

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

INSTITUTO BIOMÉDICO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR (DGBM)

**Avaliação de vetor induzível para expressão de proteínas heterólogas em
Mycobacterium smegmatis mc²155**

Rio de Janeiro

Julho de 2017

Alessandra Mageste Fernandes

**Avaliação de vetor induzível para expressão de proteínas heterólogas em
Mycobacterium smegmatis mc²155**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
como requisito parcial para obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina

Área de concentração: Genética

Orientador científico: Dr. Wim Maurits Sylvan Degrave - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (BCM/IOC)

Coorientadora científica: Dra. Leila de Mendonça Lima - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (BCM/IOC)

Orientadora acadêmica: Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans - Departamento de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (DGBM - UNIRIO)

Rio de Janeiro

2017

Alessandra Mageste Fernandes

**Avaliação de vetor induzível para expressão de proteínas heterólogas em
Mycobacterium smegmatis mc²155**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
como requisito parcial para obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina

Área de concentração: Genética

_____ de _____ de 2017

**Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans – Departamento de Genética e Biologia
Molecular (DGBM – UNIRIO)**

**Dra. Natascha Krepsky – Departamento de Ciências do Ambiente (DCA –
UNIRIO)**

**Dr. Diego Pinheiro Aguiar – Departamento de Genética e Biologia Molecular
(DGBM – UNIRIO)**

**MSc. Leandro Santiago Emmerick – Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (BCM/IOC)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pelo meu despertar de todas as manhãs, pela minha saúde, minha vida, moradas, segurança, condição social, meu alimento de todos os dias, minha família e meus amigos, e por todos os caminhos em que Ele esteve comigo e me guiou, fechando janelas e abrindo portas.

Aos **meus pais, Ualdo e Nazaré**, responsáveis pela concretização de toda essa jornada. Só me foi possível concluir esta graduação graças ao seu suor, carinho e amor que mesmo à distância, alimentavam minhas motivações.

À **minha irmã Deborah e meu cunhado Kléber**, os quais também me ajudaram nesta caminhada, tanto emocionalmente quanto financeiramente.

Ao meu **tio Luis** e sua família por todo o apoio concedido na mudança de Belo Horizonte para o Rio de Janeiro, assim como todas as outras ajudas.

Ao primo **Beto e à sua esposa Vilma** pelo apoio principalmente nas questões burocráticas.

Ao **Lucas**, por todo seu carinho, amor e paciência comigo, me ajudando a superar todos os momentos tristes e difíceis e estando presente em todos os momentos de alegria, fazendo meus dias mais felizes.

Ao **Trindade**, pela sua motivação e luz eterna, que ainda brilham sobre mim.

Às minhas famílias cariocas, **Milioni e Trindade** (Tia/Mãe Monica!), pelas portas abertas de suas casas a mim oferecidas (e mantidas). Por todo carinho e atenção, obrigada!

À **UNIRIO** por me proporcionar experiências diversas, aprendizados aos montes, laços de amizade.

Ao **Cnpq/CAPES** pela possibilidade de realizar uma graduação sanduíche na Áustria através do Ciência sem Fronteiras, pelo aprendizado da língua alemã e aquisição de outras experiências na minha área profissional e vida pessoal.

À **Oead**, principalmente à **Sarah Widmoser**, pelo acolhimento e estrutura em Viena e em Salzburg.

À **Fachhochschule Salzburg**, principalmente à **Frau Oostingh**, pela oportunidade de estudar como aluna regularmente matriculada, incluindo em meu currículo alta carga horária de práticas em laboratórios de análises clínicas.

À **FIOCRUZ**, principalmente aos meus orientadores Leila e Wim por me abrirem as portas do laboratório, pelo seu tempo e dedicação ao meu projeto e aos meus relatórios e apresentações.

À todos do **Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB)**, pelo companheirismo e carinho, seja pelos almoços em grupo ou pelas orientações na realização de ensaios e protocolos. Leandro, Palominha, Renata, Sindy, Rayane, Juliana, Aline, Bia, Marquinhos, Dona Neiva, Dona Sônia.

À minha **orientadora acadêmica Ana Teresa**, por ser excelente professora em genética, atenciosa e prestativa, principalmente na reta final da monografia.

À **banca examinadora** pela presença e avaliação deste trabalho.

Ao **Instituto Oswaldo Cruz** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro e oportunidade de desenvolver este trabalho.

RESUMO

O trabalho objetiva otimizar a expressão de proteínas heterólogas, principalmente as de bactérias do gênero *Mycobacterium*, como a *M. tuberculosis*, espécie causadora da tuberculose. Um dos microrganismos mais utilizados para a produção dessas proteínas atualmente, a *Escherichia coli*, apresenta empecilhos como a formação de corpos de inclusão e a produção de proteínas insolúveis contendo dobramento inapropriado. Nesse sentido, as micobactérias não-tuberculosas se destacam para a construção de sistemas de expressão a partir do sucesso obtido com a *M. smegmatis* mc²155, principalmente após o uso de plasmídeos que compunham sistemas de expressão induzíveis. *M. smegmatis* mc²155 possui crescimento rápido em meio simples e definido e altas capacidades de secretar proteínas para o meio extracelular com modificações pós-traducionais; além disso, a expressão induzível da proteína recombinante pode ser realizada com emprego de sistemas regulados, como o que dirige a expressão da enzima Acetamidase. A enzima é expressa pela cepa em níveis basais em meio rico em nutrientes, apresentando concentrações cem vezes maiores na presença de indutores, chegando a representar 10% das proteínas totais da bactéria. O plasmídeo pJAM2, avaliado neste estudo, possui a região reguladora da expressão da Acetamidase, de 1,5kb, adicionando à proteína recombinante uma cauda de 6 resíduos de histidina, e confere às células transformadas resistência ao antibiótico Canamicina. Uma outra construção foi avaliada, pJAM2-erp, que expressa a proteína imunogênica Erp, de *M. tuberculosis*. Avaliou-se a atuação destas construções em *M. smegmatis* na presença de um indutor, a acetamida, para que os mesmos possam ser utilizados em sistemas de expressão de proteínas heterólogas em construções futuras, como na construção pretendida pJAM2-MPB64.

Palavras-chave: Sistemas de expressão induzíveis, proteínas heterólogas, *M. smegmatis* mc²155,

ABSTRACT

The aim of this study is to optimize the expression of heterologous proteins, especially those of bacteria of the genus *Mycobacterium*, such as *M. tuberculosis*, species that causes tuberculosis. One of the most widely used microorganisms for the production of these proteins nowadays, *Escherichia coli*, presents barriers such as the formation of inclusion bodies and the production of insoluble proteins containing inappropriate folding. In this sense, non-tuberculous mycobacteria stand out for the formation of expression systems from the success obtained with *M. smegmatis* mc²155, mainly after the use of plasmids that composed inducible expression systems. *M. smegmatis* mc²155 displays rapid growth in simple and defined medium and high capacity to secrete proteins into the extracellular medium with post-translational modifications; furthermore, inducible expression of the recombinant protein can be achieved with the use of regulated systems, such as the one driving expression of the enzyme Acetamidase. This enzyme is expressed by the strain at basal levels in nutrient rich media, exhibiting a hundred fold higher concentrations in the presence of inducers, accounting for up to 10% of total bacterial proteins. Plasmid pJAM2, evaluated in this study, carries the 1.5kb acetamidase regulatory region, can express proteins with a 6-histidine tag and confers resistance to the antibiotic kanamycin. Another plasmid construct – pJam2-erp - was evaluated, expressing the *M. tuberculosis* immunogenic protein Erp. Both plasmids were assayed in *M. smegmatis* under induced conditions in the presence of acetamide, aiming at their future utilization as expression systems for heterologous proteins, such as the one described for the expression of MPB-64

Key words: expression systems, heterologous proteins, *M. smegmatis* mc²155

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da parede celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
Figura 2: Colônia isolada de <i>M. smegmatis</i> selvagem cultivada.....	5
Figura 3: Estruturas cristalinas de proteínas de Mtb obtidas por hospedeiros alternativos de expressão.....	13
Figura 4: Mapa da construção pJAM2.....	15
Figura 5: Ordem dos genes e dos promotores da acetamidase em seu operon.....	17
Figura 6: Vetor pUC19 e sequência da sua região MCS.....	30
Figura 7: Eficiência de <i>E.coli</i> TOP10 transformadas com o plasmídeo pUC19.....	31
Figura 8: Transformação de <i>E.coli</i> TOP10 com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	32
Figura 9: Colônias de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas e cultivadas em placas de LB – ágar.....	34
Figura 10: Geis SDS-PAGE para visualização das proteínas extraídas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas e induzidas.....	35
Figura 11: Detecção das proteínas Erp e Acetamidase pela técnica do <i>Western Blot</i>	36
Figura 12: Digestão plasmidial a partir de <i>Bam</i> HI em gel de agarose.....	37
Figura 13: Visualização em gel de agarose 1% do fragmento e do plasmídeo purificado para construção pJAM2-MPB64.....	38

Figura 14: PCR de colônia visualizado em gel de agarose 1%..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos principais biofármacos produzidos por <i>E.coli</i>	8
Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos utilizados.....	26
Tabela 3: Ciclos utilizados para a reação de PCR.....	27
Tabela 4: Reação de ligação entre MPB64 e pJAM2.....	28
Tabela 5: Quantificação do DNA plasmidial obtido após extração.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Utilização de diferentes células para a produção de proteínas recombinantes.....	7
--	---

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADP: adenosina di-fosfato

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

BET: Brometo de etídeo

CFU: Unidade formadora de colônia

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DO₆₀₀: Densidade ótica a 600nm

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

g: Aceleração da gravidade

HEPES: Tampão ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanosulfônico

Hsp65: Gen codificante para a proteína de choque térmico de 65kDa

its: Espaçador interno entre as subunidades ribossomais 16S e 23S.

Kan^r: Resistência a canamicina.

LAGFB: Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática

LB: meio Luria Bertani

MCS: *multiple cloning site* (sítio múltiplo de clonagem)

mc²155: *Mycobacterium smegmatis* mc²155.

MPTs: Modificações pós-traducionais.

MNT: Micobactérias não-tuberculosas

MT: Micobactérias tuberculosas

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

NI: Não induzido

ORFs: *Open Reading Frames* (fases abertas de leitura)

OriC: Origem de replicação reconhecida por *E. coli*.

OriM: Origem de replicação reconhecida por microbactérias

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDB: *Protein Data Bank*.

PM: Padrão de peso molecular.

q.s.p.: Quantidade suficiente para.

RNA - Ácido ribonucleico

rnpB: Porção do RNA da ribonuclease P.

rpm - Rotações por minuto

rss: Subunidade 16S do rRNA.

