



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

Proteína Recombinante:

- Análise de indução da proteína recombinante**
- Lise bacteriana (sonicação/lise alcalina/lise por detergente)**
- Análise das proteínas recuperadas por SDS-PAGE**
- Determinação de atividade de enzimas (fosfatase alcalina e acetil esterase)**

Análise de indução da proteína recombinante

1- Curva de Crescimento

Utilizando a massa bacteriana do tubo com 700 uL de cultura de bactéria, adicionar 50 uL de água e 50 ul de tampão de aplicação de amostra. Ferver por 5 minutos e aplicar no SDS-PAGE.

Gel 1 e 2: BAP: Culturas Induzidas e não induzidas

- | | |
|-------------------------------|------------------------|
| 1- Não aplica | 6- BAP 18 h INDZ |
| 2- Marcador de Peso Proteínas | 7- BAP 14 h – NINDZ-G2 |
| 3- BAP 14h - NINDZ-G1 | 8- BAP 14 h - INDZ |
| 4- BAP 14 h - INDZ | 9- BAP 16 h - INDZ |
| 5- BAP 16 h – INDZ | 10- BAP 18 h - INDZ |

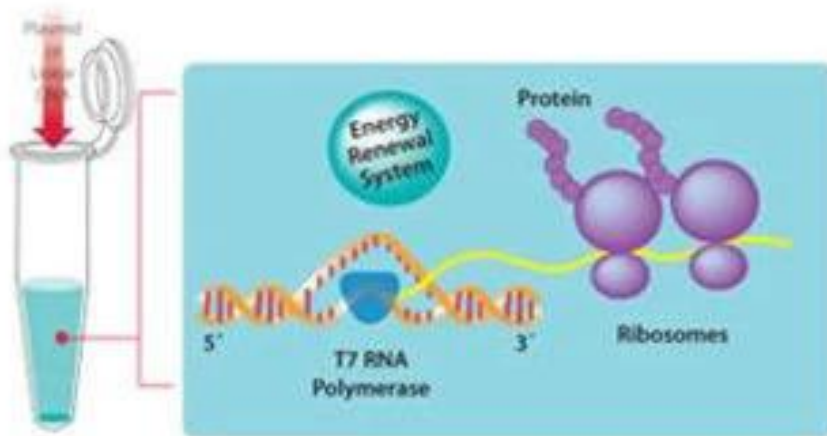
Gel 3 e 4: TfAEST: Culturas Induzidas e não induzidas

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 1- Não aplica | 6- <u>TfAEST</u> 18 h INDZ |
| 2- Marcador de Peso Proteínas | 7- <u>TfAEST</u> 14 h – NINDZ-G2 |
| 3- <u>TfAEST</u> 14h - NINDZ-G1 | 8- <u>TfAEST</u> 14 h - INDZ |
| 4- <u>TfAEST</u> 14 h - INDZ | 9- <u>TfAEST</u> 16 h - INDZ |
| 5- <u>TfAEST</u> 16 h – INDZ | 10- <u>TfAEST</u> 18 h - INDZ |

Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System:

