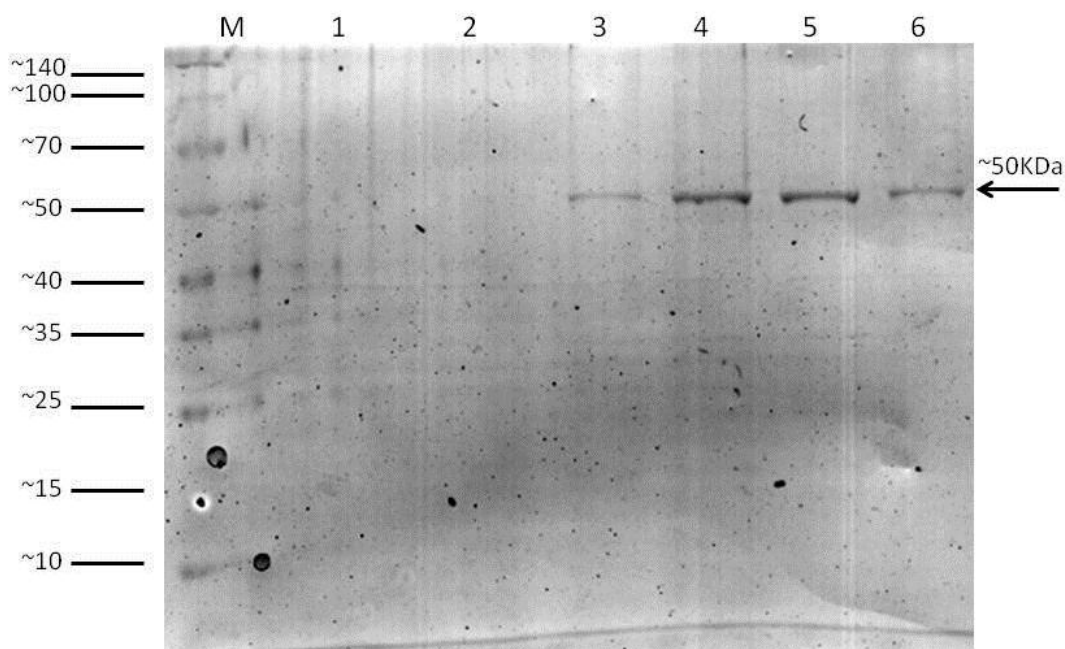


Figura 21 – Perfil eletroforético das frações cromatográficas. Verifica-se apenas a faixa próxima a - 50Kda o que indica a pureza da enzima fosfatase alcalina.

O material terminativo passou por diálise e cromatografia de troca iônica e as diferentes frações foram analisadas por SDS-PAGE e o resultado está mostrado na figura 20. As frações nos poços 3, 4, 5 e 6 mostraram na eletroforese uma única banda de cerca de 50Kda indicando que a enzima foi purificada.

4.8. Atividade enzimática da enzima purificada

Após a cromatografia, todas as frações pares foram testadas sendo que as frações 24, 26, 28, 30, 32 e 34, apresentaram atividades enzimáticas maiores, como é mostrado no gráfico 8 a seguir. Onde o pico mais alto mostrou atividade de 2.01×10^{-3} $\mu\text{mol}/\text{min}$.

As frações 3, 4, 5 e 6 do perfil eletroforético da figura 20, correspondem as frações 28, 30, 32 e 34 do gráfico 8.