SD: sequência de nucleotídeos Shine-Dalgarno

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBE: Tris-Borato-EDTA

TBS: Tris Buffered Saline (Tampão Tris-salino)

TBS-Tw20: Tris Buffered Saline com Tween-20

TCA: Ácido tricloro acético

TEA: Trietanolamina

TEMED: N,N,N,N' - Tetrametiletilenodiamina

TRIS: Tris-hidroxi-metil-amino-metano

Tw80: Tween 80

UFC: Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de ilustrações.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de gráficos.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O Gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1 Características gerais das micobactérias.....	1
1.1.2 Caracterização biomolecular do gênero <i>Mycobacterium</i>	4
1.1.3 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	5
1.2 Sistemas de expressão de proteínas heterólogas.....	6
1.2.1 Definição e caracterização de um sistema de expressão.....	6
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> e a produção de proteínas recombinantes.....	7
1.2.3 <i>M. smegmatis</i> para formação de um sistema de expressão.....	11
1.3.Vetor induzível para o sistema de expressão.....	14
1.3.1 O plasmídeo pJAM2.....	14
1.3.2 O operon da acetamidase.....	16
1.3.3 A proteína ERP.....	17
1.3.4 A proteína MPB64.....	18
2. Objetivos.....	19

2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Metodologia.....	20
3.1 Preparo de <i>E. coli</i> TOP10 eletrocompetente.....	20
3.2 Transformação de <i>E. coli</i> TOP10 eletrocompetente para expansão dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	20
3.3 Extração e obtenção dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	21
3.4 Avaliação e visualização do DNA obtido a partir de eletroforese em gel de agarose e quantificação por espectrofotometria.....	21
3.5 Obtenção de micobactérias eletrocompetentes para transformação com o DNA plasmidial.....	22
3.6 Transformação de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com DNA dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp para análise da expressão de proteínas e capacidade de indução.....	22
3.7 Digestão com enzimas de restrição.....	22
3.8 Indução com Acetamida das culturas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	23
3.9 Extração de proteínas das culturas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	23
3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS–PAGE).....	24
3.11 <i>Western Blot</i>	24
3.12 Preparo de lisado de <i>E. coli</i> TOP10.....	25
3.13 Reação de PCR para amplificação do fragmento MPB64.....	26
3.13.1 Oligonucleotídeos.....	26

3.13.2 Reação e ciclagem para amplificação do fragmento MPB64.....	26
3.13.3 PCR de colônia.....	27
3.14 Reação de ligação entre o fragmento MPB64 e o vetor pJAM2 digeridos.....	27
4. Resultados.....	29
4.1 Expansão dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	29
4.1.1 Obtenção de <i>E. coli</i> eletrocompetente de alta eficiência.....	29
4.1.2 Transformação de <i>E. coli</i> TOP10 com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.....	31
4.1.3 Extração do DNA plasmidial das culturas de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas, quantificação por espectrofotometria e visualização em gel de agarose.....	32
4.2 Análise da expressão de proteínas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp e induzidas.....	33
4.2.1 Preparo e transformação de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 eletrocompetentes, com os plasmídeos extraídos pJAM2 e pJAM2-erp	33
4.2.2 Extração de proteínas das culturas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformadas com os plasmídeos e induzidas com acetamida.....	34
4.2.3 Western blot para detecção das proteínas Erp e Acetamidase.....	35
4.3 Ensaio de clonagem e nova construção: pJAM2-MPB64.....	36
4.3.1 Mapeamento por restrição do DNA plasmidial e visualização a partir de eletroforese em gel de agarose.....	36
4.3.2 Purificação do fragmento MPB64 amplificado por PCR para a clonagem.....	38

4.3.3 Ligação entre fragmento (MPB64) e vetor (pJAM2) e transformação de <i>E. coli</i> TOP10.....	39
4.3.4 PCR de colônia.....	39
5. Discussão.....	41
6. Conclusão.....	44
7. Referências.....	45
8. Anexos.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Mycobacterium*

1.1.1 Características gerais das micobactérias

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* e à ordem dos *Actinomycetales* (Willians & Wilkins, 1986), e possui até o momento, 185 espécies e 13 subespécies registradas (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>).

As micobactérias podem ser classificadas de diversas formas, como em tuberculosas (MT) e não-tuberculosas (MNT), ou de crescimento rápido com formação de colônias em até sete dias e crescimento lento quando a formação de colônias só ocorre após sete dias. São microrganismos em formato de bacilos, imóveis, com respiração aeróbia, podendo ser de vida livre ou parasitas intracelulares obrigatórios, caracterizados pela propriedade de serem álcool-ácidos resistentes (Madigan, 1996).

A álcool-ácido resistência é atribuída à presença dos ácidos micólicos na superfície destas células, componentes lipídicos principais e específicos do envelope micobacteriano, sendo essenciais para sua sobrevivência (Marrakchi *et. al*, 2014). Como revisto por Saviola & Bishai (2006), a identificação do grupo por coloração ocorre pelo método de Ziehl-Neelsen (Z-N).

O envelope micobacteriano é complexo, sendo constituído por ácidos micólicos (AM), arabinogalactana (AG) e peptidoglicana (PG). Cada um desses componentes é formado por monômeros sintetizados no citosol como fosfato glico- ou isoprenil conjugados, os quais são exportados por toda a membrana plasmática, antes que ocorra sua polimerização e ligação cruzada na parede celular. Tais estruturas formam uma barreira multicamada, responsável pela proteção do organismo e sua resistência inata à antibióticos, além de atuar como fator de virulência, promover sua persistência num hospedeiro como patógeno e aumentar o tempo necessário para que a reprodução destas células ocorra (Figura 1) (Meniche *et al.*, 2014).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, α -acetilados e β -hidroxilados, que constituem o principal componente lipídico presente na membrana externa das micobactérias (Carel *et. al*, 2014). Tais ácidos podem ser encontrados não ligados ou esterificando as unidades terminais de pentaarabinofuranosil do arabinogalactano, o polissacarídeo que, juntamente com o peptidoglicano, forma o esqueleto insolúvel da parede celular (Marrakchi *et al.*, 2014).

A conformação presente em seu revestimento não permite ao gênero ser corado pela metodologia de Gram, apesar de possuírem composição de parede celular semelhante às bactérias Gram positivas (Saviola & Bishai, 2006).

Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento contra a tuberculose - doença que afeta milhões de pessoas à nível mundial e é causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* - como a isoniazida, atuam sobre o processo de síntese desses ácidos, inibindo-o, de forma a impedir a sobrevivência destes microrganismos (Mandewale *et. al*, 2015).

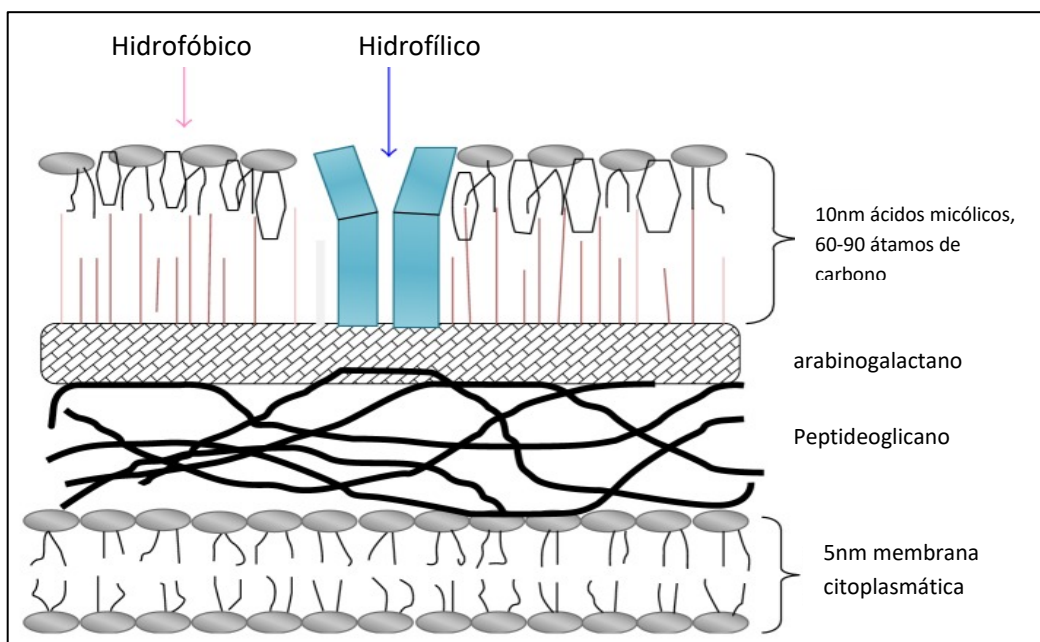


Figura 1: Diagrama esquemático da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Fonte: Mandewale *et. al*, 2015).

A maioria das actinobactérias (actinomicetos) são organismos amplamente distribuídos tanto em recursos terrestres como em ecossistemas aquáticos, incluindo marinhos, sendo consideradas Gram-positivas filamentosas que crescem por uma combinação de extensão de ponta e ramificação das hifas. Portanto, da mesma forma como fungos filamentosos, muitos microrganismos desse filo produzem um micélio e muitos desses actinomicetos miceliais se reproduzem por esporulação, o que atribuiu o nome à ordem, derivado das palavras gregas para estria, aktis ou aktin e fungo (mukes), além do fato de que o grupo foi considerado, em décadas passadas, formas de transição entre fungos e bactérias (Barka *et al.*, 2016).

Duas espécies do gênero *Mycobacterium* são ditas como os principais patógenos do grupo. *M. tuberculosis* (Mtb) e *M. leprae* são importantes agentes patológicos do homem presentes desde a antiguidade.

Mtb é responsável pela constituição de um complexo formado por espécies adicionais como *M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis* entre outras, cuja principal enfermidade causada é a tuberculose (TB) (Jagielski *et al.*, 2014).

A tuberculose é uma doença infecciosa e transmissível, que afeta principalmente os pulmões e tendo como principal reservatório o homem. Sua transmissão é direta, de pessoa a pessoa, principalmente através do ar, com transmissão do bacilo através de tosse, espirro ou saliva (Nogueira *et al.*, 2012). Cerca de um terço da população do mundo tem TB latente, o que significa que as pessoas foram infectadas pela bactéria da tuberculose, mas ainda não estão doentes e não podem transmitir (WHO, 2016).

Mycobacterium leprae é uma bactéria não cultivável em meios de cultura artificiais, uma vez que se constitui em um parasita intracelular obrigatório, sendo o agente causador da hanseníase. Após a sua infecção, *M. leprae* cria um ambiente favorável à sua sobrevivência na célula hospedeira (Kumar *et al.*, 2014).

1.1.2 Caracterização biomolecular do gênero *Mycobacterium*

Por muitos anos, os estudos taxonômicos das micobactérias foram realizados a partir dos aspectos fenotípicos destes organismos, como a sua resistência álcool-ácida, seu tempo e condições de crescimento – como meio de cultura e temperatura -, o aspecto macroscópico das colônias formadas – como a pigmentação e a rugosidade -, sua morfologia microscópica, resistência à antibióticos e testes bioquímicos de metabolismo (Rogall *et al.*, 1990).

Após a década de 1990, os estudos genômicos proporcionaram uma melhor compreensão da taxonomia do gênero *Mycobacterium*. Nesses estudos, as regiões altamente conservadas do genoma passaram a ser analisadas sendo observada a presença de sequências hipervariáveis, nas quais a ocorrência de deleções, inserções ou substituições de bases nucleotídicas caracteriza uma espécie de micobactéria diferente (Tortoli, 2003).

As cinco principais regiões propostas para a caracterização das micobactérias são o gene *rrs*, codificante para a subunidade 16S do RNA ribossomal; o gene *hsp65*, o qual codifica a proteína do choque térmico de 65kDa; o gene *sodA*, responsável pela superóxido dismutase; a região *recA*, que codifica parte do sistema de recombinação e reparo do DNA; o *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase; a *rnpB*, que codifica a porção da ribonuclease P do RNA (RNase P), enzima envolvida no processamento do tRNA; e *its*, que codifica o espaçador interno entre os genes codificantes para as subunidades ribossomais 16S e 23S (Adékambi & Drancourt, 2004).

A região *hsp65* foi proposta na década de 1990 para a identificação de espécies micobacterianas, a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR (Telenti *et al.*, 1993). Ela continua sendo a mais utilizada devido à sua rapidez e eficácia de identificação. O gene é um dos mais conservados no gênero, possuindo regiões hipervariáveis nas posições 624 a 664 e 683 a 725 (coordenadas do gene de Mtb H37Rv), as quais constituem o “fragmento de Telenti”, constituído por 439 pb da posição 398 a 836. Apesar da cobertura de 99,3% do gênero *Mycobacterium*, a região não conseguiu discriminar os membros do complexo Mtb ou *M. pinnipedii* (Dai *et al.*, 2011).

Em geral, o genoma das células micobacterianas é caracterizado por apresentarem maior conteúdo dos nucleotídeos guanina e citosina (G+C), correspondendo à 62 - 70 % da composição do seu DNA. Uma exceção ocorre com o *M. leprae*, espécie responsável por causar a hanseníase, a qual apresenta cerca de 58% de conteúdo G+C (Rastogi *et al.*, 2001).

1.1.3 *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis é uma espécie micobacteriana saprofítica que habita o solo, possuindo um tempo de duplicação de aproximadamente quatro horas, e de geração de colônias em três a quatro dias (Figura 2) (Shiloh & Champion, 2010).

