Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2024

Docente:
Felipe Chambergo (fscha@usp.br) - https://sites.usp.br/lbbp

Monitores:
Augusto Roldan Gonçalves - augusto.roldan@usp.br
Henrique dos Santos Hernandes - hernandesrique@usp.br

Servidores não-docentes:
Tec. Pedro Manoel dos Santos - pedroms@usp.br

Créditos: 4
Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

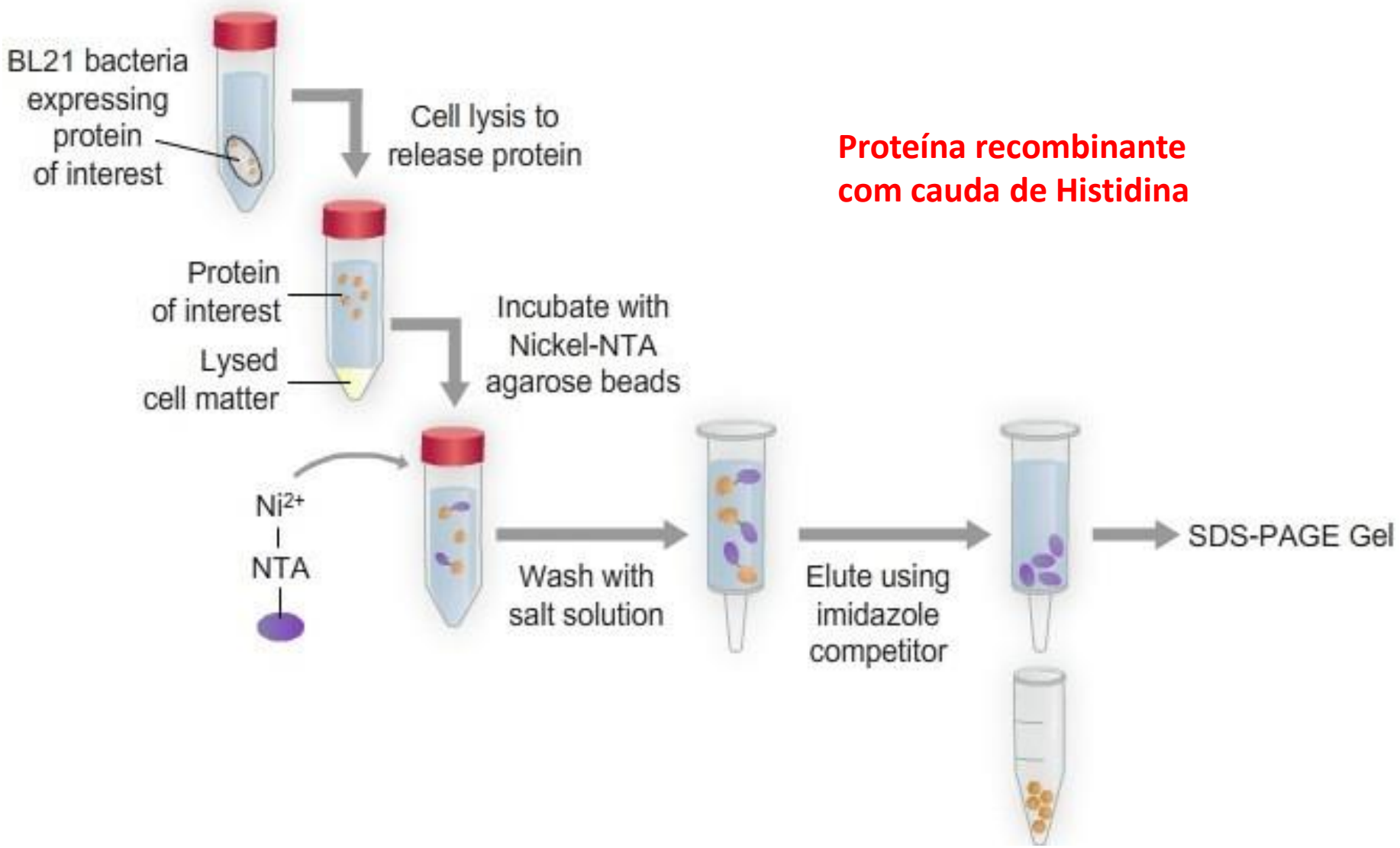
USP - 2024

Purificação de Proteína Recombinante e Determinação de atividade enzimática:

- Enzima Acetil Esterase:

Purificação e atividade

Purificação de proteínas por Cromatografia de afinidade



Proteína recombinante com cauda de Histidina

https://www.thermofisher.com

Purificação e determinação de atividade da Enzima Acetil Esterase (TfAEST)

Procedimento para Purificação por Cromatografia de afinidade:

Procedimento:

1. ETAPA DE LIGAÇÂO: Em eppendorf de 2 ml, acrescentar 1,5 mL do sobrenadante bacteriano e adicionar 250 ul de resina agarose Ni-NTA (Qiagen, USA).

2. Homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 10 minutos.

3. Em seguida, centrifugar por 1 min a 5.000 rpm, para sedimentar a resina, e transferir 100 µl do sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 1.5 ml (**T1**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar.

Obs: As amostras de sobrenadante conterão proteínas que não se ligaram à resina.

4. ETAPA DE LAVAGEM: Adicione 1 mL de **TAMPÃO A** (tampão fosfato de sódio 50 Mm/ NaCl 500 mM, pH 7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.

5. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir 100 µl do sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 1.5 ml (**T2**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar.

REPETIR OS PASSOS 4 e 5 (**T3**)

6. ETAPA DE ELUIÇÂO: Acrescentar 300 µl de **TAMPÃO B** (tampão fosfato de sódio 50 mM/ NaCl 500 mM/ Imidazol 500 mM, pH 7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.

7. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir TODO o sobrenadante restante cuidadosamente para um novo tubo eppendorf de 1.5mL (**T4**, armazenar no gelo).

Obs: O sobrenadante dessa etapa contém a enzima purificada.

8. Correr as amostras coletadas nos tubos **T1 – T4** (25 µl) em gel SDS-PAGE.

Mapa do gel SDS-PAGE

Gel 1, 2, 3 e 4: Purificação enzima Acetil Esterase

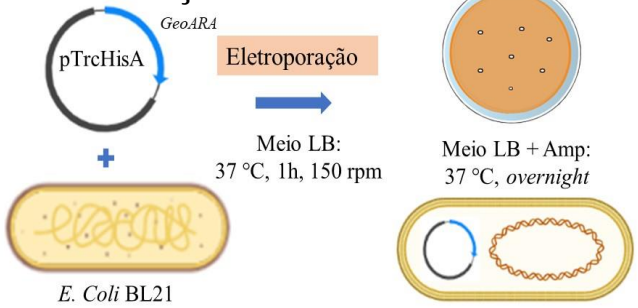
1- Marcador de Peso Proteínas
2- Sobrenadante
3- TfAEST T1 - G1
4- TfAEST T2 – G1
5- TfAEST T3 – G1
6- TfAEST T4 – G1
7- TfAEST T1 – G2
8- TfAEST T2 – G2
9- TfAEST T3 – G2
10- TfAEST T4 – G2

Procedimento para determinação da atividade enzimática

	Branco	T1	T2	T3	T4
Tampão de atividade	75 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Substrato	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Enzima	0	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Volume Final	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
DO 405 nm					
Micromols de Produto					

Expressão, purificação e atividade de Proteína recombinante

1 Transformação e Seleção



2 Produção da Proteína

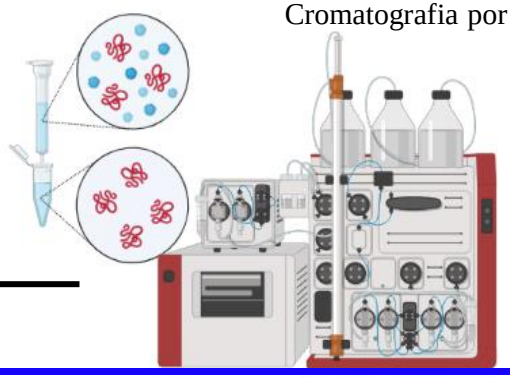
200 mL de meio
LB + amp +
IPTG
37 °C, *overnight*,
150 rmp