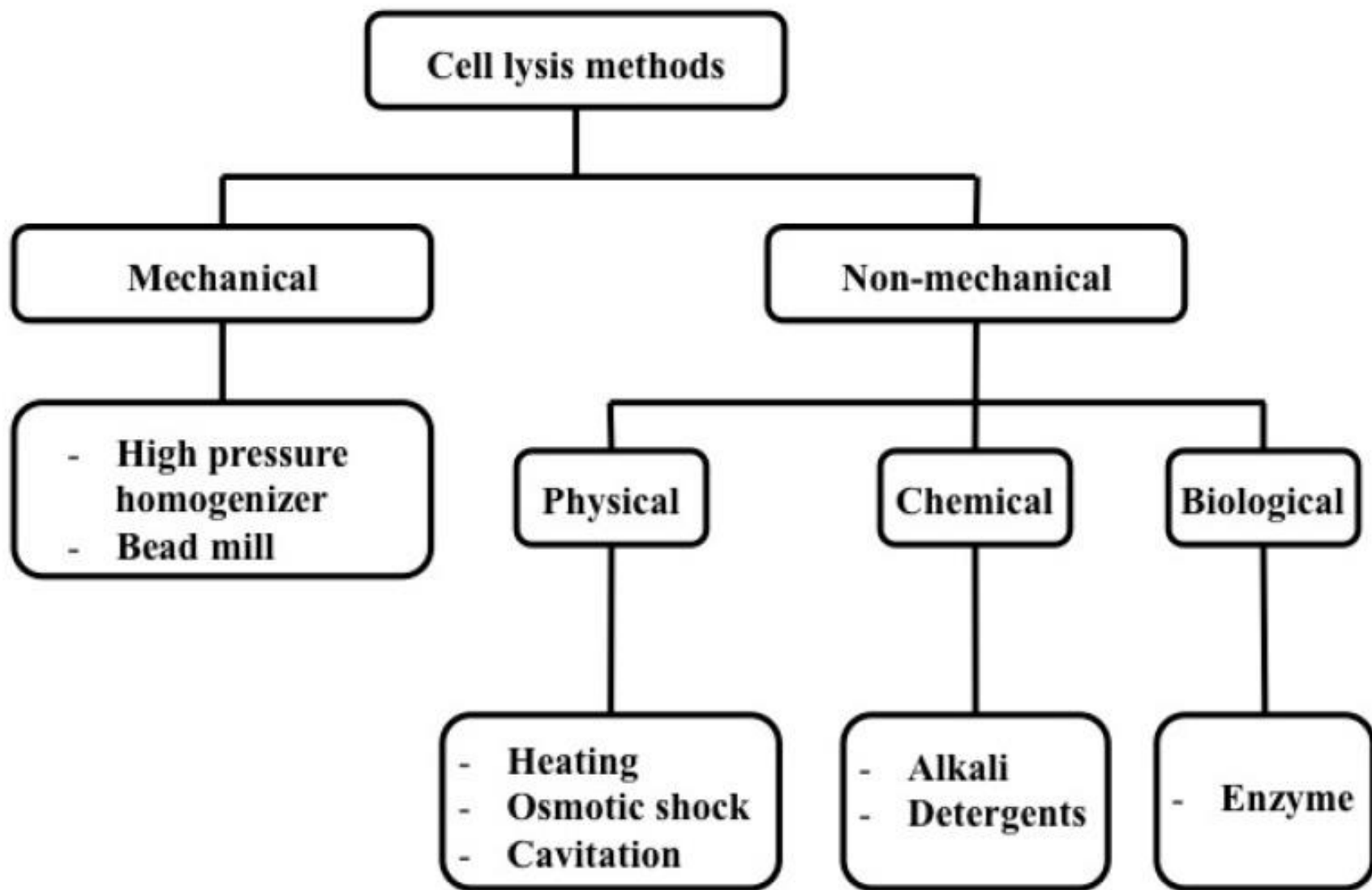
DNA templates:

- Supercoiled plasmid DNA (recommended to obtain the highest yields)
- Linear DNA
- PCR product



Com um molde de DNA contendo um promotor T7 transcrito, ribossomos ligam-se ao extremo 5' do mRNA nascente e sendo traduzido. Um sistema renovável de energia ATP acoplado para ligação estável dos ribossomos resulta em alto nível de proteína produzida.