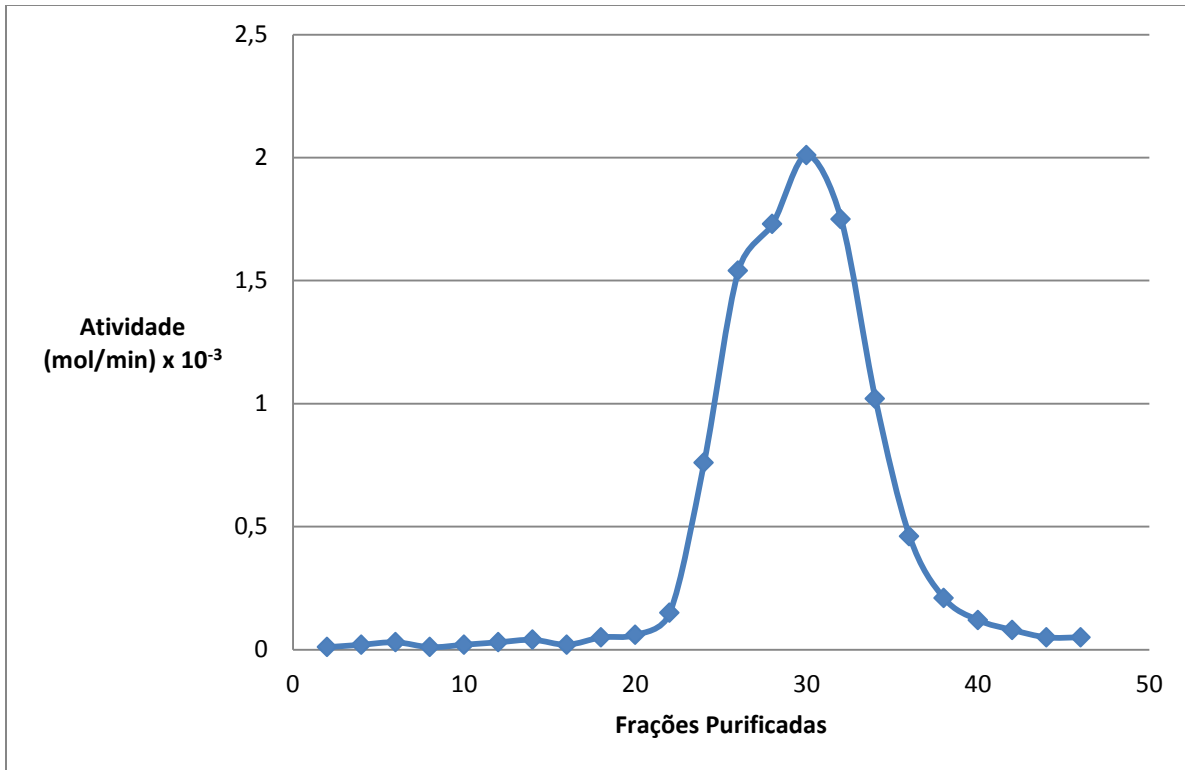


Gráfico 8 – Atividade enzimática das frações purificadas de fosfatase alcalina.

Nossos resultados mostraram ser possível produzir boa quantidade de fosfatase alcalina em cultivos da *E. coli* recombinante com 0.05% de glicose e 1mM de IPTG em 4 horas de indução. Ou seja, produzir $6,13 \times 10^{-3}$ UI ($\mu\text{mol}/\text{min}$) em $10\mu\text{l}$ de amostra enzimática (fração terminativa), o que corresponde a 143 UI por litro de cultura.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O gene *phoA* foi subclonado no vetor pULA com sucesso, dando origem ao vetor pUNF.
- O sistema de regulação da expressão gênica do vetor pUNF se mostrou funcional, sendo ativado pela ausência de glicose e induzido pela presença de IPTG.
- A melhor expressão da enzima no sistema em questão, ocorreu em meio de cultivo com concentração de 0,05% de glicose e com um 1mM de IPTG.
- É possível obter com o sistema testado, em torno de 143 UI da enzima fosfatase alcalina purificada por litro de cultura.
- O sistema regulável e funcional poderá ser testado e utilizado para produção recombinante de outras enzimas de interesse.
- Diante do resultado apresentado, é possível fazer mais testes e analisar o potencial de produção comercial da enzima em questão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, LIZABETH. **Fundamental Molecular Biology**. Blackwell Publishing, MA, U.S.A. 2007.

AFFYMETRIX INC. **USB Shrimp Alkaline Phosphatase**. Ohio, U.S.A., 2013

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. **Molecular Biology of the Cell**. NewYork: Garland science, Taylor & Francis Group, p. 1268, 2008.

ASSUNÇÃO, E. N. **Expressão regulada de α -amilase de *Bacillus licheniformes* em *Escherichia coli* utilizando o vetor de expressão/secreção pAC081**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

AZEVEDO, M. O., *et al.* **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Universidade de Brasília, 2003.

BARROS, E. V. S. A.; BATAUS, L. A. M., VALÊNCIA, F. F., MARANHÃO, ANDREA Q.; ASTOLFI-FILHO, S. **A novel cloning system for direct screening using a suicidal strategy**. *Gene*. **179**, 287-289. 1986.

BASSETT, D. E. Jr., Eisen, M. B. and Boguski, M. S., **Gene expression informatics – it's all in your mine**. *Nat. Genet.*, **21** (Suppl 1) 51-55. 1999.

BERTOLINI, L. R. **Clonagem do gene *phoA* e purificação da enzima fosfatase alcalina de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

BIANCONI, M. L. **Fosfatase Alcalina**. Texto disponível em <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/fosfatase.htm>. IBqM/UFRJ. 2006.

BON, ELBA P. S., *et alii*, **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Ed. Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT. Portugal. 2008.

BOULANGER, R. R. Jr. & KANTROWITZ, E. R. **Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution**. J. Biol. Chem. 2003.