3 Lise celular

Sonicação

4 Purificação

Cromatografia por afinidade

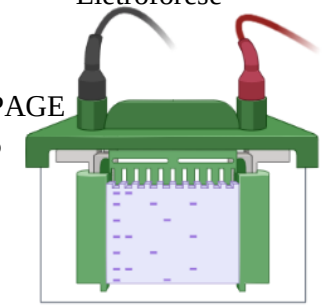


- Ligação
- Lavagem
- Eluição

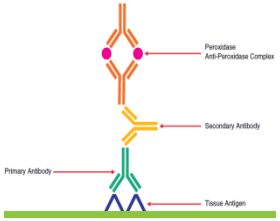
5 Análise da purificação

Eletroforese

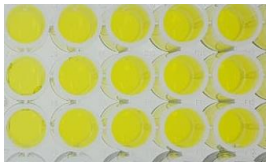
SDS-PAGE
12,5%



6 Análise de atividade

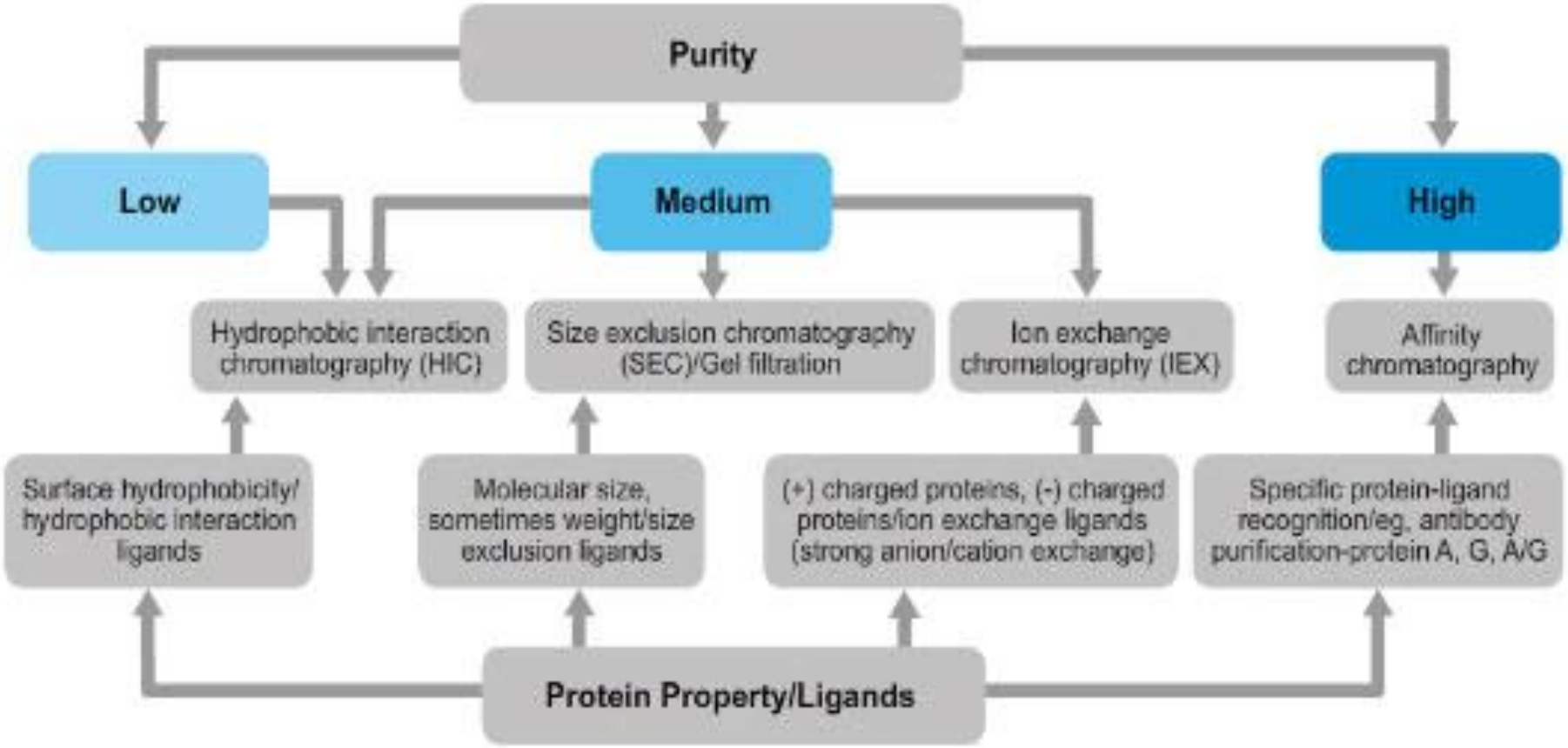


Western Blot



Enzimática

Purificação de proteínas por Cromatografia



Classes de Cromatografia

Property	Technique
Size	Size exclusion chromatography (SEC), also called gel filtration (GF)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction chromatography (HIC) Reversed phase chromatography (RPC)
Charge	Ion exchange chromatography (IEX)
Biorecognition (ligand specificity)	Affinity chromatography (AC)
Isoelectric point (pI)	Chromatofocusing (CF)

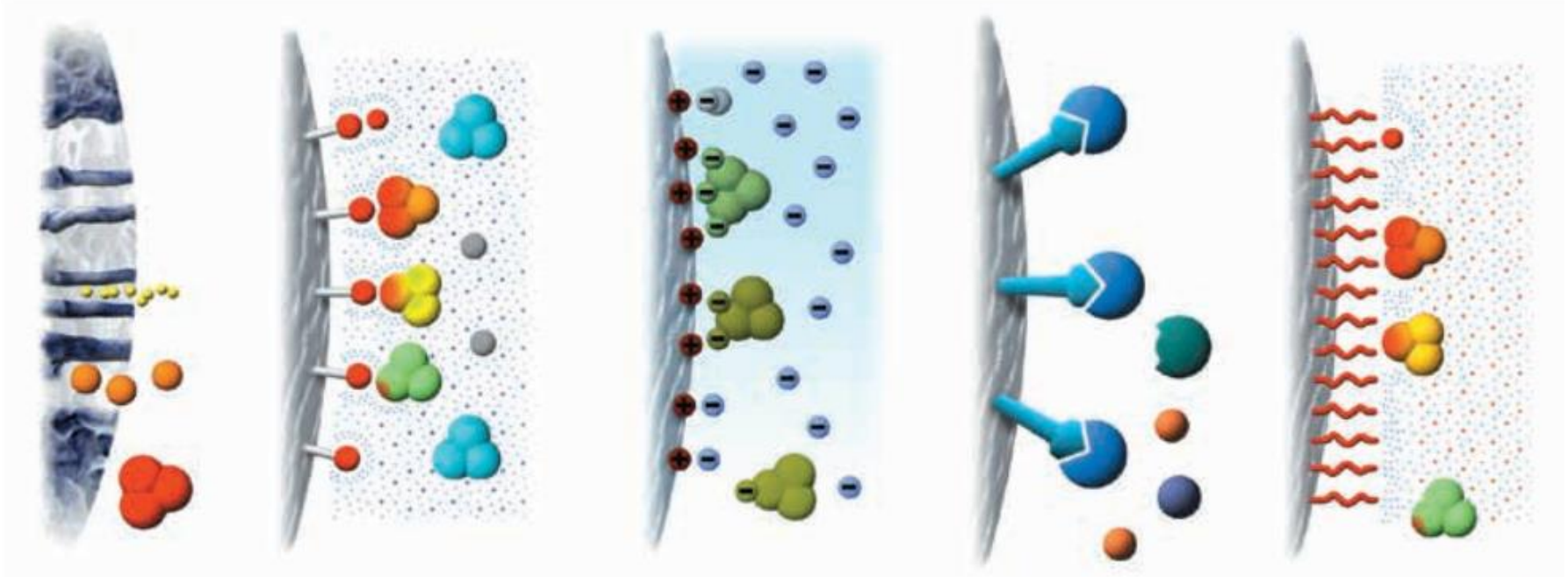
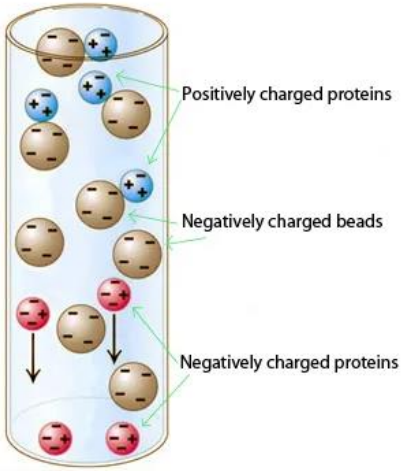
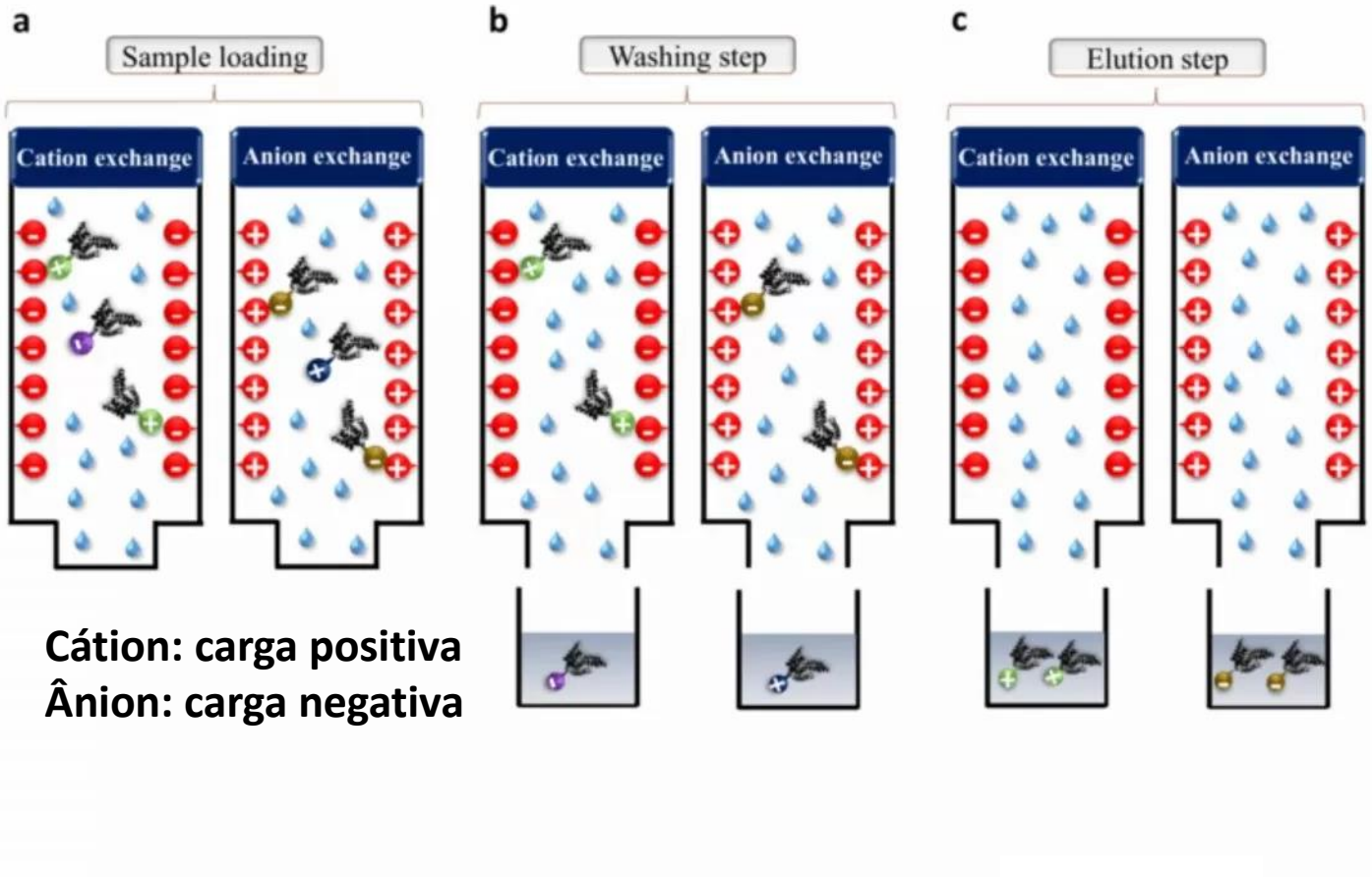