07/11 Dra. Mona Oliveira CEO BioLinker – Aula



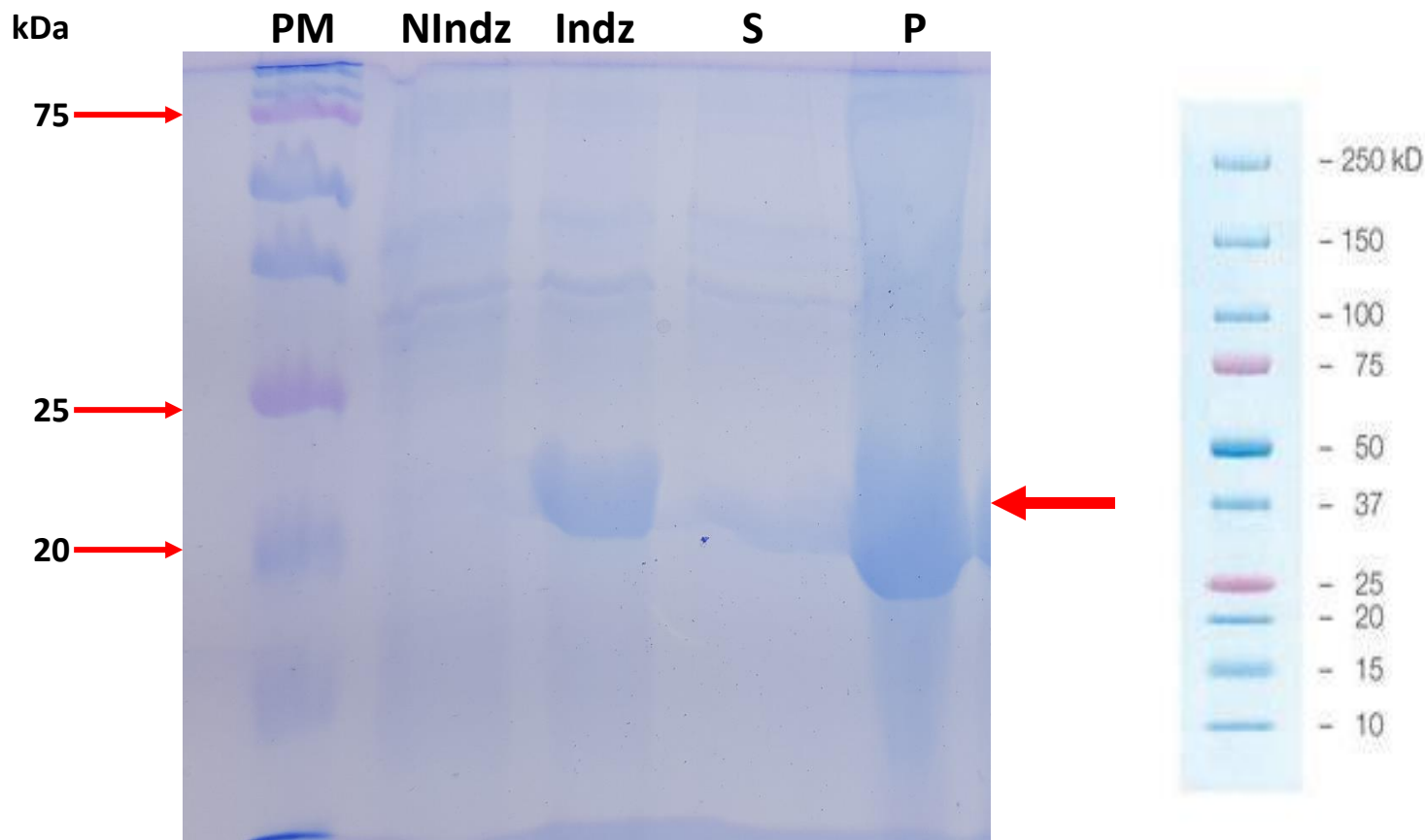


Figura – Análise por eletroforeses SDS-PAGE (12,5%) da expressão da proteína recombinante, em *E. coli* BL21. (1) Amostra de 20 μ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20 μ L da bactéria induzida; (3) Amostra de 20 μ L do sobrenadante bacteriano (solúvel); (4) Amostra de 20 μ L do precipitado bacteriano (não solúvel). (PM) peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories).