BRADSHAW *et at*. **Amino acid sequence of *E. coli* alkaline phosphatase**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3473-3477. 1981.

CALDEIRA, M. V. **Determinação da actividade enzimática da Fosfatase Alcalina**. Métodos e Técnicas em Biologia Molecular. Universidade de Coimbra. 2010.

CARVALHO, H. F. & RECCO-PIMENTAL, S.M. **A Célula**. 2ª Ed. Barueri, SP., Manole, 2007.

CHANG, C.N., W.-J. KUANG, E.Y. CHEN. **Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli***. *Gene* 44:121-125, 1986.

COLEMAN, J. E. **Structure and mechanism of Alkaline Phosphatase**. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. Vol. 21: 441-483. 1992.

CUMMINS *et al*. **Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application to the Partial Purification of Soluble Mammalian Prolyl Oligopeptidase**. Methods in Molecular Biology. Volume 681, p. 215-228. 2011.

CUMMINGS, B. **Operon lac**. Pearson Education Inc., copyright, 2006.

ERON, L.; BLOCK, R., **Mechanism of Initiation and Repression of *In Vitro* Transcription of the *Lac Operon* of *Escherichia coli*.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 68, pg. 1828-1832, USA. 1971

FARAH, S. B., **DNA: Segredos & Mistérios.** 2ª ed., Ed. Sarvier. São Paulo. 2007.

FURIGO JUNIOR, A., PEREIRA, E. B., **Enzimas e suas aplicações: Cinética Enzimática.** UFSC. Departamento de engenharia química e engenharia de alimentos, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M., **An Introduction to Genetic Analysis.** Freeman and Company – 7th edition. New York, 2000.

HOLTZ, K. M.; STEC, B.; MYERS, J. K.; ANTONELLI, S. M.; WIDLANSKI, T. S.; KANTROWITZ, E. R. **Alkaline modes of binding in two crystal structures of alkaline phosphatase-inhibitor complexes,** *Protein Science*, Cambridge University. U.S.A., 2000.

HOLTZ, K. M.; STEC, B.; KANTROWITZ, E. R. **A model of transition state in the alkaline phosphatase reaction.** *J. Biol. Chem.*, 274 (13). 1999.

INVITROGEN CORPORATION. **MAX efficiency[®] DH5 α F'IQ[™] Competent Cells.** 2007.

INVITROGEN CORPORATION. **Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP).** 2002.

INVITROGEN CORPORATION. **Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP).** 2003.

KAMITANI *et al.*, **Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme.** *Embo J.* Vo. 11, p. 57-62. 1992.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR. A. **Purificação de produtos biotecnológicos.** São Paulo:Manole, 2005, 988 p

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 227, p. 680-685. 1970

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. **Lehninger Principles of Biochemistry.** W. H. Freeman Company. 5th, 2008.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; BALTIMORE, D.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J.; **Biologia Celular Molecular.** 5ed. RGS: Artmed. Porto Alegre, 2005

MADEJ, T.; ADDESS, K. J.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; LANCZYCKI, C. J.; LIU, C.; LU, S.; MARCHLER-BAUER, A.; PANCHENKO, A. R.; CHEN, J.; THIESSEN, P. A.; WANG, Y.; ZHANG, D.; BRYANT, S. H. **MMDB: 3D structures and macromolecular interactions.** *Nucleic Acids. Res.* Vol. 40 (D1). 2011.

MAKINO *et al.*, **Regulation of the phosphatase alkaline of *Escherichia coli* K-12: Regulation and role of the regulatory gene *phoR*.** *J. Mol. Biol.* Vol. 184, p. 231-240. 1985.

PROMEGA CORPORATION. **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual.** Technical manual. U.S.A. 2010.

PRESTON, A. **Choosing a cloning vector.** *Methods Mol Biol.* Vol. 235, p. 19-23. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, USA. 1989.

SILVA, MARCELLO. **Clonagem, Expressão e Purificação das Proteínas de Superfície, PsaA e Fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae***. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Interunidades em Biotecnologia. USP. São Paulo. 2005.

TOMAZIC-ALLEN S. J. **Recombinant bacterial alkaline phosphatase as an immunodiagnostic enzyme**. *Ann Biol. Clin.* Vol. 49 p. 287. Paris. 1991.

VOET, D.; VOET J. G. **Fundamentos da Bioquímica**. 2ed. Ed.: Wiley. New York. 2001.

WAMBALE, J. M.; ZHAOHUI, N.; KIMATU, J. N.; LI, F.; ***Escherichia coli* phoA gene inactivation, insertion and restoration based on the λ red system**. African Journal of Microbiology Resarch. Vol. 4 (10), p. 903-914. 2010.