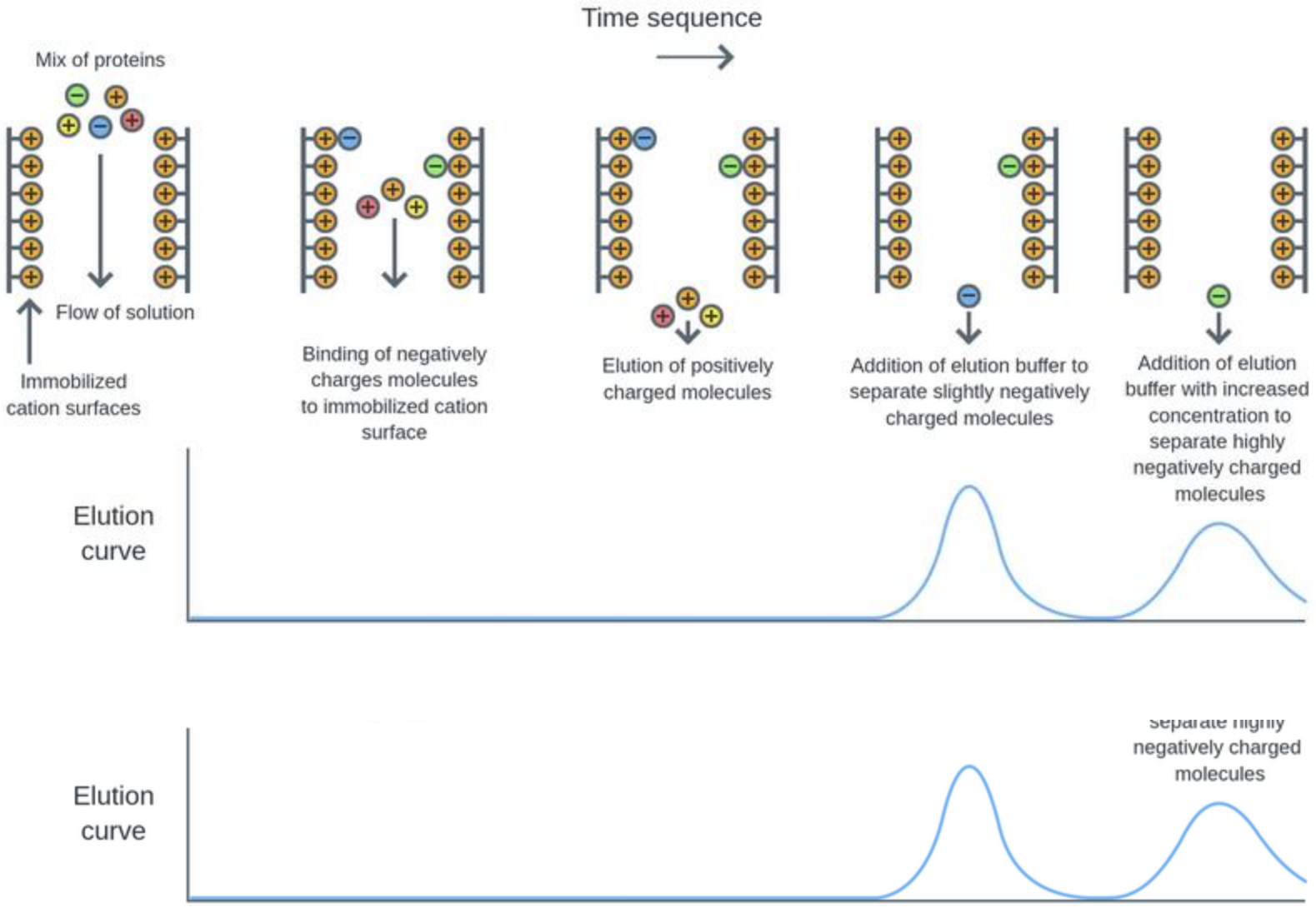
Fig I.1. Schematic drawing of separation principles in chromatography purification. From left to right: SEC, HIC, IEX, AC, and RPC.