Lise celular: SONICAÇÃO



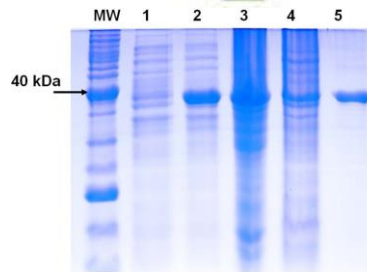
Harvest bacteria by centrifugation



Resuspend cell pellet in lysis buffer containing Triton X-100



Brief sonication



Analyse pellet for protein expression by SDS-PAGE and commassie staining

Lise bacteriana por tratamento físico/enzimático

1. Suspende a massa celular bacteriana em 250 uL de tampão de lise (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM e EDTA 1mM).
2. Adicionar um volume equivalente a 50 uL de microesferas/perolas de vidro (tamanho de 450 a 600 nm);
3. Agitar em vortex por 20 min, em velocidade máxima;
4. Adicionar 1/10 de volume de lisozima 10 mg/ml e incubar a 37 °C por 30 min
5. Adicionar 1/20 vol de Triton X-100 20% e incubar a 37 °C por 15 min.
6. Transferir a parte superior a novo tubo eppendorf limpo.
7. Centrifugar 10.000 rpm/10 min,
8. Transferir o sobrenadante a novo tubo eppendorf limpo.
9. Identificar os tubos como sobrenadante (S) e precipitado (P)
10. Realizar análise de eletroforeses SDS-PAGE, das amostras S e P.

Análise da lise por SDS-PAGE

2- Lise Celular – BAP/TfAEST

Gel 5: Grupos 1-4

- 1- Não aplica
- 2- Marcador de Peso Proteínas
- 3- BAP Sobrenadante G1
- 4- BAP Precipitado G1
- 5- BAP Sobrenadante G2

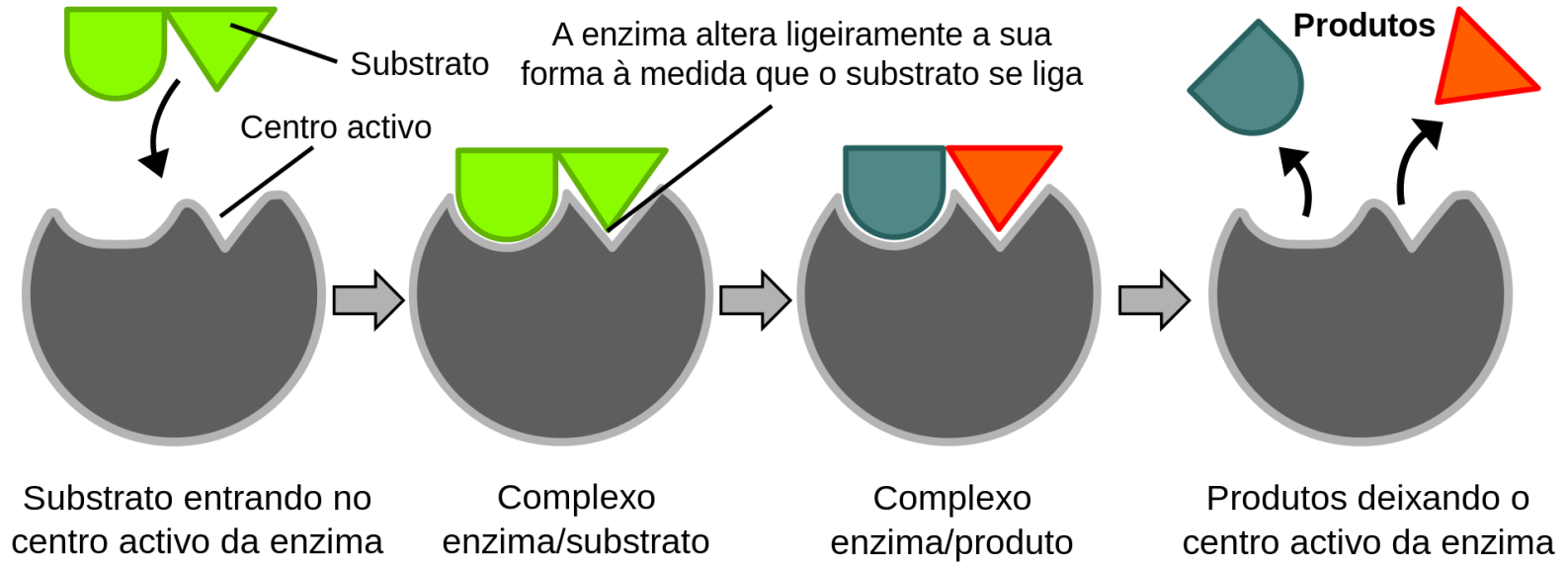
- 6- BAP Precipitado G2
- 7- BAP Sobrenadante G3
- 8- BAP Precipitado G3
- 9- BAP Sobrenadante G4
- 10- BAP Precipitado G4