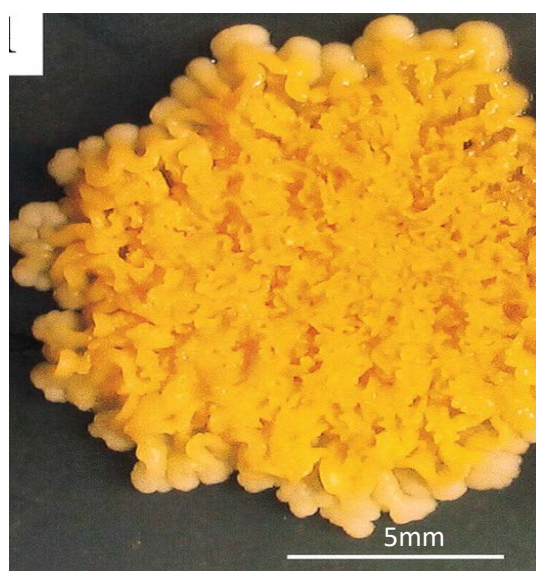


FIGURA 2: Colônia isolada de *M. smegmatis* selvagem cultivada em meio 7H9-ágar por duas semanas. A barra representa 5mm (Dahl *et al.*, 2005)

A espécie constitui o grupo das micobactérias ambientais (MNT) e seu genoma já foi completamente sequenciado, embora ainda não tenham sido publicadas análises ou estudos mais detalhados sobre a sua sequência genômica (Baloni *et al.*, 2014).

M. smegmatis vem sendo explorado com sucesso no ambiente acadêmico para a expressão de proteínas micobacterianas, especialmente de *M. tuberculosis*,

podendo estas serem antígenos, ferro-superóxido dismutases (Fe-SOD) ou ainda enzimas da parede celular ou específicas para a síntese de lipídeos, entre outras (Fernández & Vega, 2013).

1.2 Sistemas de expressão de proteínas heterólogas

1.2.1 Definição e caracterização de um sistema de expressão

Os sistemas de expressão de proteínas heterólogas ou recombinantes surgiu como uma importante ferramenta para a biologia e para a biotecnologia, permitindo a análise estrutural e funcional de determinada proteína, a partir de sua extração e purificação (Baeshen *et al.*, 2015).

Esses sistemas passaram a ser empregados na tentativa de se produzir grandes quantidades de proteínas, as quais seriam dificilmente isoláveis de seu organismo nativo, devido à sua baixa disponibilidade e difícil acesso (Miyake *et al.*, 2007).

O potencial uso biotecnológico desses sistemas se dá pela produção de proteínas funcionais de diversos organismos em larga escala, podendo estas serem enzimas ou fármacos de grande utilidade médico-farmacêutica (Baeshen *et al.*, 2015).

Sistemas bacteriológicos permanecem como os sistemas mais atrativos graças ao seu baixo custo, alta produtividade, uso rápido e manuseio simples. Diversas possibilidades de sistemas existem, de modo a garantir uma boa eficiência do processo, como os hospedeiros: *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus* e, principalmente, a *Escherichia coli* (cepas BL21 e K12 e derivados) (Terpe, 2006).

Os principais promotores utilizados no processo são: os promotores induzíveis de L-arabinose (*araBAD*) e ramnose (*rhaPBAD*), os promotores da T7 RNA polimerase, do fago lambda (*pl*, *lac*, *trc*, *tac*), entre outros (Terpe, 2006).

Outros sistemas podem ser formados por *M. smegmatis*, células de inseto infectadas por baculovírus, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, arqueobactérias, leveduras, fungos filamentosos (*Aspergillus*) e protozoários (*Leishmania tarentolae*, *Dictyostelium discoideum*) (Gráfico 1) (Terpe, 2006; Fernández & Vega, 2013).

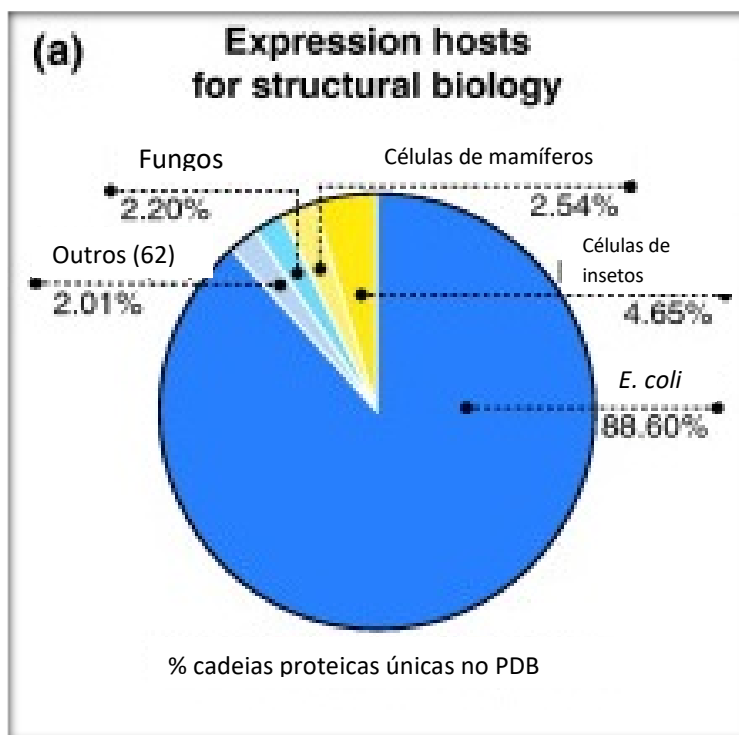


Gráfico 1: Representação da utilização de diferentes células para a produção de proteínas recombinantes. *E. coli*, células de insetos infectadas com baculovírus e células de mamífero representam os hospedeiros de expressão dominante no PDB, representando cerca de 96% de todos os hospedeiros utilizados (Fernández e Vega, 2013).

1.2.2 Escherichia coli e a produção de proteínas recombinantes

A *E. coli* é o microrganismo mais utilizado para a composição de sistemas de expressão para proteínas recombinantes, sendo o responsável por 88,6% de todas as cadeias de proteínas distintas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Fernández & Vega, 2013; gráfico 1).

Esta bactéria é um bastonete Gram-negativo que possui uma camada lipopolissacarídica na membrana externa, responsável pela liberação de endotoxinas que podem desencadear respostas inflamatórias. Este fator apresenta-se como uma desvantagem para sua utilização como um sistema de expressão, agravado pela sua incapacidade de realizar modificações pós-traducionais e formação de corpos de inclusão insolúveis, garantindo uma obtenção de apenas 30% das proteínas expressas (Bashiri & Baker, 2015; Baeshen *et al.*, 2015).

Ainda assim, a *E. coli* foi o primeiro hospedeiro a ser utilizado com potencial biotecnológico, permitindo a fabricação e uso regulados da insulina humana em 1982, para o tratamento da diabetes. Desde então, o microrganismo passou a ser utilizado como hospedeiro para a produção de diversas outras proteínas essenciais para o tratamento de patologias humanas (Baeshen *et al.*, 2015), sendo algumas descritas na tabela 1.

Tabela 1: Lista dos principais biofármacos produzidos por *E.coli* (Fonte: Bashen *et al.*, 2015). Dados obtidos a partir de websites corporativos e <https://www.fda.gov/>.

Biofármaco	Indicação	Ano de aprovação	Compania
Humulin (rh insulina)	Diabetes	1982 (EUA)	Eli Lilly
Intron A (Interferon alfa2b)	Câncer, hepatite, verrugas genitais	1986 (EUA)	Schering-Plough
Roferon (Interferon alfa2a)	Leucemia	1986 (EUA)	Hoffmann-La-Roche
Humantrope (somatropina rh hormônio do crescimento)	Deficiência hGH em crianças	1987 (EUA)	Eli Lilly
Neupogen (filgrastim)	Neutropenia	1991(EUA)	Amgen Inc.
Betaferon (Interferon beta-1b)	Esclerose múltipla	1993(EUA)	Schering Ag

Lispro (insulina de ação rápida)	Diabetes	1996(EUA)	Eli Lilly
Rapilysin (reteplase)	Infarto agudo do miocárdio	1996(EUA)	Roche
Infergen (interferon alfacon-1)	Hepatite C crônica	1997(EUA)	Amgen
Glucagon	Hipoglicemia	1998(EUA)	Eli Lilly
Beromun (tasonermina)	Sarcoma leve	1999(EU)	Boehringer Ingelheim
Ontak (denileucina diftitox)	Linfoma cutâneo (Célula T)	1999(EUA)	Seragen Inc.
Lantus (insulina glargina de ação prolongada)	Diabetes	2000(EUA)	Aventis
Kineret (anakinra)	Artrite reumatoide	2001(EUA)	Amgen
Natrecor (nesiritida)	Infarto congestivo	2001(EUA)	Scios Inc.
Somavert (pegvisomant)	Acromegalia	2003(EUA)	Pharmacia NV
Calcitonina (calcitonina “salmão” recombinante)	Osteoporose pós-menopausa	2005 (EUA)	Upsher-Smith Laboratories
Lucentis (ranibizumab)	Degeneração macular (envelhecimento)	2006(EUA)	Novartis
Preotact (hormônio paratireoidiano humano)	Osteoporose	2006 (Europa)	Nycomed Danmark

Krystexal (rh ureia oxidase PEGylated)	Gota	2010 (EUA)	Savient
Nivestim (filgrastim, GCSF)	Neutropenia	2010 (EUA)	Hospira
Voraxaze (glucarpidase)	Diminuição dos níveis tóxicos de metotrexato em pacientes com função renal reduzida	2012 (EUA)	BTG International
Preos (hormônio paratiroide)	Osteoporose, hipoparatiroidismo	2013 (EU)	NPS Pharmaceuticals

Legenda: rh (hormônio recombinante); G-CSF (fator estimulante de colônias granulocíticas); EU (União Europeia); EUA (Estados Unidos da América).

A formação de um sistema de expressão implica em abranger fatores importantes, os quais relacionam o organismo hospedeiro e a proteína heteróloga a ser expressada da melhor maneira possível, de forma a garantir uma maior eficiência no processo.

Para tanto, o hospedeiro escolhido deve apresentar, por exemplo, um conteúdo G+C em seu genoma, condizente com o organismo cuja proteína será expressa, aumentando a eficiência da expressão de acordo com o uso de diferentes códons por cada organismo e a disponibilidade de RNAs transportadores. Este é um dos fatores que pode dificultar a expressão, por exemplo, de proteínas de *Mtb* em *E. coli*. A proporção G+C nestes organismos é menor (50,8%) em relação às micobactérias (~65%), o que faz com estes organismos exijam outra maquinaria para o processo traducional (Bashiri & Baker, 2015).

Fatores como um menor tempo de duplicação e um alto nível de expressão podem ser cruciais para garantir a produção de grandes quantidades da proteína

recombinante por unidade de tempo. O tempo de duplicação depende das condições de crescimento do organismo e os seus níveis de expressão de proteínas dependem de seu metabolismo e capacidade de indução (Bashiri & Baker, 2015).

Dada proteína pode requerer a realização de modificações pós-traducionais (MPTs), as quais são responsáveis por torná-la funcionalmente ativa. Portanto, o uso de um organismo incapaz de realizar tais processos inviabiliza seu uso em um sistema de expressão para produção de alguns biofármacos por exemplo (Bashiri & Baker, 2015).

A utilização de um sistema de expressão em escala industrial dependerá de dois fatores principais, entrelaçados, sendo eles o tempo total para a expressão da proteína recombinante e a mobilização de recursos (financeiros) para o processo.

Estes fatores correspondem às fases iniciais, médias e finais do projeto. Ainda no ambiente laboratorial de pesquisa, etapas como a seleção do gene de interesse e sua posterior clonagem em um vetor devem ocorrer para que os processos de transformação, seleção clonal e expansão dos clones possam ocorrer. A partir dessas etapas, ensaios de expressão da proteína devem ser realizados, afim de verificar-se o sucesso obtido e avaliar os custos e rendimentos (taxas de expressão, quantias de meios e antibióticos necessárias), para que, só então, o processo ocorra em escala de produção.

Ainda existem proteínas cuja expressão é ineficaz após a utilização de sistemas de expressão. Esses eventos podem ocorrer quando uma proteína possui uma baixa estabilidade, é relativamente tóxica para o hospedeiro, sua expressão propicia a formação de corpos de inclusão, após a sua síntese não ocorrem eventos de modificações pós-traducionais ou os custos para desenvolvimento do processo são bastante elevados e complexos (Miyake *et al.*, 2007).

1.2.3 *M. smegmatis* para formação de um sistema de expressão

Ao mesmo tempo em que não é uma micobactéria patogênica, *M. smegmatis* possui como vantagem adicional um tempo de duplicação muito mais curto do que membros do complexo Mtb, tornando-o um organismo seguro e prático para a cultura

em laboratório. Além disso, ela realiza a secreção de proteínas para o meio extracelular, o que facilita a extração e purificação de peptídeos, reduzindo custos do processo (Bashiri & Baker, 2014).