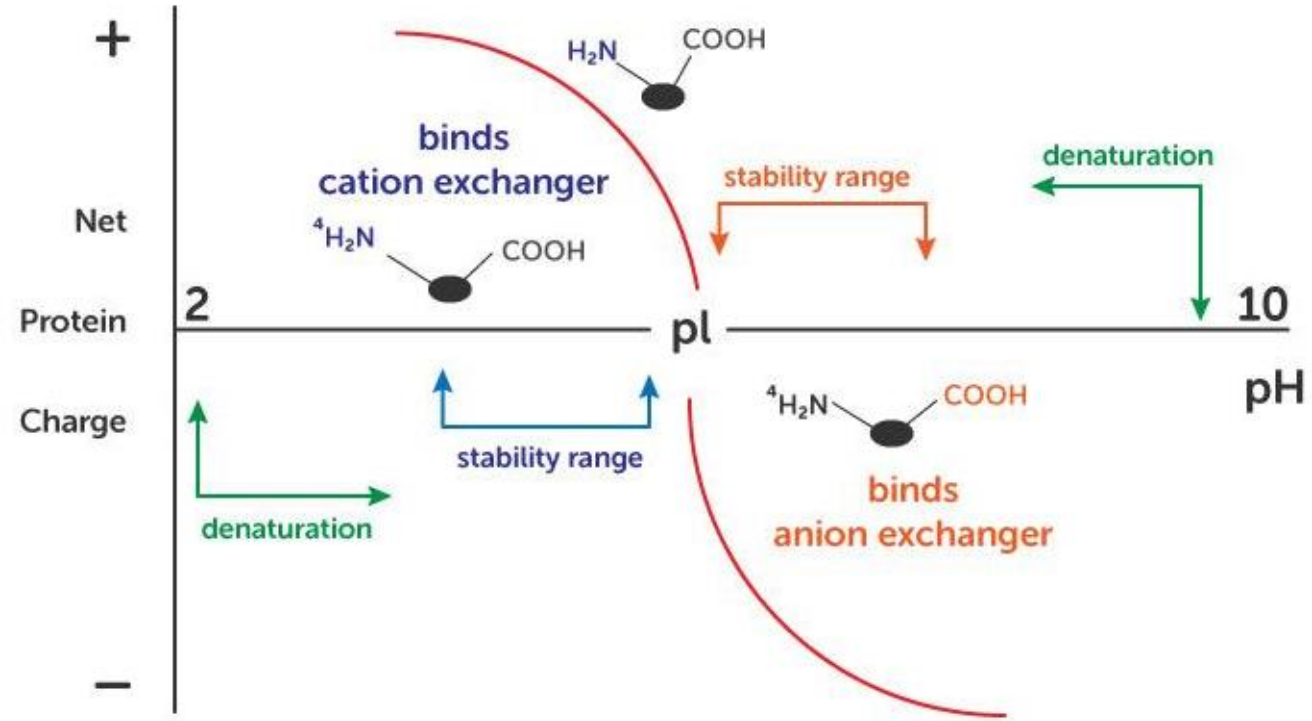
1. Troça Iónica





Cátion: carga positiva
Ânion: carga negativa


Time sequence
Mix of proteins
Flow of solution
Immobilized cation surfaces
Binding of negatively charges molecules to immobilized cation surface
Elution of positively charged molecules
Addition of elution buffer to separate slightly negatively charged molecules
Addition of elution buffer with increased concentration to separate highly negatively charged molecules
Elution curve
Elution curve



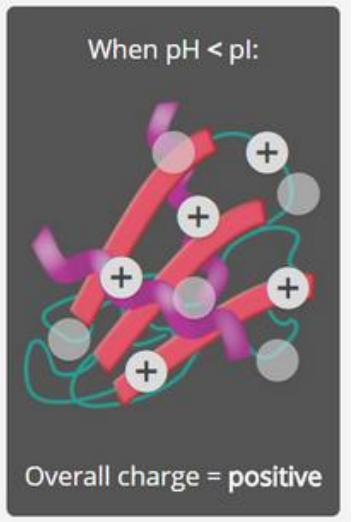
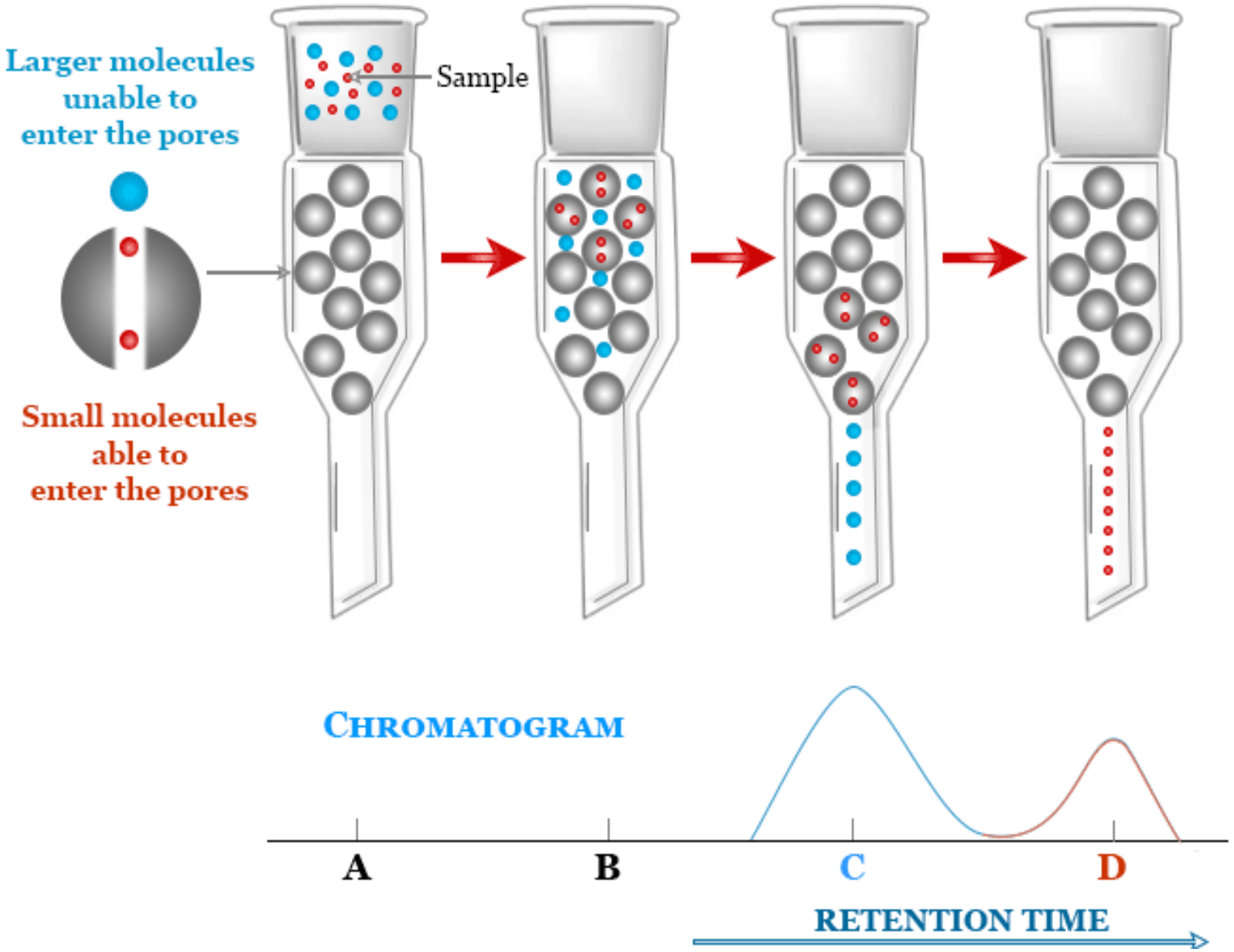


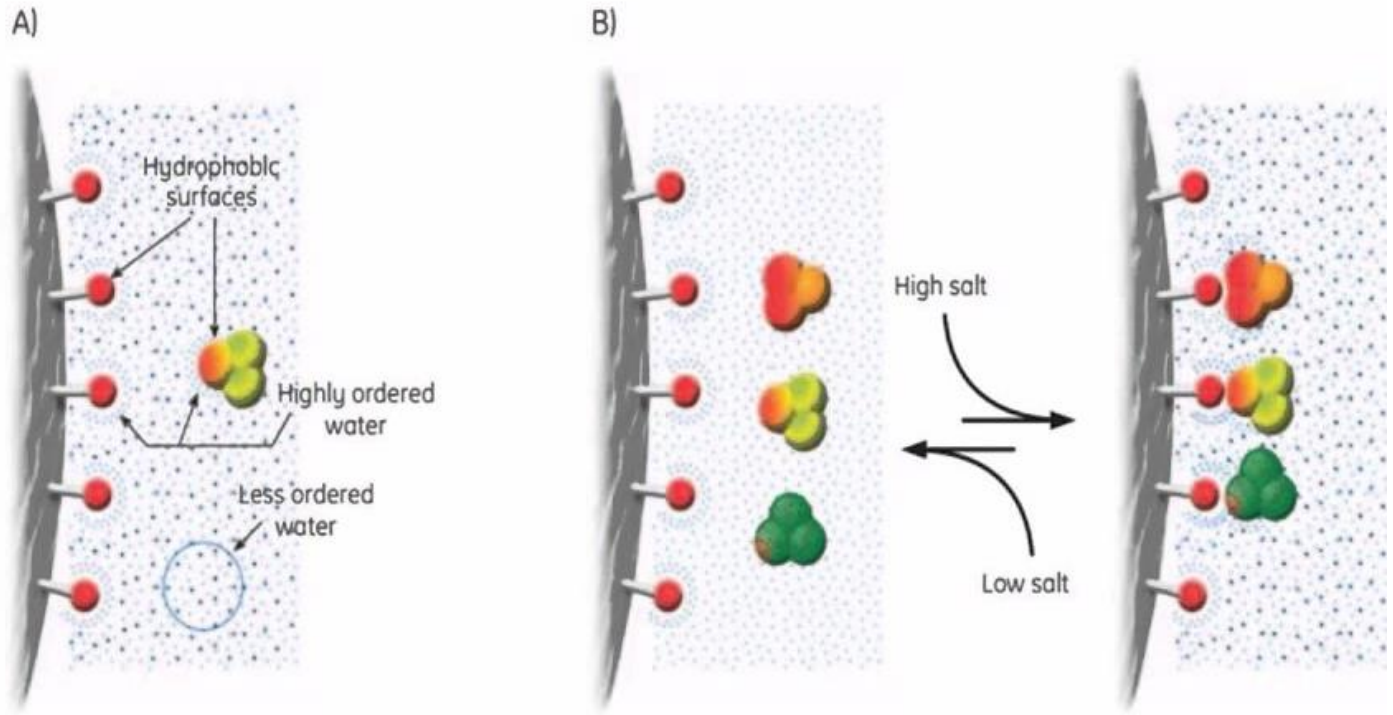
Table 1.2. Functional groups used on ion exchangers