Gel 6: Grupos 5-8

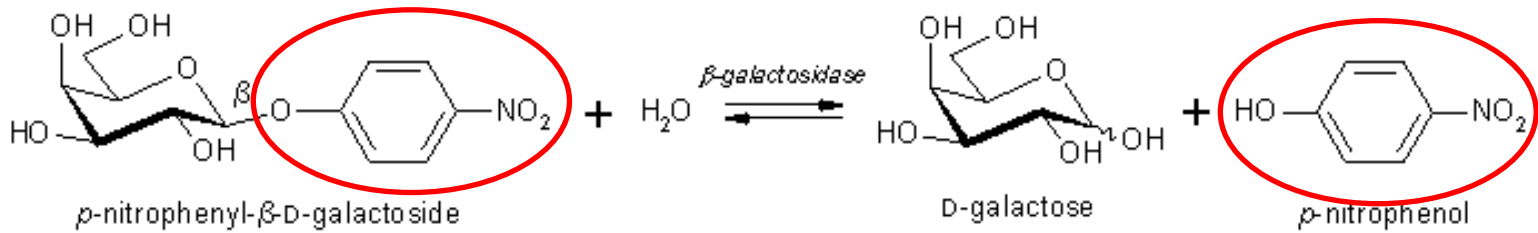
- 1- Não aplica
- 2- Marcador de Peso Proteínas
- 3- TfAEST Sobrenadante G5
- 4- TfAEST Precipitado G5
- 5- TfAEST Sobrenadante G6

- 6- TfAEST Precipitado G6
- 7- TfAEST Sobrenadante G7
- 8- TfAEST Precipitado G7
- 9- TfAEST Sobrenadante G8
- 10- TfAEST Precipitado G8

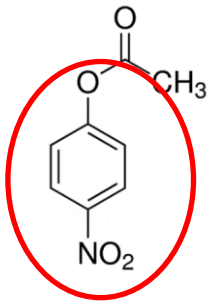
Ensaio de Atividade Enzimática



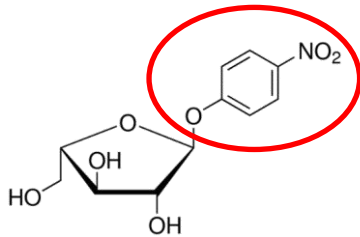
Substratos colorimétricos



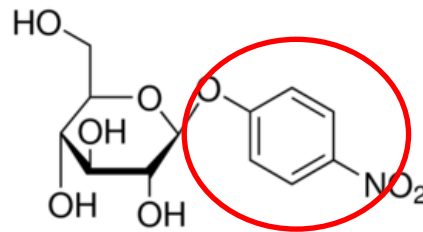
p-nitrofenil acetato



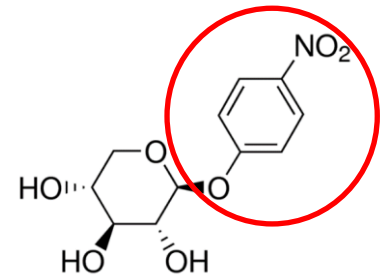
p-nitrofenil α -L-arabinofuranoside

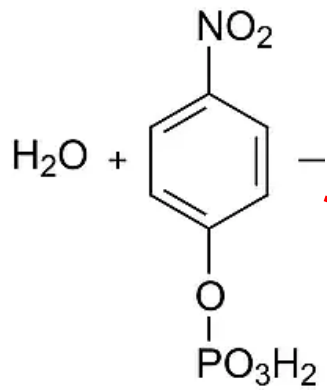


p-nitrofenil β -D-glicopiranoside



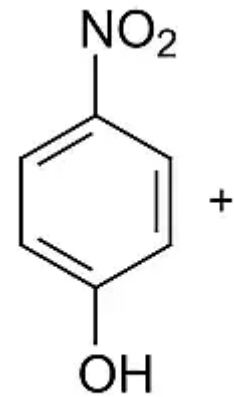
p-nitrofenil β -D-xilopiranoside





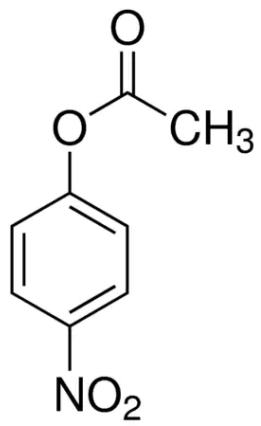
p-Nitrofenil fosfato (pNP)