Uma cepa mutante de *M. smegmatis* (mc²155) foi isolada da cepa selvagem ATCC 607, caracterizada por possuir uma alta capacidade de transformação por plasmídeos (Bashiri & Baker, 2014).

Ao contrário do que ocorre em *E. coli*, em micobactérias as proteínas GroEL – chaperonas exclusivas do gênero, as quais não dependem de ATP para o seu funcionamento são expressadas e purificadas concomitantemente com outras proteínas heterólogas introduzidas, devido a sua cauda terminal de histidina. Tal característica pode facilitar melhor direcionamento e expressão solúvel de proteínas do complexo Mtb, promovendo diferentes enovelamentos nas proteínas expressadas e a síntese simplificada e eficaz de proteínas (Bashiri & Baker, 2014).

Métodos de cristalografia consistem na ferramenta mais eficaz para se obter a estrutura molecular de uma proteína por biologia estrutural. A partir desta técnica foi comprovada a expressão, purificação e posterior cristalização bem-sucedida em *M. smegmatis* de glicose-6-fosfato desidrogenase, policetídeo sintase e D-pirrolidona-5-carboxilato desidrogenase as quais consistem em proteínas e Mtb (Bashiri & Baker, 2014).

A análise das 40 estruturas proteicas de diferentes micobactérias obtidas por cristalografia e depositadas no PDB, dentre as quais 12 originárias de Mtb, demonstra o crescente uso de *M. smegmatis* como organismo hospedeiro para a construção desses sistemas, sendo este responsável pela produção de 9 dessas proteínas (Figura 3) (Bashiri & Baker, 2014).

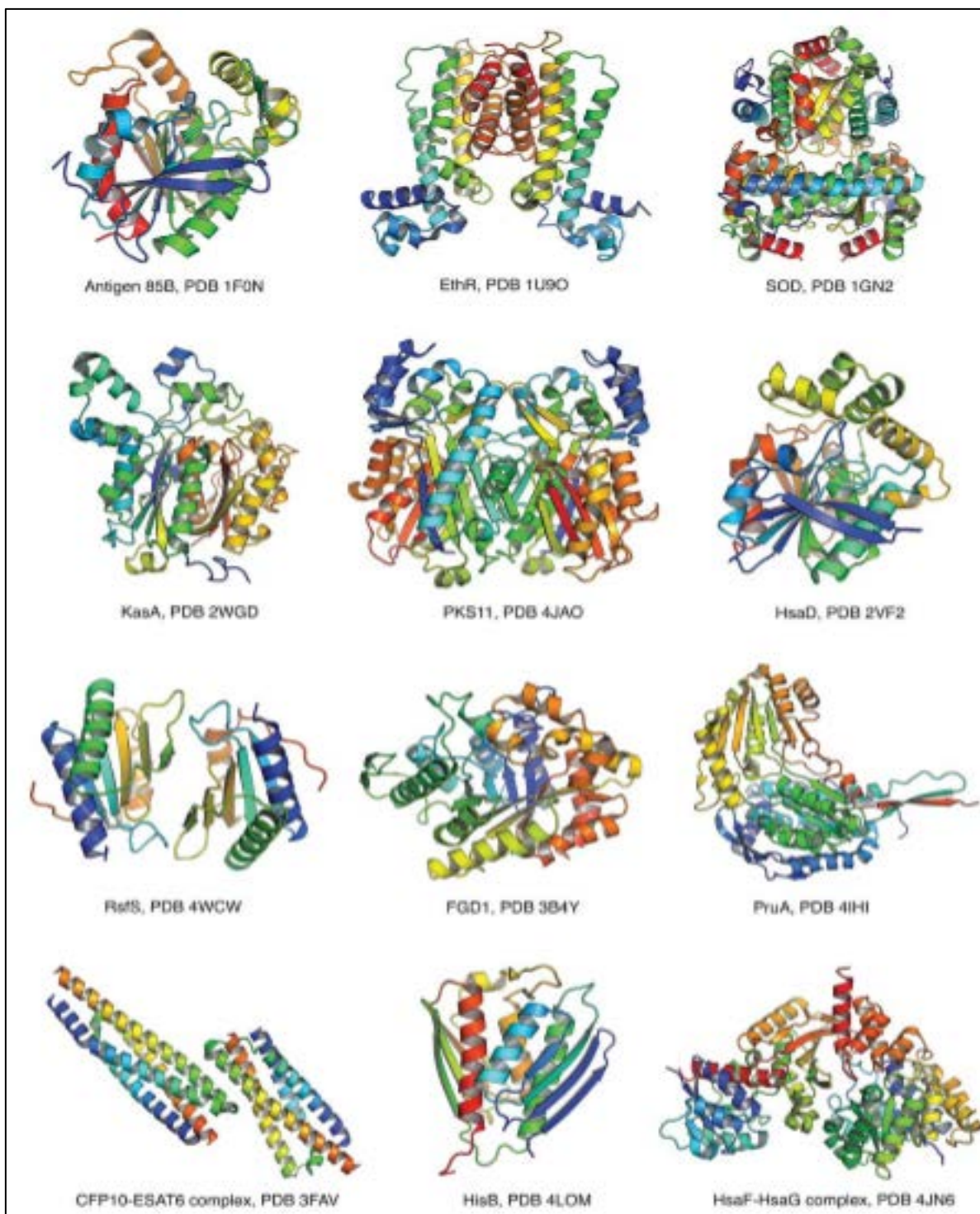


FIGURA 3: Estruturas cristalográficas de proteínas de Mtb obtidas por expressão em hospedeiros alternativos, sendo todas expressadas em *M. smegmatis*, à exceção de 1GN2 (*M. vaccae*), 4JN6 (*Rhodococcus jostii*) e 2VF2 (*Pseudomonas putida*) (Fonte: Bashiri & Baker, 2014).

A expressão de genes heterólogos em micobactérias foi propulsionada a partir da criação de vetores que constituíam sistemas de expressão, induzíveis ou não, os quais possuíam, por exemplo, o promotor do gene de *M. bovis* BCG hsp60 que torna constitutiva a expressão de proteínas (Bashiri & Baker, 2014).

Vantagens do uso de Msm mc²155 para a expressão de proteínas heterólogas podem ser citados, sendo estes:

- a constituição e estrutura da parede celular
- a expressão, o dobramento e a purificação de proteínas recombinantes solúveis é facilitada na presença de chaperonas específicas de micobactérias
- a realização de modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, glicosilação, metilação, ADP-ribosilação, lipidação e pupilação, fenômenos mais comum em células eucarióticas que podem tornar a proteína fisiologicamente funcional
- o crescimento rápido em diversos meios nutrientes, entre eles diferentes fontes de carbono e nitrogênio (Baloni *et al.*, 2014; Bashiri & Baker, 2014).

O desenvolvimento de promotores induzíveis em micobactérias permitiu um maior controle de sua expressão gênica, o que viabiliza aos pesquisadores estudar o papel de genes essenciais à sobrevivência e virulência bacteriana, além de aumentar sua expressão durante a indução (Shiloh & Champion, 2009).

1.3.Vetor induzível para o sistema de expressão

1.3.1 O plasmídeo pJAM2

A existência de obstáculos para a obtenção de proteínas recombinantes a partir de *M. smegmatis*, impulsionou a construção do plasmídeo vetor pJAM2 (Figura 4). Entre eles se destacam a impossibilidade de se regular as elevadas taxas de expressão de proteínas heterólogas no organismo – semelhante ao mecanismo de indução do promotor *lac* em *E. coli* – e a ausência de um método adaptável para a purificação a partir de micobactérias (Triccas *et al.*, 1998).

O plasmídeo foi construído utilizando-se como agente induzível o promotor da Acetamidase, enzima altamente induzível de *M. smegmatis* propriamente. Dessa forma é possível obter-se altos níveis de expressão de genes heterólogos no sistema composto por essa micobactéria (Triccas *et al.*, 1998).

A região do promotor da Acetamidase contendo 1.5kb de fragmento foi amplificada da cepa *M. smegmatis* NCTC 8159 e clonada no plasmídeo pJAM2, de forma a atuar na indução. O plasmídeo contém ainda três sítios para enzimas de restrição (*Bam*HI, *Xba*I e *Sca*I) e uma região que codifica para 6 resíduos de histidina (Triccas *et al.*, 1998).

Observa-se também a presença de origens de replicação tanto para *E. coli* quanto para micobactérias, o que confere ao plasmídeo a possibilidade de gerar cópias em ambos os organismos. Além disso, o plasmídeo confere resistência ao antibiótico canamicina, de forma a permitir a seleção dos clones existentes.

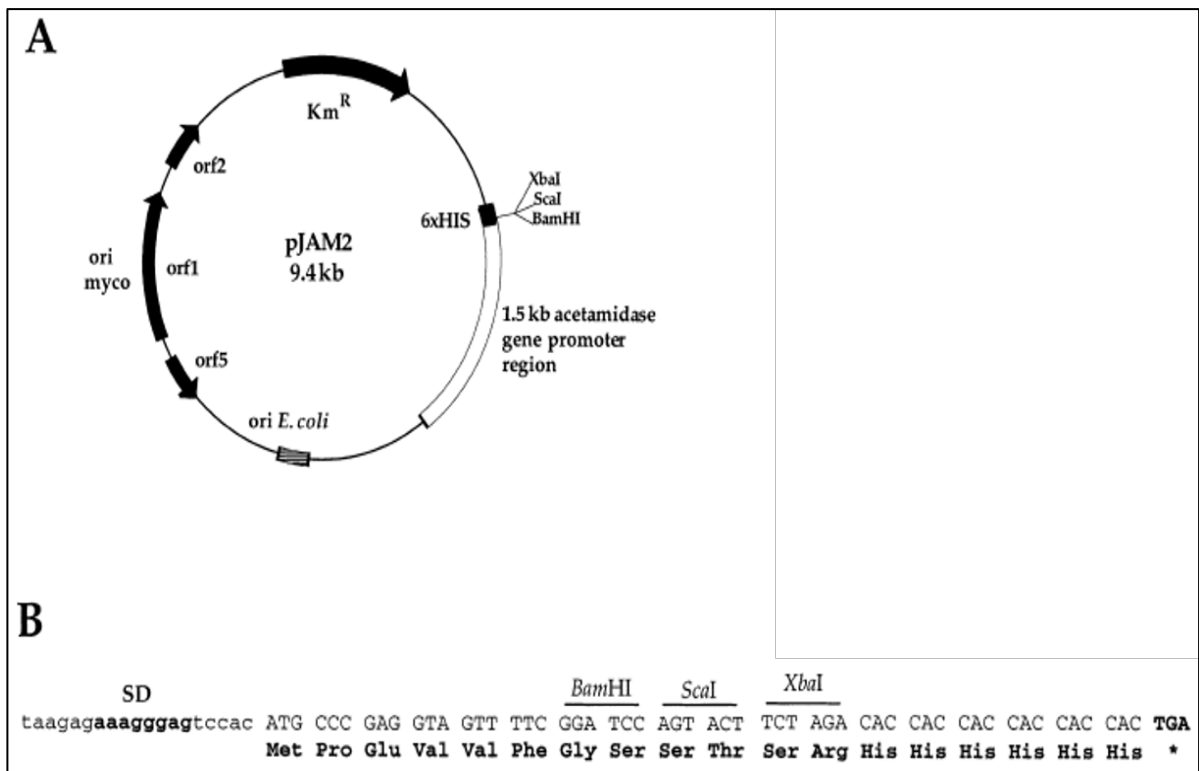


FIGURA 4: Mapa do vetor de expressão pJAM2 (A) e a sequência do sítio múltiplo de clonagem (B), com a sequência Shine-Dalgarno (SD) em destaque. Fonte: Triccas *et al.*, 1998.

1.3.2 O operon da acetamidase

A acetamidase é uma enzima de peso molecular de 47kDa produzida pelas cepas de *M. smegmatis*, responsável por viabilizar a sobrevivência do organismo em meios que contêm amidas simples como fonte de carbono, como a acetamida ou a formamida, sendo altamente induzível em sua presença (Triccas *et al.*, 1998).