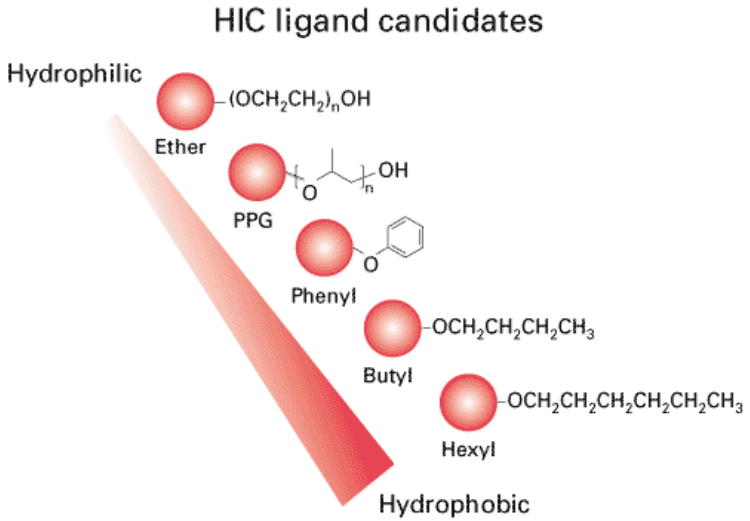
Anion exchangers			**Functional group**
Quaternary ammonium (Q)	+	strong	$-CH_2-N^+-(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*		weak	$-CH_2-CH_2-N^+-(CH_2-CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*		weak	$-CH_2-CHOH-CH_2-N^+-(CH_2-CH_3)_2$
Cation exchangers			**Functional group**
Sulfopropyl (SP)	−	strong	$-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)		strong	$-CH_2-SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)		weak	$-CH_2-COO^-$