Fosfatasa alcalina



p-Nitrofenol (405 nm)

Acetil Esterasa



p-Nitrofenil acetato (pNPa)

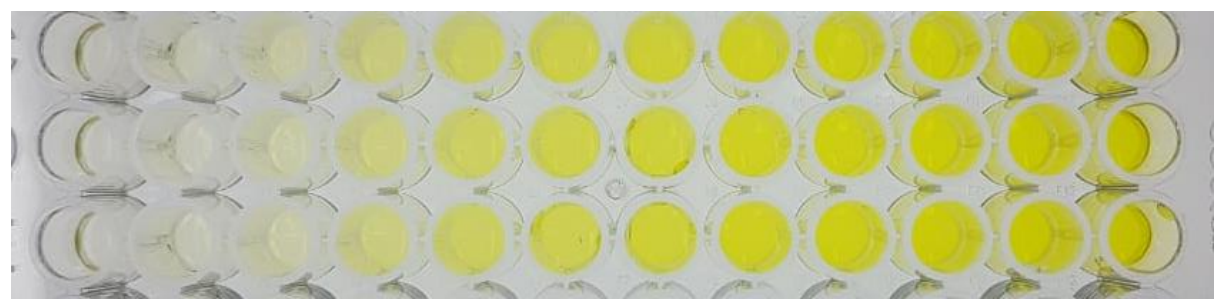


Tabela. Atividade enzimática de fosfatase alcalina/acetil esterase

Coluna	1	2	3	4	5
Tubo INDZ nº/h	Substrato (mL)	Enzima (ml)	Absorbância (600 nm)	Absorbância (405 nm)	Micromols de Produto
1/0	0,05	0,05			
2/2	0,05	0,05			
3/4 – 14 h	0,05	0,05			
4/6 – 16 h	0,05	0,05			
5/8 – 18 h	0,05	0,05			

Cada Grupo: 3 tubos BAP (4, 6 e 8 h) e 3 tubos TfAEST (4, 6 e 8 h)

Determinação de atividade de fosfatase alcalina (BAP) e Acetile esterase (TfAEST)

Com o material coletado (tubos com 50 uL de cultura induzida) da aula anterior:

1. Em tubos devidamente identificados, contendo 50 uL de massa bacteriana, adicione 50ul de água, suspenda a bactéria e adicione o volume do substrato indicado:
 - BAP: 50 uL de 1 mg/mL p-nitrofenil fosfato (pNP) dissolvido em Tris-Cl 1 M, pH 8
 - TfAEST: 50 uL de p-nitrofenil acetato (pNPa), 5 mM em metanol 50%
2. Misture bem e incube em temperatura ambiente, por 5 minutos, a reação deve ser parada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M.
3. Transferir 100 µL da amostra aos poços da microplaca (96 poços), segundo a tabela, e o p-nitrofenolato liberado será medido pela absorbância a 405 nm, anote o valor na coluna 4.