A acetamidase foi a primeira enzima induzível reportada em micobactérias, a qual, na presença de indutores, é produzida em níveis cem vezes maiores que os níveis encontrados em culturas não induzidas. Esse aumento nos níveis de expressão da enzima representa até 10% do total de proteínas expressas na bactéria (Parish *et al.*, 1997).

A análise da expressão do gene codificante para esta enzima permite uma melhor compreensão de como a expressão em micobactérias ocorre. Sistemas de expressão que possuem genes induzíveis que permitem ativar ou silenciar genes micobacterianos são ferramentas importantes durante estudos de infecção para o estudo da função gênica e validação de alvos de drogas (Sundararaman *et al.*, 2013).

Na sequência de nucleotídeos da região do operon contendo o gene estrutural (*amiE*), detectou-se 4 fases abertas de leitura (ORFs) adicionais, e a partir do estudo de knockouts, a descrição funcional de cada um foi possível, sendo eles: *AmiA*, um regulador negativo; *AmiD*, regulador positivo; *AmiS*, sem função reguladora (Mahenthiralingam *et al.*, 1993); *AmiC*, regulador positivo (Parish *et al.*, 1997).

Existe um primeiro promotor (P1) localizado entre *amiC* e *amiA*, um segundo (P2), induzível por amidas, entre *amiA* e *amiD*, e um terceiro (P3), anterior à *amiE*. Um promotor orientado na direção oposta aos outros foi denominado PC, sendo o responsável pela expressão *amiC* (Figura 5) (Sundararaman *et al.*, 2013).

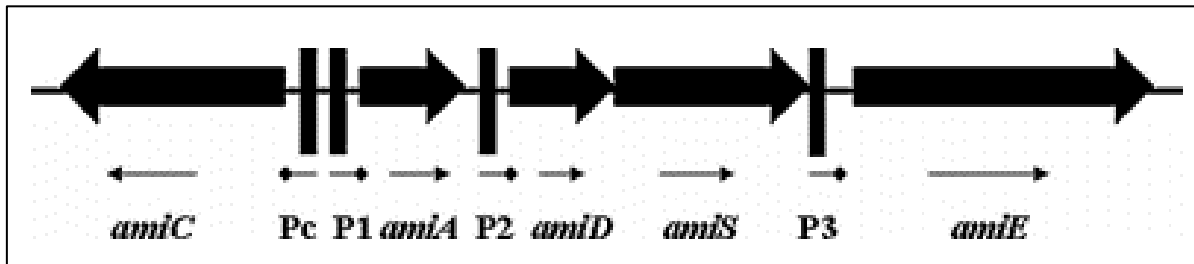


FIGURA 5: Ordem dos genes e dos promotores no operon da acetamidase. ORFs estão representadas pelas setas maiores e as setas menores indicam o sentido da transcrição (Sundararaman *et al.*, 2013).

1.3.3 A proteína ERP

A proteína ERP (Exported Repeated Protein) também é denominada P36, Pirg ou Rv3810 e foi demonstrada como um produto exportado em *M. tuberculosis* usando o sistema *phoA*, sendo liberada pelo sistema de secreção Sec (Mendonça-Lima *et al.*, 2001).

Apesar de ter sido descrita inicialmente como exclusiva de espécies patológicas de *Mycobacterium* (complexo Mtb e *M. leprae*), a proteína foi encontrada presente em todas as micobactérias testadas, como a *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. marinum* e *M. xenopi* (Mendonça-Lima *et al.*, 2001).

A proteína é secretada e possui como características um peso molecular aparente de 36kDa e três domínios proteicos identificados. O domínio amino-terminal, dos aminoácidos 1 à 80, inclui o peptídeo sinal e possui alta semelhança entre as espécies, de cerca de 70%. Um domínio central, que contém a região repetitiva, possui o número de repetições e as sequências PGLTS variáveis entre as espécies. O domínio carboxi-terminal, demonstra semelhança maior que 50% entre as espécies com uma sequência rica em prolina e alanina, de tamanhos variáveis, na extremidade (Mendonça-Lima *et al.*, 2001).

1.3.4 A proteína MPB64

A proteína MPB64 foi caracterizada como um importante antígeno secretado para o diagnóstico de tuberculose em testes de pele, ensaios de imunocromatografia e imunohistoquímica (Sypabekova *et al*, 2017).

O gene possui um comprimento de 618 pares de base e a proteína possui um peso molecular estimado em 22,4kDa, sendo responsável por produzir uma reação forte de hipersensibilidade tardia, o que influencia na patogenia da tuberculose (Yamaguchi *et al.*, 1989). Está codificado na região genômica denominada de RD2, região deletada dos genomas de algumas cepas BCG, como Pasteur.

Estudos apontaram recentemente a possibilidade de discriminação entre pacientes TB positivos daquelas que passaram pela vacinação BCG, a partir de um teste de pele para MPB64, o que indica a viabilidade do uso da proteína para o diagnóstico de tuberculose ativa. Ainda, foi relatado o uso do teste de ELISA em sanduíche, baseado em um anticorpo anti-MPT64, para o diagnóstico sorológico de TB pulmonar, tanto em pacientes com esfregaço positivo quanto em pacientes negativos (Tamada *et al.*, 2012). Entretanto, a cepa BCG utilizada para a produção da vacina no Brasil, BCG Moreau, não apresenta a deleção RD2 e, portanto, é capaz de expressar a proteína MPB64.

Devido a potencial aplicabilidade desta proteína em diferentes ensaios para diagnóstico de TB, sua obtenção sob forma recombinante é de interesse. Por se tratar de uma proteína secretada, contra a qual o laboratório possui anticorpo policlonal específico, constitui um bom alvo para o estudo de sistemas de expressão de proteínas secretadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a utilidade do plasmídeo pJAM2 como vetor induzível para expressão heteróloga de proteínas a partir do promotor da acetamidase em *Mycobacterium smegmatis* mc²155.

2.2 Específicos

1. Expandir e extrair o DNA plasmidial do vetor de expressão pJAM2 e da construção pJAM2-erp.
2. Mapear o plasmídeo por digestão com enzimas de restrição utilizando a enzima *Bam*HI.
3. Transformar por eletroporação *M. smegmatis* mc²155 eletrocompetentes com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.
4. Verificar a expressão proteica, a capacidade de indução do promotor da acetamidase e a capacidade de secreção da proteína Erp recombinante por *M. smegmatis* mc²155.
5. Clonar a sequência codificante para a proteína MBP64 de *M. bovis* BCG no vetor pJAM2.

3. Metodologia

3.1 Preparo de *E. coli* TOP10 eletrocompetente

A fim de se obter células eletrocompetentes para a transformação plasmidial, a partir do estoque de bactérias do laboratório (cepas mantidas em nitrogênio líquido, -196°C), uma alíquota de *E. coli* TOP10 foi cultivada em LB-ágar para posteriormente uma colônia ser cultivada em 5mL Meio Luria-Bertani (LB - Anexo) à 37°C, sob agitação por 18h. A cultura foi transferida para o frasco contendo 500mL de LB (diluição 1:100) e mantida à 37°C sob agitação até que a fase exponencial de crescimento (DO_{600} entre 0,35 e 0,4) fosse alcançada, sendo esta verificada mediante leitura por espectrofotometria no equipamento Ultraspec 1100 Pro® (Amersham Biosciences). A cultura foi então mantida por 30 minutos em gelo e centrifugada a 3.220g por 20 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante e realizando uma lavagem do sedimento com 250mL de água Mili-Q gelada. A centrifugação ocorreu mais duas vezes alternando-se a mais duas lavagens com 125 e 5mL de 10% glicerol (Sigma®) respectivamente. Após a última centrifugação o sedimento foi ressuspenso em 5mL de tampão GYT (Anexo) para obter-se uma concentração final de 2,0 a 3,0 x 10¹⁰ células/mL ($1.0 OD_{600nm} = \sim 2,5 \times 10^8$ células/ml). As células foram aliqüotadas em microtubos de 1,5 mL com 50µL da suspensão em cada e armazenadas a -80 °C (Sambrook & Russell, 2001).

3.2 Transformação de *E. coli* TOP10 eletrocompetente para expansão dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

Para obtenção de clones bacterianos contendo os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp, 1µL de cada um dos DNAs plasmidiais foi adicionado à dois microtubos diferentes contendo, cada um, 50µL de *E. coli* TOP10 eletrocompetente, estando todo o sistema à 0°C. A transformação por eletroporação das células foi realizada nas condições de 2,5kV, 25µF e 200Ω em cubetas de 2mm, no equipamento Gene Pulser™ (BIO-RAD). Após o pulso elétrico, as suspensões foram transferidas rapidamente para tubos Falcon® de 15mL contendo 1mL de meio LB cada. As culturas foram então incubadas por 1 hora à 37°C, sob agitação suave, e depois plaqueadas

(100 e 900µL de cada transformação), em meio LB/ágar contendo o antibiótico canamicina (50µg/mL). As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 18h.

3.3 Extração e obtenção dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

Das placas de *E. coli* TOP10 transformadas com o DNA plasmidial, colônias foram selecionadas aleatoriamente para crescimento em 10mL de meio LB líquido, contendo canamicina (50µg/mL), a 37°C por 18h. Em seguida, 3,5mL da cultura foram centrifugados à 3220g por 5 minutos, para obtenção do sedimento bacteriano. O sobrenadante é então descartado e as células são ressuspensas e lisadas em tampão específico (Anexo), para posterior obtenção e purificação do material plasmidial com o kit Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system (Promega), segundo recomendações do fabricante.

3.4 Avaliação e visualização do DNA obtido a partir de eletroforese em gel de agarose e quantificação por espectrofotometria

Tanto após a extração do DNA plasmidial quanto após sua digestão, o tamanho e integridade do material obtido foram verificados em géis de agarose 1% na presença de tampão TBE 0,5X (Anexo). A eletroforese é feita sob uma voltagem de 65 V (para géis grandes, com distâncias entre o anodo e o catodo de 13 cm), por aproximadamente 90 minutos (Sambrook & Russell, 2001). Após a corrida, o gel é corado em brometo de etídio (BET) por 10 à 20 minutos, descorado em água MiliQ pelo mesmo tempo e visualizado no equipamento transiluminador GelDoc XR Imagem System – Molecular Imager® (uma radiação UV de 254nm é aplicada, sendo absorvida pelo DNA e retransmitida à 590nm, onde o corante BET, absorve a 302 – 366nm) (Sambrook & Russell, 2001). A imagem obtida é capturada por uma câmera e analisada pelo programa computacional Quantity One 4.6.7.

A quantificação do DNA plasmidial foi realizada mediante espectrofotometria, efetuando a leitura no comprimento de onda à 260nm, a partir de 1µL da amostra, no equipamento NanoDrop® 3300 (Thermo Scientific) segundo especificações do fabricante.

3.5 Obtenção de micobactérias eletrocompetentes para transformação com o DNA plasmidial

Cultivou-se *M. smegmatis* mc²155 em 200mL de meio LB–Tween 80™ (Tw80™ - Anexo) à 37°C, sob agitação, até a fase exponencial de crescimento (densidade ótica a 600nm entre 0,8 e 1,0, medido por espectrofotometria Ultrospec 1100 Pro® (Amersham Biosciences). A cultura é mantida no gelo por 90 minutos, e depois centrifugada à 3.220 g por 20 minutos, à 4°C, descartando-se o sobrenadante e lavando o sedimento com uma solução aquosa de 50mL de 10 % glicerol (Sigma®) estéril e gelado. Este processo foi repetido mais duas vezes, alterando-se os volumes das soluções de 10 % glicerol, sendo uma com 20 e a outra com 10 mL, respectivamente. Após a última centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento em 2mL de 10 % glicerol sendo este volume aliqotado em microtubos de 1,5mL com 200 µL das células eletrocompetentes e os tubos armazenados a -70 °C.

3.6 Transformação de *M. smegmatis* mc²155 com DNA dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp para análise da expressão de proteínas e capacidade de indução

À dois microtubos diferentes, contendo 200µL de *M. smegmatis* mc²155 eletrocompetentes cada, adicionou-se 1 µL de cada DNA plasmidial - pJAM2 e pJAM2-erp, sendo então realizada a transformação por eletroporação nas seguintes condições: 2,5kV; 25µF e 200Ω por em cubetas de 2mm, no equipamento Gene Pulser™ (BIO-RAD). Após o pulso elétrico, as suspensões foram transferidas rapidamente para tubos Falcon® contendo 5 mL de meio LB - Tw80™ (0,05%), os quais foram incubados durante 4h, à 37°C com agitação suave. As células (100 e 900µL) foram então plaqueadas em meio LB-ágar acrescido do antibiótico canamicina (25µg/mL). As placas foram incubadas por até 4 dias à 37°C, até o aparecimento de colônias isoladas.