2. Exclusão por tamanho

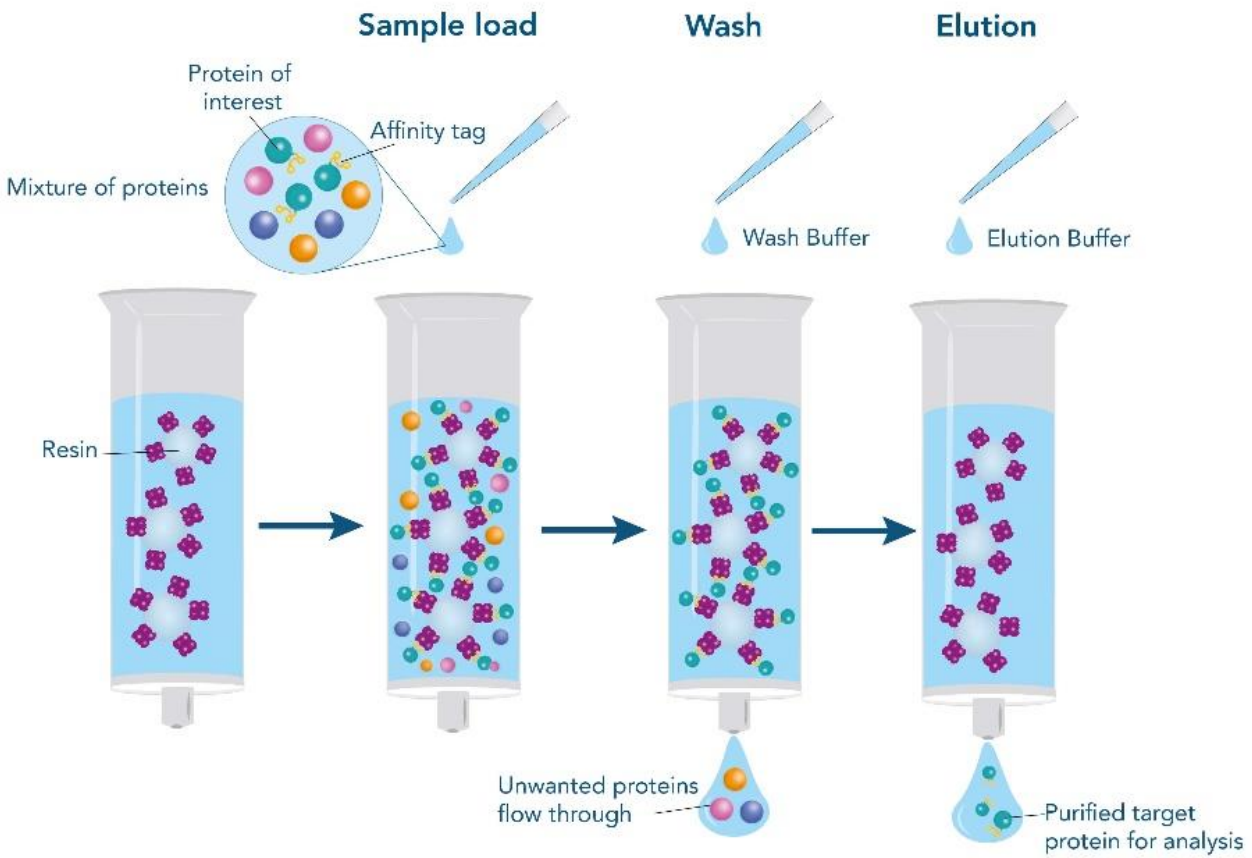


3. Interação Hidrofóbica



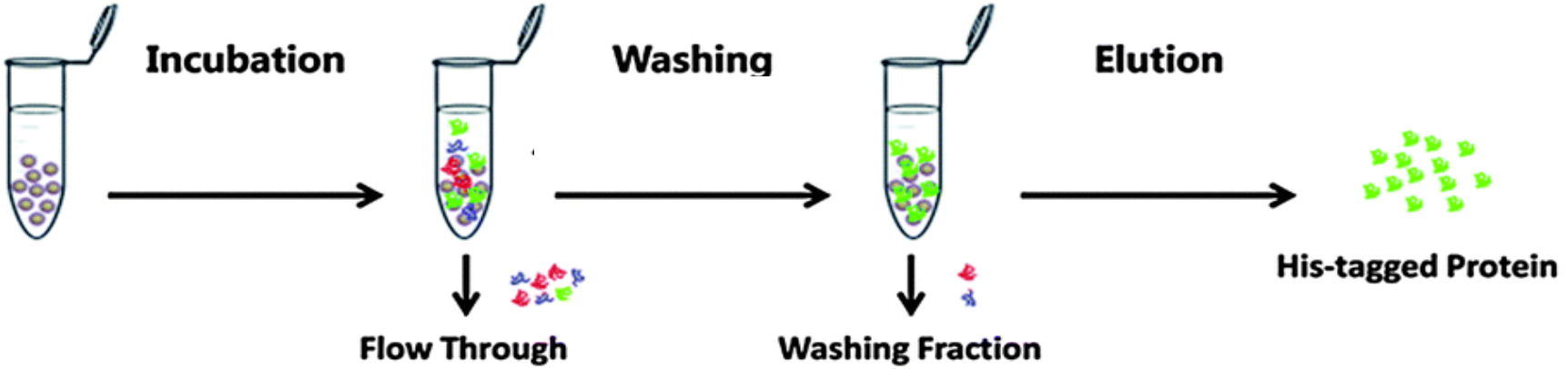


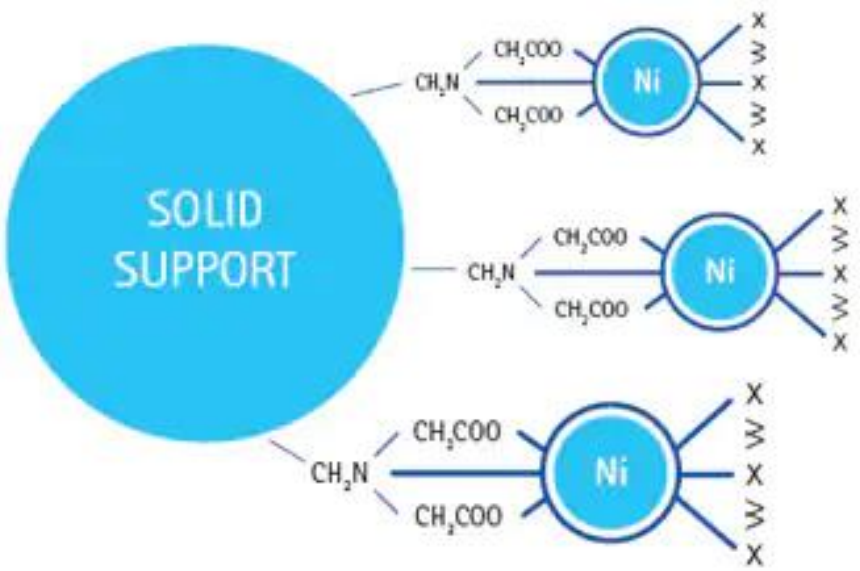
4. Afinidade

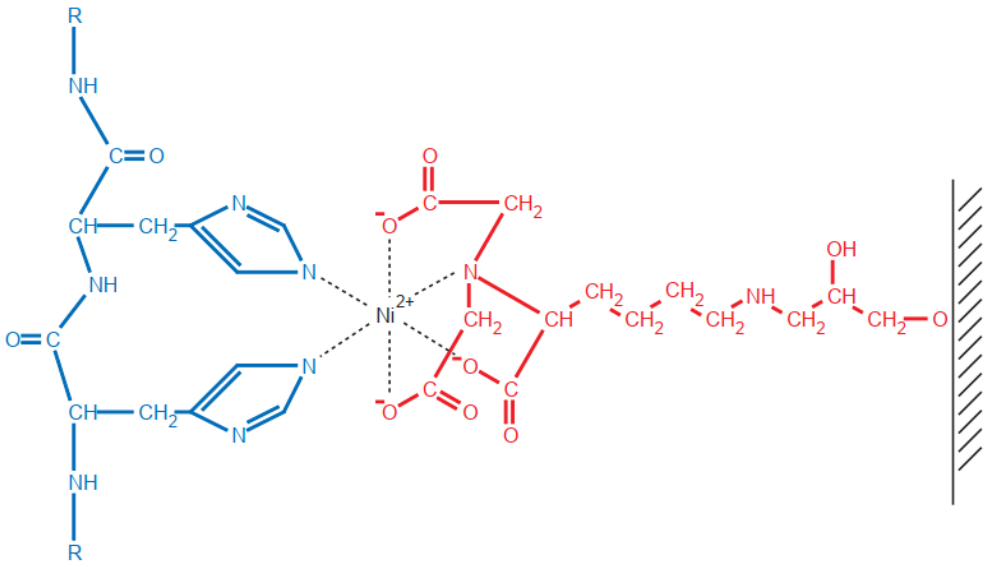


Tag	Size (aa)	Affinity Matrix	Elution
His-tag	6–10	Ni^{2+}-NTA	Imidazole, low pH
Glutathione S-transferase	201	GST-sepharose	Reduced glutathione
Streptag II	8	Strep-Tactin-Sepharose	Desthiobiotin
Maltose binding protein	396	Amylose	Maltose
FLAG	8	mAb-Matrix	EDTA, Flag peptide
c-myc	11	mAb-Matrix	Low pH, c-myc peptide
Calmodulin binding peptide	26	Calmodulin	EGTA
Chitin-binding domain	51	Chitin	Thiol induced self cleavage
Cellulose-binding domain	107–158	Cellulose	Ethylene glycol, low ionic strength

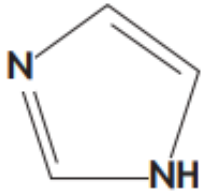
Purificação de proteínas por Cromatografia de afinidade