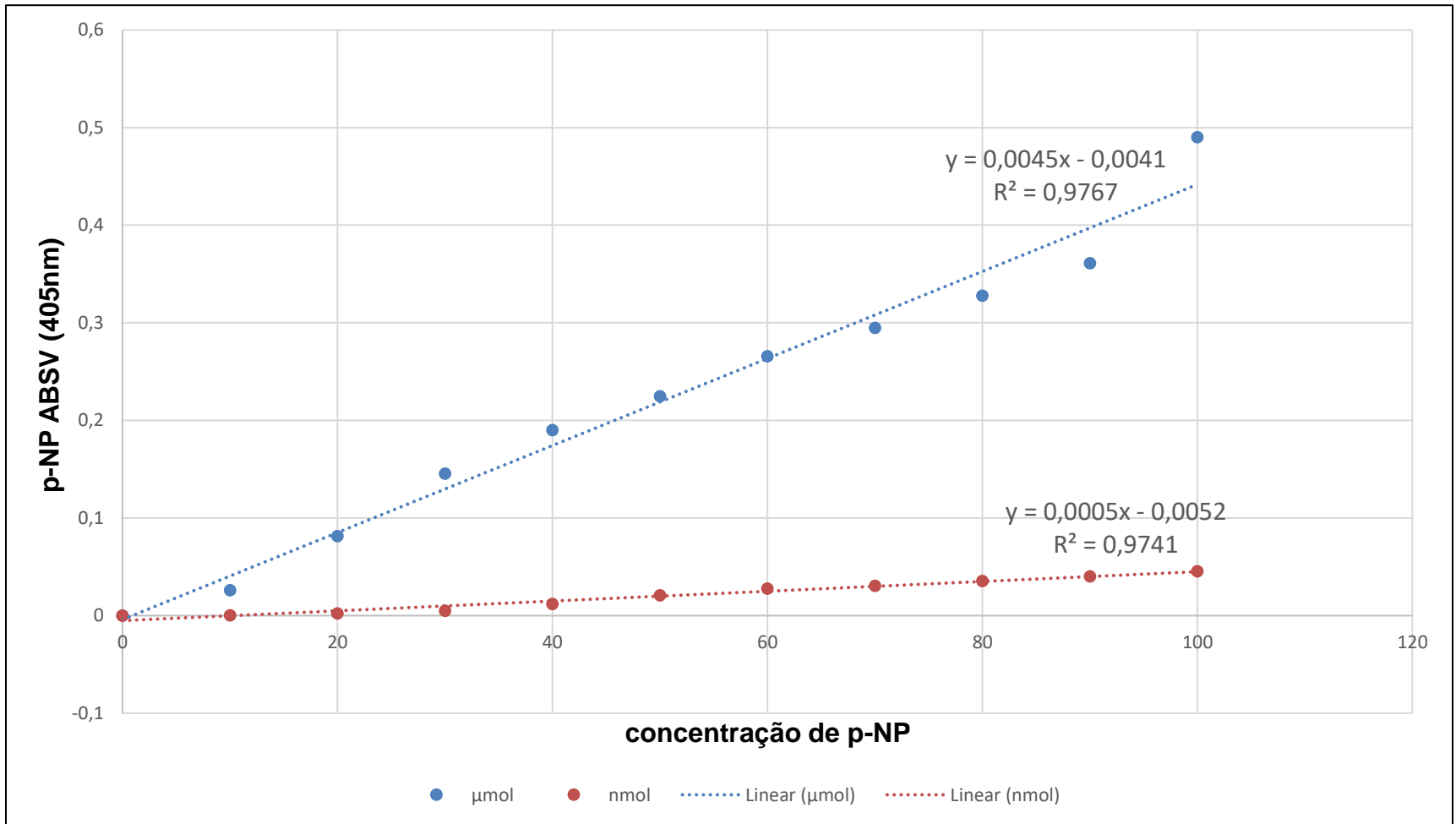
Curva Padrão pNP

Equação da reta μmol

$$\Delta\text{ABS} = 0,0045 \times \text{Concentração de p} - \text{NP} - 0,0041$$

Equação da reta nmol

$$\Delta\text{ABS} = 0,0005 \times \text{Concentração de p} - \text{NP} - 0,0052$$



Product name	Protein type	Application	Company
Adagen (Adenosine deaminase)	Enzyme	Severe combined immunodeficiency disease (SCID)	Enzon
Genotropin (Recombinant growth hormone)	Hormone	Growth hormone deficiency (GHD) in children	Pharmacia & Upjohn
Humalog (Recombinant human insulin)	Hormone	Diabetes	Eli Lilly
Nabi-HB (Anti-Hepatitis B)	Antibody	Hepatitis-B	Nabi
Novo Seven (Recombinant coagulation factor VIIa)	A modified factor	Hemophillia patients with inhibitors	Novo Nordisk
Ontak (Diphtheria toxin-interleukin-2)	A fusion protein	Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)	Ligand Pharmaceuticals
Roferon-A (Recombinant interferon alfa-2a)	A modifier	Hairy cell leukemia or AIDS-related Kaposi's sarcoma	Hoffmann-La Roche



Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024