3.7 Digestão com enzimas de restrição

Num primeiro momento foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *Bam*HI (New England BioLabs®), a qual cliva o DNA plasmidial pJAM2 no sítio denominado como região múltipla de clonagem, gerando um único fragmento de 9,4kb. À um microtubo foi adicionado a enzima *Bam*HI (2µL), tampão NEB 3 10X (New England BioLabs®) (4µL), o DNA plasmidial (pJAM2, 10µL) e H₂O MiliQ (4µL), para uma reação de 20µL. A mesma enzima foi usada para a digestão do DNA plasmidial pJAM2-erp, gerando fragmentos de 9.800, 500 e 50bp. Para visualizar o DNA digerido realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen), em TBE 0,5X (Anexo), seguido de coloração com BET e visualização no equipamento transiluminador.

Para a etapa de clonagem, o plasmídeo pJAM2 e o fragmento MPB64 foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I (New England BioLabs®), de forma a gerar as duas extremidades necessárias para que a ligação entre eles ocorresse.

3.8 Indução com Acetamida das culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

Para observar a indução do promotor Acetamidase, 100µL das culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp, foram transferidos para meio LB/Tw80/Can contendo acetamida (Anexo) numa concentração final de 0,2% ou 2%. As culturas foram mantidas a 37°C e 200rpm por 16h. Um controle não induzido foi realizado cultivando uma cultura sob as mesmas condições, excetuando-se a adição do indutor (Acetamida)

3.9 Extração de proteínas das culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

As culturas induzidas foram então aliquotadas em microtubos de 1,5mL e centrifugadas à 3220g, sendo o sedimento ressuspendido em 1mL de tampão de lise micobacteriana (HEPES/KOH) (Anexo) e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,20µm e reservado para a precipitação de proteínas.

Aos microtubos contendo o sedimento bacteriano em tampão de lise foram acrescidos 500µL de esferas de vidro ou zircônio, sendo em seguida posicionados no equipamento agitador Bead Beater (Biospec Products, Inc.) por 1 minuto. Em seguida foram centrifugados durante 1 minuto à 3220g, sendo o sobrenadante, correspondendo ao lisado celular, transferido em alíquotas de 600µL para outro microtubo.

As proteínas do lisado e do filtrado de cultura foram então precipitadas com TCA (17% final), após homogeneização dos tubos e incubação por 10 minutos à -20°C. Uma nova centrifugação foi realizada à 3220g por 10 minutos, sendo o sobrenadante em seguida descartado. O sedimento foi lavado com 200µL de acetona gelada contendo 1% Trietanolamina (TEA) e novamente centrifugado por 4 minutos, descartando-se em seguida o sobrenadante. O sedimento foi então secado em temperatura ambiente durante 10 minutos e, em seguida, ressuspendido em tampão de SDS-PAGE, mantendo-se a relação de 10µL/0,2 OD original das culturas. O material foi aquecido à 100°C por 5 minutos, centrifugado e 10µL aplicados em gel SDS-PAGE.

3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS –PAGE)

As proteínas extraídas acima foram fracionadas em gel SDS-PAGE 12% de 7 cm e espessura de 0,75 mm em tampão de corrida Laemmli 1X à 200V. Após a corrida, as proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB-250) em solução 30% etanol/ 7% ácido acético. Alternativamente, para realização de western blot, os géis foram equilibrados em tampão de transferência Bjerrum-1X (Anexo) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (ver abaixo).

3.11 Western blot

Após a corrida, as proteínas resolvidas nos géis 12% SDS-PAGE foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Pharmacia) em equipamento Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad), a 15 V durante 60

minutos, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, as membranas foram coradas com MemCode (Pierce®) para visualização e verificação da qualidade da transferência a partir da imagem capturada em densitômetro (GS800 BioRad). Em seguida, as membranas foram descoradas com a solução Pierce Stain Eraser (ThermoScientific®)

Após serem descoradas, seguiu-se com bloqueio em leite em pó (Leite Mólico, Nestlé®) desnatado à 10% (p/v)/TBS, por uma noite, à 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS 1X contendo 0,1% Tween20 (TBS – Tw20) e TBS 1X (3 lavagens durante 5 minutos para cada um dos tampões), seguido por incubação durante 2 horas, sob agitação suave e à temperatura ambiente, com os anticorpos primários numa concentração 1:1000 (anticorpos anti(α)-Acetamidase e anti(α)-Erp) em leite em pó à 5 % (p/v)/TBS – Tw20 contendo 500µL de lisado de *E. coli* TOP10.

A membrana foi lavada sequencialmente com TBS - Tween20 e TBS 1x (como descrito anteriormente) e então incubada por 1 hora na presença do anticorpo secundário (anti(α)-mouse, conjugado à peroxidase (Pierce®)) em solução de leite em pó à 5 % (p/v) TBS-Tw20 e novamente lavada com TBS - Tween e TBS 1x como descrito acima.

As reações foram reveladas com o Kit Super Signal® (Pierce) conforme as instruções do fabricante, onde o produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, através de exposição em filme, seguido por incubação de 2 minutos em solução de revelação, lavagem em água e 3 minutos em solução de fixação, na ausência de luz.

3.12 Preparo de lisado de *E. coli* TOP10

E. coli TOP10 retiradas do estoque de bactérias do laboratório (196°C) foi cultivada em 5mL de meio LB (Anexo) à 37°C, por uma noite. Em seguida, a cultura foi transferida para um Erlenmeyer contendo 500mL de LB (diluição 1:100). A suspensão foi então mantida à 37°C, sob agitação, até que uma OD_{600nm} de 0,4 fosse alcançada. Após atingir essa OD, a cultura foi induzida com arabinose à 0,02%, por 2h, e as bactérias coletadas por centrifugação a 3220 g. O sedimento foi ressuspensão

em 20mL de tampão de lise bacteriana (Anexo) e as células lisadas no equipamento Bead Beater® (Biospec Products, Inc.) em potes de 30mL, contendo aproximadamente 10mL de esferas de zircônio e os 20mL do tampão. As esferas de zircônio foram decantadas e o lisado transferido para um tubo Falcon® sendo este centrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5mL e armazenados à -20°C, para posterior uso.

3.13 Reação de PCR para amplificação do fragmento MPB64

3.13.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos liofilizados foram centrifugados à rotação máxima por 1 minuto. Na cabine de fluxo laminar (DNA *workstation*), adicionou-se o volume de TE (Anexo) 1X necessário para concentração final de 1µg/µL. O tubo foi agitado em sistema tipo *vortex* por 20 segundos seguido de centrifugação por 1 minuto à rotação máxima por 1 minuto. Para uso na reação de PCR, os oligonucleotídeos foram diluídos em H₂O Mili-Q para uma concentração final de 200ng/µL. As soluções são armazenadas à -20 °C. Os oligonucleotídeos usados constam na tabela 2.

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos usados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência
Mpb64pJam - FOR	5'-TTCGGATCCGTCCGCATCAAGATCTTCATGCTG-3'
Mpb64pJam- REV	5'-GATTCTAGAGGCCAGCATCGAGTCGATC-3'

3.13.2 Reação e ciclagem para amplificação do fragmento MPB64

O fragmento MPB64 foi amplificado usando *PCR Mastermix 2X* (Life Technologies). As reações consistiram de 1,0µL de DNA genômico de BCG Moreau (diluído 1:100), 1,0µL dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 12,5µL de *PCR Mastermix* e 9,5µL de H₂O MiliQ para a reação de 25µL. A ciclagem para reação de PCR consta na tabela 3.

Tabela 3: Ciclos utilizados para a reação de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Repetições
Desnaturação	94 °C	5 min.	-
Desnaturação	94 °C	30 seg.	30X
Anelamento	72 °C	30 seg.	
Extensão	72 °C	1 min.	
Extensão final	72 °C	7 min.	-

O fragmento amplificado (MPB64) possui como tamanho esperado 618bp. Os resultados da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% em TBE 0,5x.

3.13.3 PCR de colônia

A partir das colônias crescidas em placas contendo LB/ágar/Kan, utilizou-se a reação de PCR para amplificação da sequência de MPB64 e confirmação da presença da construção (pJAM2-MPB64). As reações utilizadas basearam-se na reação de amplificação do fragmento, exceto em relação à presença do DNA genômico de BCG Moreau (diluído 1:100). Um palito estéril foi encostado na colônia presente na placa e logo em seguida no tubo contendo a reação do PCR para que esta sirva como o DNA molde da reação. O palito foi posteriormente utilizado para inocular 5 mL de meio LB/Kan e a cultura mantida a 37°C, sob agitação, por 18h, para observar-se o crescimento bacteriano.

3.14 Reação de ligação entre o fragmento MPB64 e o vetor pJAM2 digeridos

O vetor pJAM2 e o fragmento MPB64 digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I foram purificados, com o kit Wizard® Plus SV Minipreps – Gel and PCR clean up system (Promega) e ligados a partir de uma reação com a enzima T4 DNA Ligase (GibcoBRL – Thermo). A reação foi realizada para um total de 20µL, conforme

demonstrado na tabela 4, durante 2h a 23°C e posteriormente diluída 5x com H₂O MilliQ estéril e utilizando 1uL para transformação de *E. coli* TOP10, seguindo-se o protocolo descrito acima.

Tabela 4: Componentes e quantidades utilizada na reação de ligação entre o fragmento MPB64 e o vetor pJAM2.

pJAM2 digerido e purificado	3µL
MPB64 digerido e purificado	9µL
T4 DNA Ligase 5x	1µL
Tampão 5X	4µL
H₂O MilliQ	3µL

4.Resultados

4.1 Expansão dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

4.1.1 Obtenção de *E. coli* eletrocompetente de alta eficiência

O preparo de *E. coli* TOP10 eletrocompetente foi realizado, de forma a se obter células aptas a passarem pelo processo de transformação por eletroporação. As etapas do processo de preparo das células eletrocompetentes são fundamentais para garantir uma alta eficiência de transformação.

Nesse sentido, o ensaio deve ser realizado à 4 °C e retirando-se todo o meio de cultivo existente, de forma a diminuir a concentração de sais no meio, os quais podem ser responsáveis por transformações malsucedidas - o choque elétrico pode provocar a morte bacteriana em meios com altas concentrações de sais.

A eficiência das células foi verificada a partir do uso de um DNA plasmidial comercial, o pUC19 (Invitrogen®). O plasmídeo pUC19 possui 2686bp, confere resistência ao antibiótico Ampicilina e tem um alto número de cópias, sendo um vetor de clonagem comumente usado em *E. coli* (Figura 6).

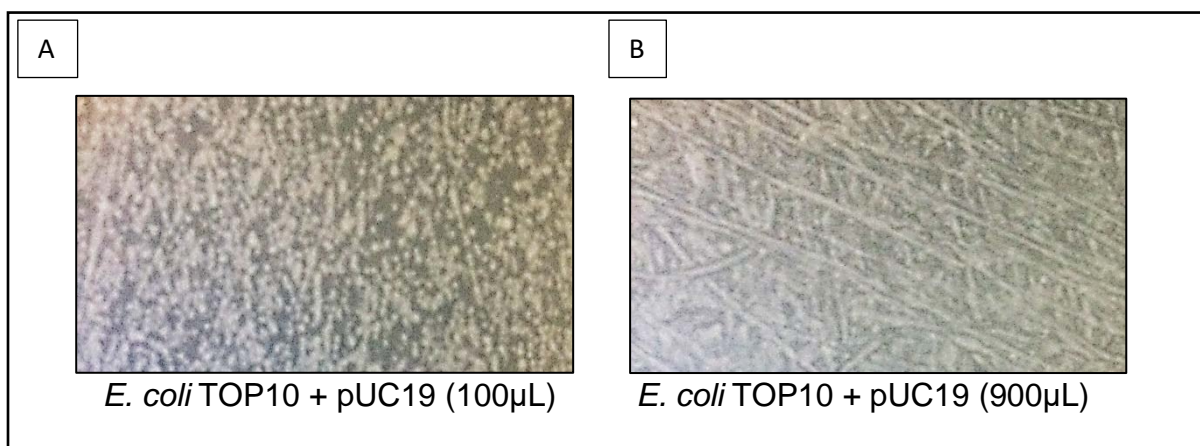


Figura 7: Colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo pUC19 para cálculo da eficiência de transformação das células eletrocompetentes obtidas. Na figura A observa-se a presença de muitas colônias isoladas enquanto em B observa-se um tapete bacteriano.