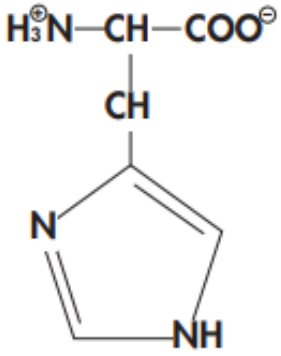




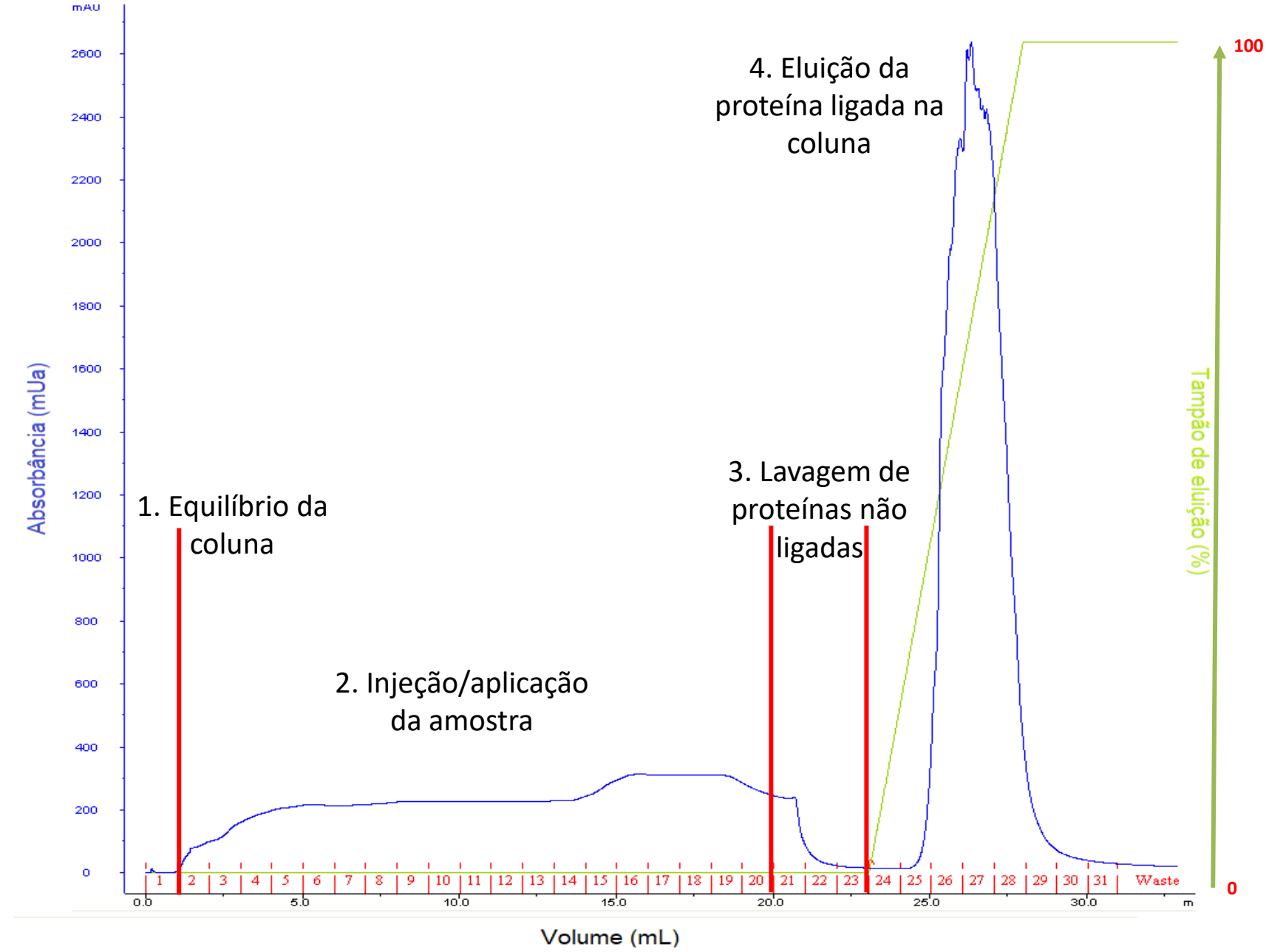
Proteína HisTag **Resina Ni^{2+}**



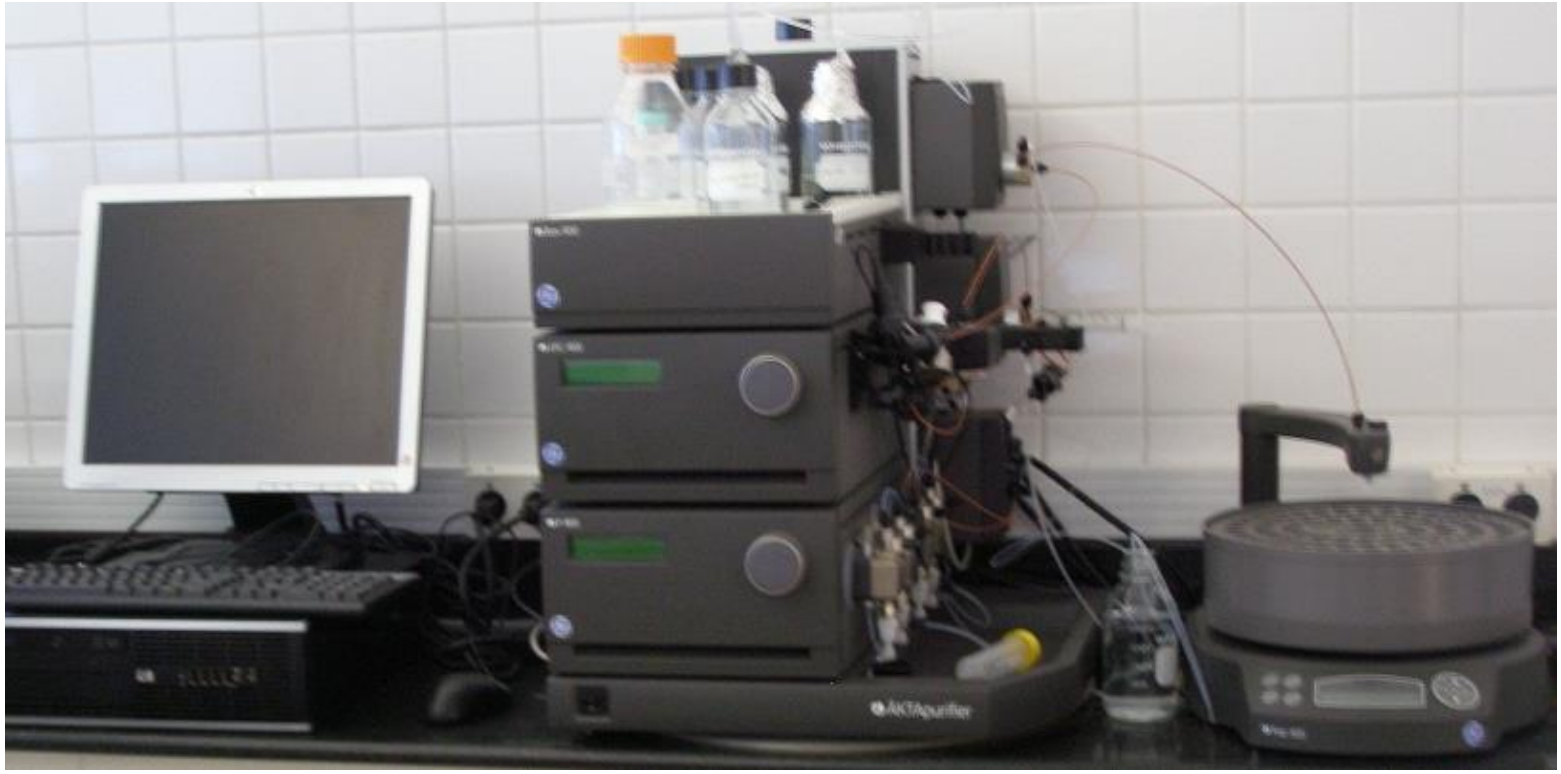
Imidazole

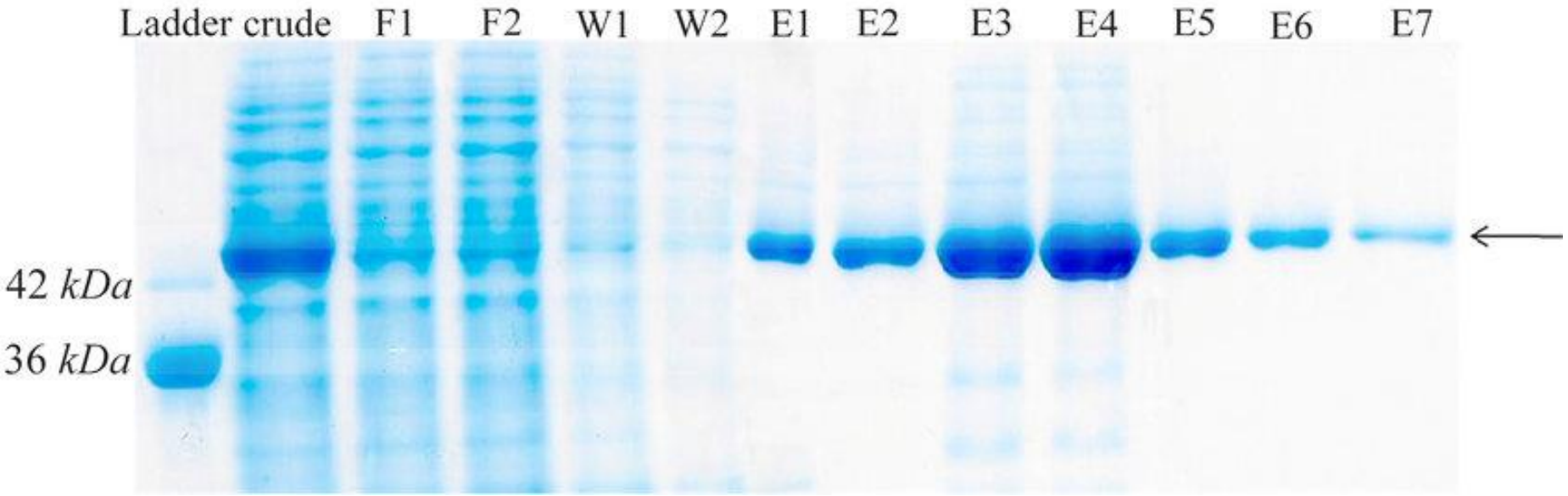


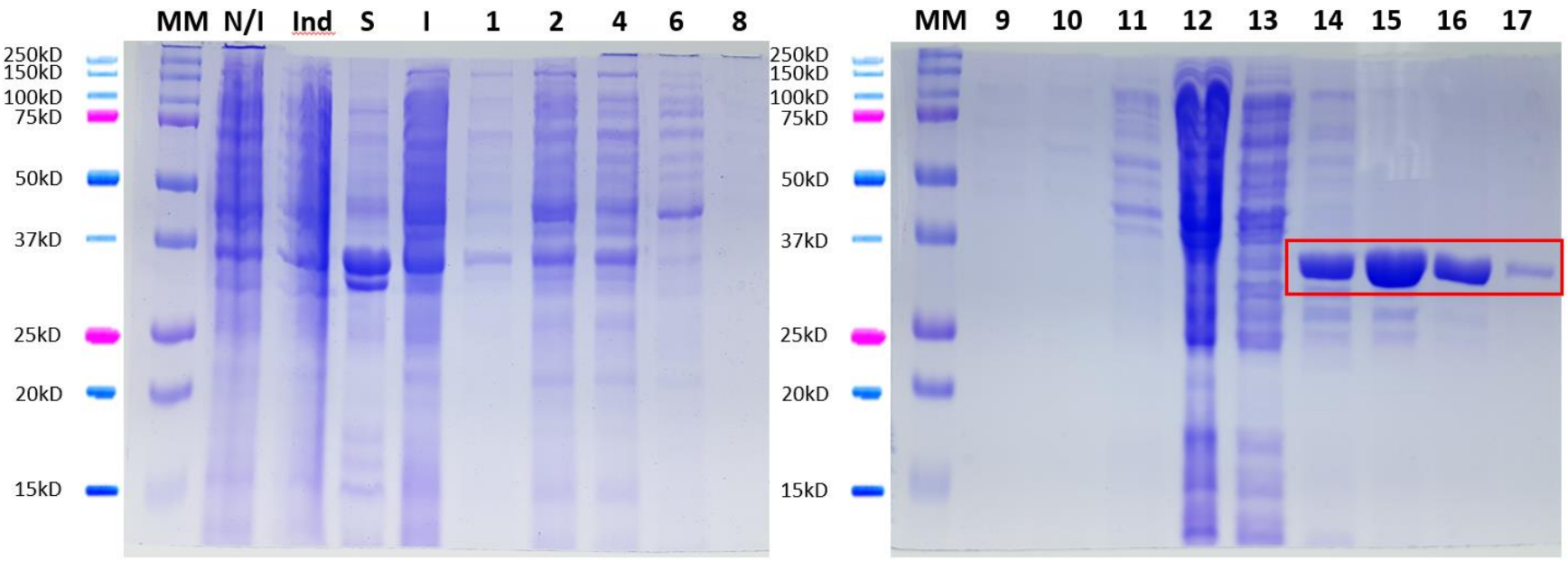
Histidine


280 nm
mAU
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Absorbância (mUa)
1. Equilíbrio da coluna
2. Injeção/aplicação da amostra
3. Lavagem de proteínas não ligadas
4. Eluição da proteína ligada na coluna
100
0
Tampão de eluição (%)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 Waste
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
m
Volume (mL)