Em valores quantitativos, a eficiência pode ser calculada pela fórmula:

$$Ef. da transfor. = \frac{n^{\circ} de c\acute{e}l. transformadas}{\mu g de DNA usado} \times \frac{Vf da suspen. celular (mL)}{V da suspen. usado (mL)}$$

Onde:

- A eficiência da transformação é dada em UFC/ μ g de DNA plasmidial.
- Número de células transformadas: Obtido pela contagem de UFC.
- Volume final (Vf) da suspensão celular: 1mL.
- Volume (V) da suspensão usada: 100uL

Utilizando-se esses parâmetros, e tendo visualizado cerca de 4000 colônias na placa contendo 100uL da transformação, estimamos a eficiência de transformação em 4×10^7 (por ug de DNA plasmidial), representando uma eficiência elevada.

4.1.2 Transformação de *E. coli* TOP10 com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp

As células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos, a fim de se obter clones e expandir o DNA dos vetores pJAM2 e pJAM2-erp. As células eletroporadas foram plaqueadas em volumes

de 100 e 900µL para cada plasmídeo, em placas contendo LB - Ágar e canamicina (25ug/mL) e cultivadas à 37°C, pelo período de 18h (Figura 8). Pode-se observar um grande crescimento bacteriano, com formação de um tapete bacteriano nas placas com 900µL de ambos os plasmídeos e presença de muitas colônias isoladas nas placas contendo 100µL da suspensão bacteriana.

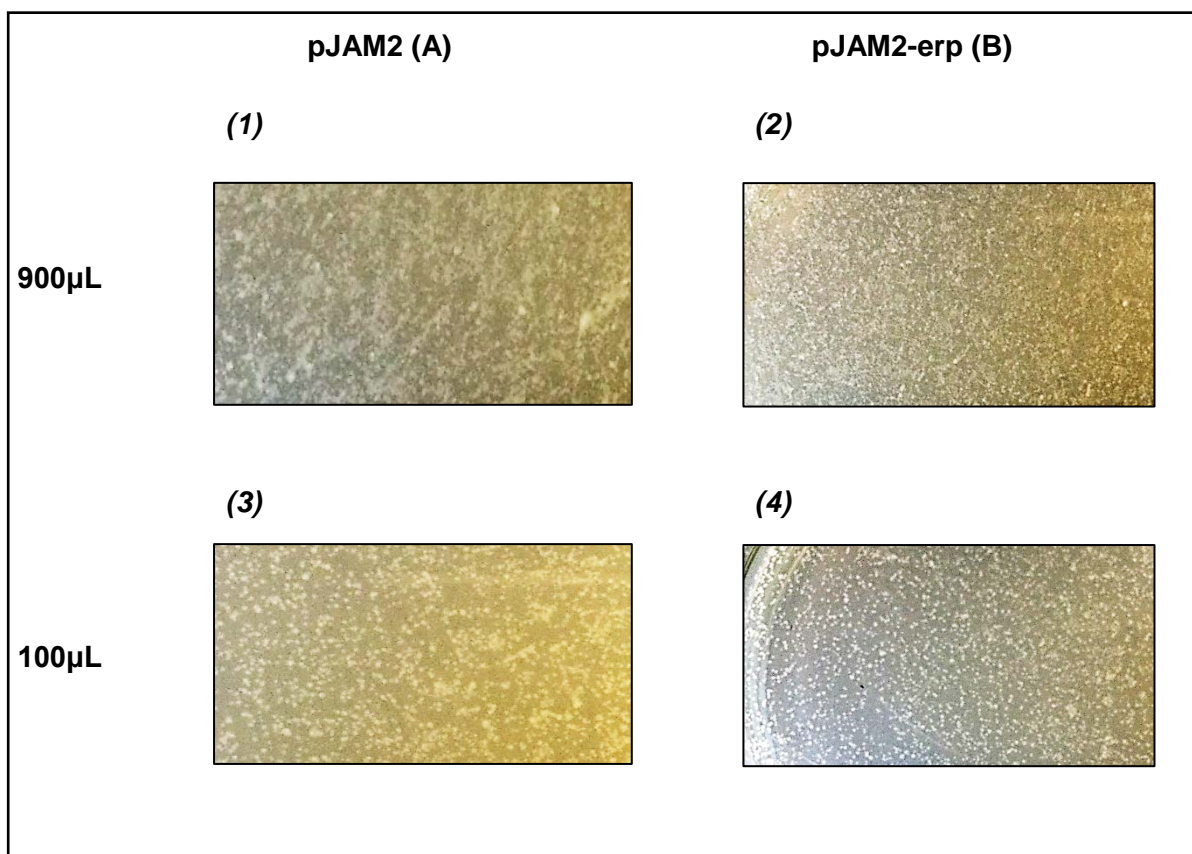


FIGURA 8: Placas de *E.coli* TOP10 transformadas com os plasmídeos pJAM2 (A) e pJAM2-erp (B). Observa-se a formação de um tapete bacteriano nas placas de 900µL de ambos os plasmídeos (1 e 2) e o surgimento de muitas colônias isoladas nas placas de 100µL.

4.1.3 Extração do DNA plasmidial das culturas de *E. coli* TOP10 transformadas, quantificação por espectrofotometria e visualização em gel de agarose.

Após o crescimento das células transformadas com os plasmídeos em placas de LB – ágar acrescidas com canamicina, colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente para cultura em meio LB contendo canamicina (25µg/mL). Após o

crescimento, as culturas foram centrifugadas e o sedimento bacteriano ressuspenso utilizado para extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system (Promega), conforme recomendações do fabricante.

A quantificação do DNA plasmidial extraído foi obtida por espectrofotometria a 260nm no equipamento NanoDrop® 3300 (Thermo Scientific). Os resultados são reportados em µg de DNA por µL. O equipamento afere também a contaminação por proteínas, a partir da relação da densidade ótica 260/280nm, sendo o ideal um valor igual ou superior à 1,75, e a contaminação por outros compostos orgânicos, a partir da fração 260/230, sendo esta ideal na faixa de 1,00 (Tabela 5).

Após o crescimento das colônias selecionadas, a extração do material genético obteve concentrações de 181,5 e 96,6µg/µL para os clones transformados com o plasmídeo pJAM2-erp. Os índices de contaminação tanto por proteínas (260/280nm) quanto por solventes orgânicos (260/230) foram considerados ideais para o procedimento. Da mesma forma ocorreu com a extração do DNA plasmidial dos clones transformados com o pJAM2, sendo que para estes obteve-se concentrações de 130,5 e 162,9µg/µL.

TABELA 5: Concentrações de DNA plasmidial obtidas após a extração a partir do crescimento de duas colônias diferentes e aleatórias de cada uma das placas de 100uL dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp.

	Concentração em µg/µL	260/280	260/230
pJAM2-erp #1	181,5	1,78	1,27
pJAM2-erp #2	96,6	1,73	1,04
pJAM2 #1	130,5	1,62	0,80
pJAM2 #2	162,9	1,70	1,03

4.2 Análise da expressão de proteínas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp e induzidas

4.2.1 Preparo e transformação de *M. smegmatis* mc²155 eletrocompetentes, com os plasmídeos extraídos pJAM2 e pJAM2-erp

M. smegmatis mc²155 eletrocompetentes foram preparadas e transformadas por eletroporação com os DNAs plasmidiais de trabalho (pJAM2 e pJAM2-erp) a fim de se verificar as capacidades de indução das células transformadas. As transformações foram plaqueadas em volumes de 100 e 900µL da suspensão para cada plasmídeo, em placas contendo LB - Ágar acrescidas do antibiótico canamicina (25µg/mL) e inoculadas à 37°C. Foram observadas em todas as placas um número elevado de colônias, da ordem dos milhares, garantindo uma eficiência alta na transformação (Figura 9).

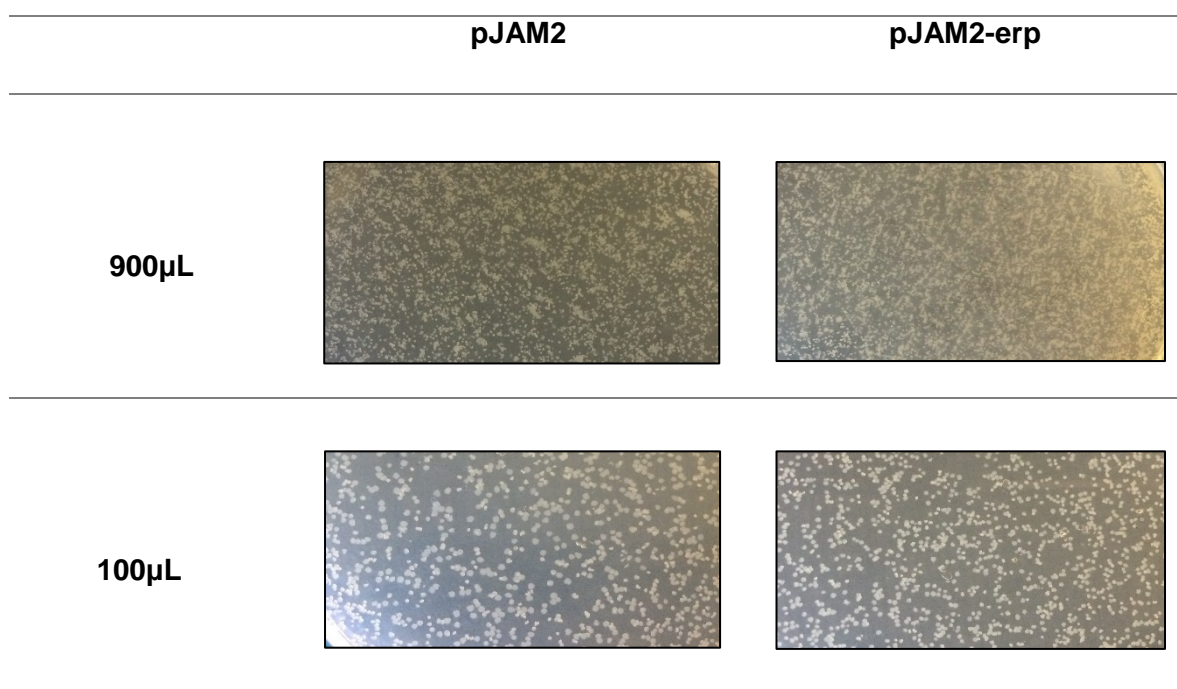


FIGURA 9: Colônias de *M. smegmatis* mc²155 transformadas e cultivadas em placas de LB – ágar, acrescidas de canamicina. As placas de 900µL apresentaram um tapete bacteriano, enquanto nas placas de 100µL é possível observar o

aparecimento de colônias isoladas. O alto número de colônias formadas permite afirmar a ocorrência de uma transformação de alta eficiência.

4.2.2 Extração de proteínas das culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos e induzidas com acetamida

Culturas saturadas de *M. smegmatis* mc²155 portadoras dos plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp, foram utilizadas para inocular 5 mL de meio LB/Tw80™ contendo canamicina (25ug/mL) e Acetamida como substrato indutor, em concentrações de 0,2 e 2%, numa diluição de 1:50, e mantidas à 37°C sob agitação, por 18h. Após a indução, as culturas foram centrifugadas e as proteínas intracelulares e do sobrenadante foram extraídas de acordo com a metodologia anteriormente descrita. As proteínas das frações intracelular (lisado) e secretada (filtrado de cultura) foram visualizadas após a eletroforese em gel SDS-PAGE 12% (Figura 10).