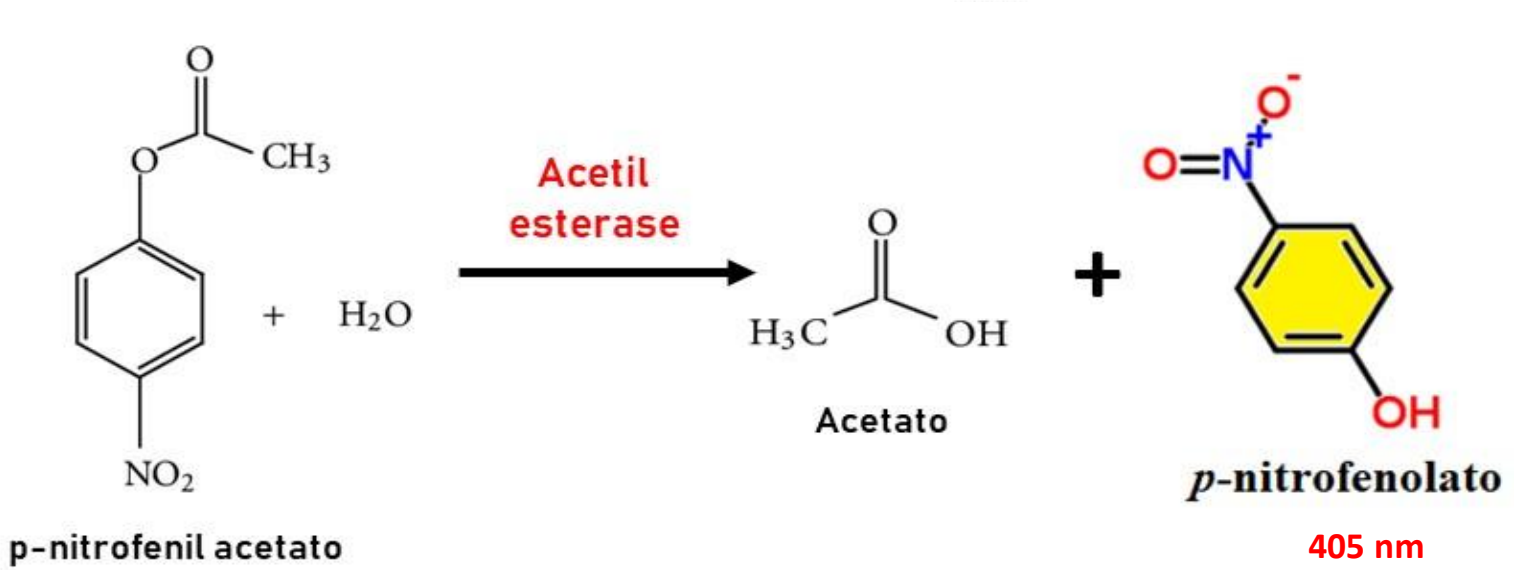
Sistema de Purificação por Cromatografia AKTA FPLC

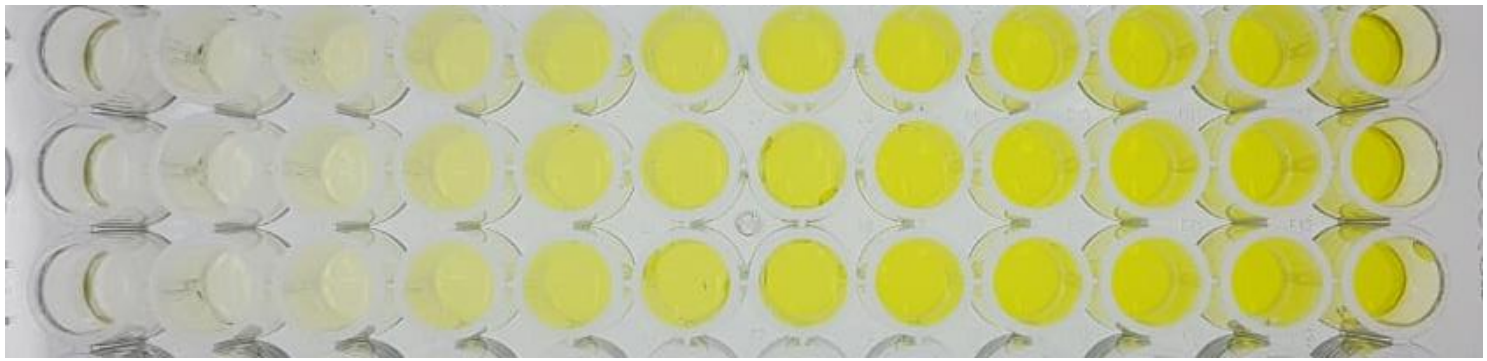



Ladder
crude
F1
F2
W1
W2
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
42 kDa
36 kDa

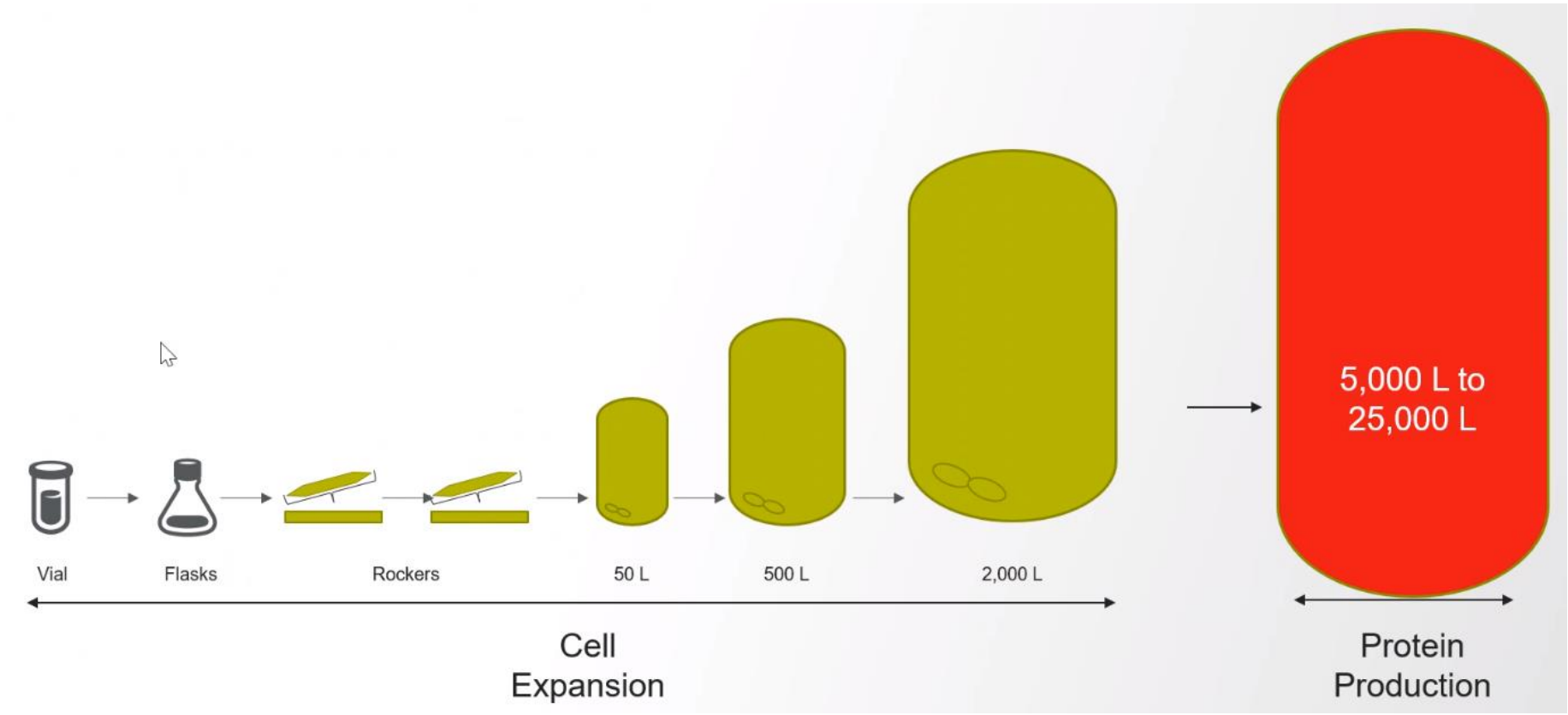

MM
N/I
Ind
S
I
1
2
4
6
8
250kD
150kD
100kD
75kD
50kD
37kD
25kD
20kD
15kD
MM
9
10
11
12
13
14
15
16
17
250kD
150kD
100kD
75kD
50kD
37kD
25kD
20kD
15kD

Purificação e determinação de atividade da enzima Acetil Esterase





Processo Típico de Produção de Proteínas



Sistemas de Cromatografia

Fig 1. ÄKTA ready and ÄKTA ready XL operate ReadyToProcess columns with inner diameters from 80 to 600 mm for purification of biomolecules from bioreactor culture volumes of 10–2000 L. For larger bioreactor volumes, ÄKTA ready XL can also operate AxiChrom columns with inner diameters of up to 1200 mm. The common UNICORN software platform simplifies transfer of processes between systems.

Industrial scale protein purification column


handtmann
handtmann


SUN
SHUANGZI INTELLIGENT

Obrigado

fscha@usp.br