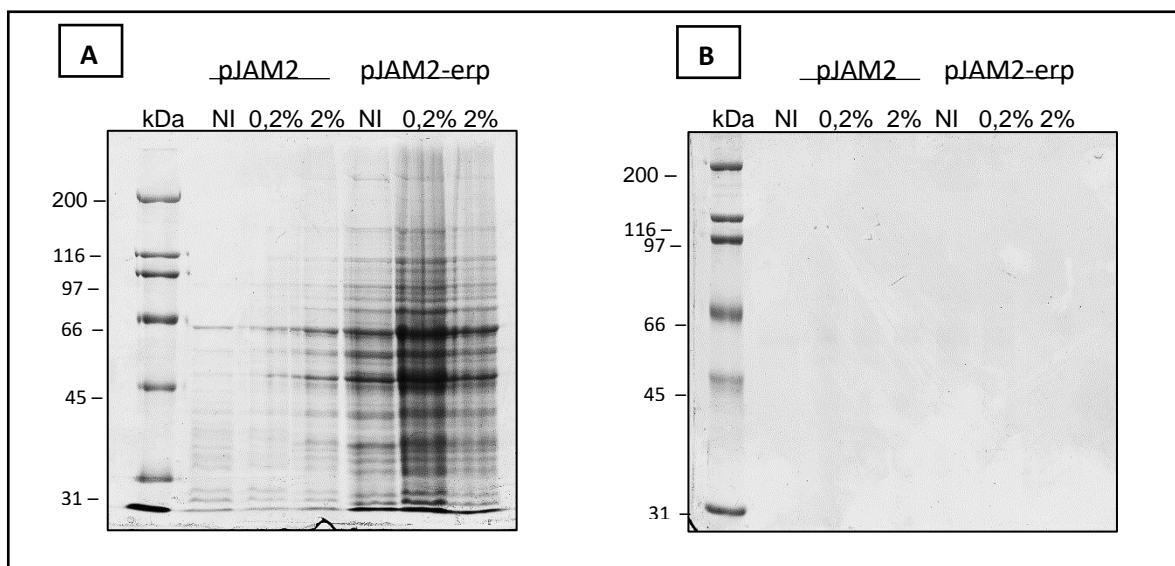


FIGURA 10: Imagem digitalizada a partir dos géis SDS-PAGE 12% corados com CBB-R250 para visualização das proteínas extraídas das culturas induzidas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp. O gel (A) representa as proteínas extraídas do lisado celular. O gel (B) representa as proteínas secretadas precipitadas a partir do filtrado de cultura. Marcador de peso molecular indicado à esquerda, em kDa.

4.2.3 Western blot para detecção das proteínas Erp e Acetamidase

A confirmação da expressão e localização das proteínas obtidas após a extração, a partir das culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp, foi visualizada por western blot com anticorpos específicos.

As proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, de forma a se detectar, com o uso de anticorpos policlonais, a expressão das proteínas de interesse: a proteína codificada pelo operon induzível do vetor (acetamidase) e o fragmento da construção (pJAM2-erp), a proteína 'ERP, secretada. Os anticorpos utilizados foram o α -acetamidase e α -erp, já disponíveis no laboratório.

Uma ligação entre as proteínas e os anticorpos ocorreu em bandas de peso molecular esperado para a acetamidase (47kDa) e Erp (36kDa), indicando sucesso na expressão e obtenção destes peptídeos (Figura 11).

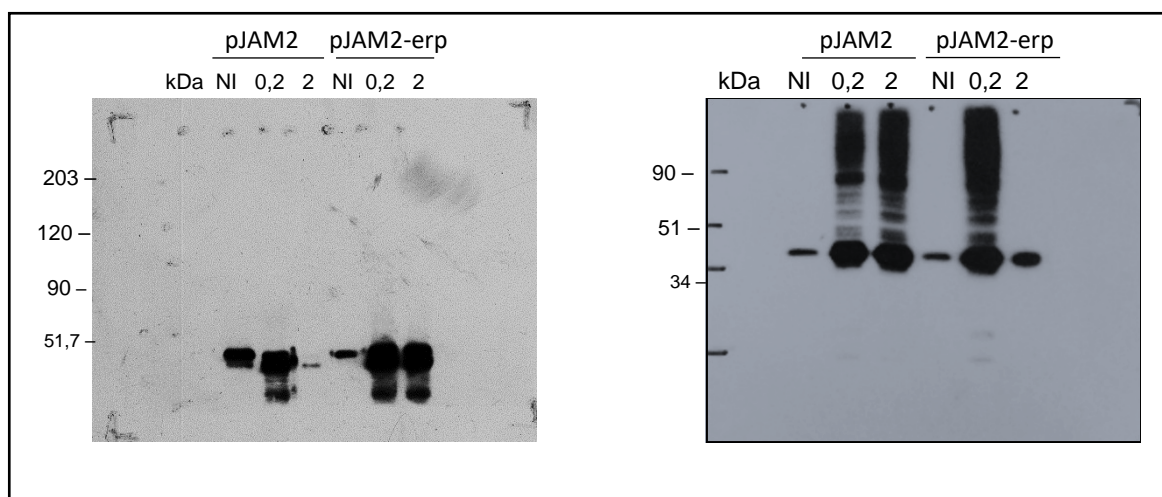


FIGURA 11: Detecção das proteínas Erp (A) e Acetamidase (B) a partir do uso de anticorpos policlonais pela técnica do *Western Blot*. Os resultados apontam para um aumento na concentração de proteínas nas culturas induzidas com relação ao controle (culturas não-induzidas). NI = culturas não induzidas; 0,2 = culturas induzidas em LB-Tw20 0,2% de acetamida; 2 = culturas induzidas em LB-Tw20 2% de acetamida.

4.3 Ensaio de clonagem e nova construção: pJAM2-MPB64

4.3.1 Mapeamento por restrição do DNA plasmidial e visualização a partir de eletroforese em gel de agarose

A digestão com enzima de restrição foi realizada com o objetivo de se obter um mapeamento do DNA plasmidial.

Após a digestão dos plasmídeos com a ER *Bam*HI eram esperadas a visualização de bandas - após eletroforese em gel de agarose 1% - correspondentes ao tamanho entre os sítios de clivagem presentes em cada um dos plasmídeos, sendo eles em pJAM2 equivalente à um fragmento de 9,4kb e em pJAM2-erp, equivalentes à 9.800, 500 e 50bp (Figura 12).

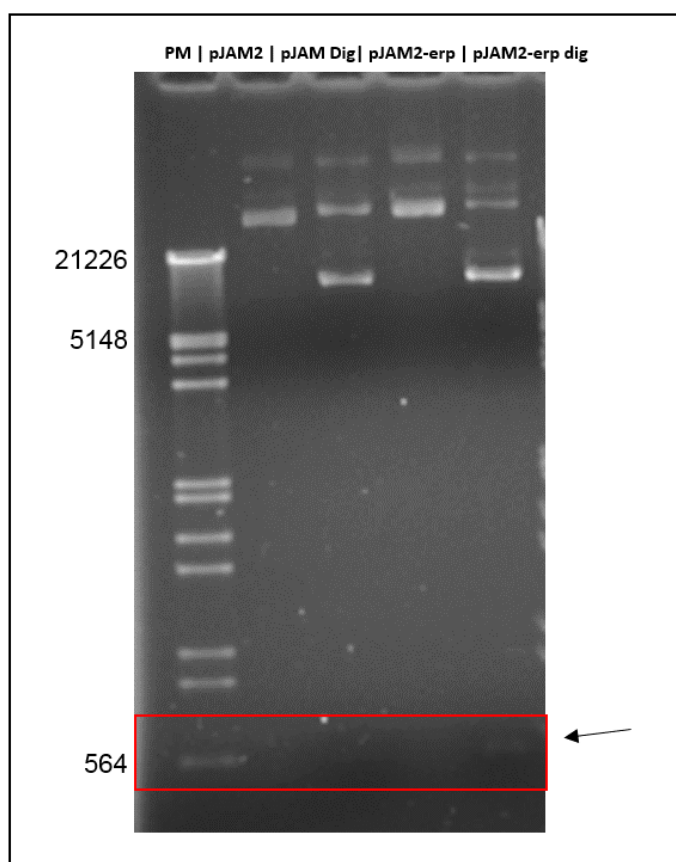


FIGURA 12: Visualização em gel de agarose 1% da digestão dos plasmídeos com *Bam*HI. No primeiro poço observa-se o padrão de peso molecular, seguido pelo

pJAM2 (controle negativo) e pJAM2 digerido com *Bam*HI e pela construção pJAM2-erp (controle negativo) e pJAM2-erp digerido com *Bam*HI. Observa-se no poço da construção digerida a banda de 500 pares de bases (indicada pela seta, dentro da região em vermelho), correspondendo aos sítios internos ao gene *erp* reconhecidos pela enzima *Bam*HI.

4.3.2 Purificação do fragmento MPB64 amplificado por PCR para a clonagem

O fragmento MPB64 foi obtido após uma reação de PCR para amplificação da sua sequência, a partir do DNA genômico extraído da cepa BCG Moreau (Mtb), de modo a se obter o fragmento a ser utilizado para a etapa de ligação no ensaio de clonagem.

Após a reação, o resultado foi visualizado em gel de agarose, sendo o fragmento então purificado para ser digerido com as ERs *Bam*HI e *Xba*I para posterior ocorrência de uma nova purificação e ligação no vetor pJAM2 já digerido com as mesmas enzimas e purificado (Figura14).

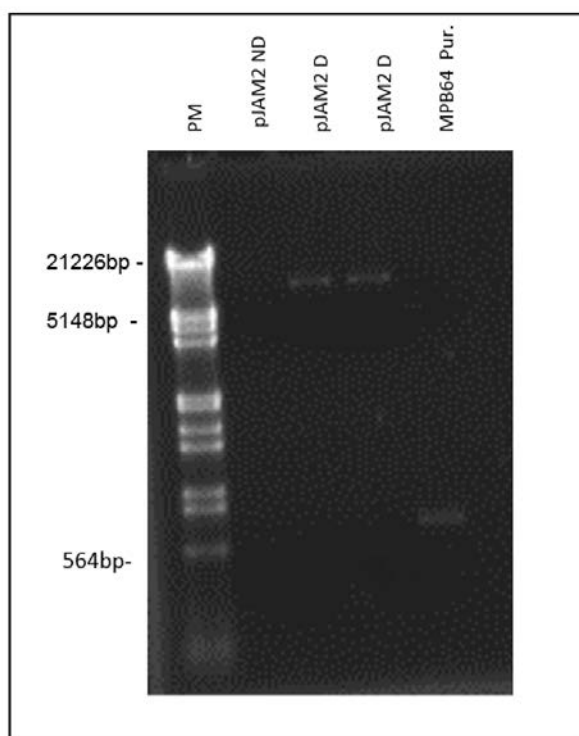


FIGURA 13: Visualização em gel de agarose 1% do plasmídeo pJAM2 digerido (terceiro poço), digerido e purificado (quarto poço) e do fragmento MPB64 obtido por

PCR e purificado. Observa-se as bandas correspondentes ao DNA plasmidial linear formado após a digestão com a enzima BamHI e a banda correspondente ao gene de MPB64, de 618bp.

4.3.3 Ligação entre fragmento (MPB64) e vetor (pJAM2) e transformação de *E. coli* TOP10

O fragmento MPB64 purificado foi então introduzido no vetor pJAM2 – sendo ambos digeridos pelas duas enzimas de restrição e purificados - através da enzima de ligação de DNA T4 ligase. Após a reação, a nova construção foi purificada e utilizada no volume de 1µL para a transformação de *E.coli* TOP10 eletrocompetente.

Um controle da enzima foi realizado a partir da tentativa de religação do plasmídeo digerido apenas com *Bam*HI (ocorrência de apenas um corte no plasmídeo) e o controle da digestão foi realizado a partir da transformação das células com os plasmídeos digeridos, mas não religados. A eficiência da transformação foi obtida através da transformação com o vetor pJAM2.

As células apresentaram uma eficiência de transformação baixa, possuindo 23 colônias na placa contendo 900µL e 7 colônias na placa contendo 100µL da cultura transformada com o plasmídeo (pJAM2) não digerido. As placas contendo a nova construção apresentaram 4 colônias na placa de 900µL e 1 na placa de 100µL. As placas controle da ligação apresentaram resultados inconclusivos.

4.3.4 PCR de colônia

Com o crescimento de colônias nas placas contendo a cultura transformada com a construção pJAM2 – MPB64, foi realizado um PCR de colônia com o objetivo de verificar uma amplificação do fragmento no DNA das culturas retiradas para o ensaio. Entretanto, apesar do crescimento em placa, após a corrida da eletroforese do gel de agarose 1% contendo a reação de PCR, a amplificação desejada não foi observada.

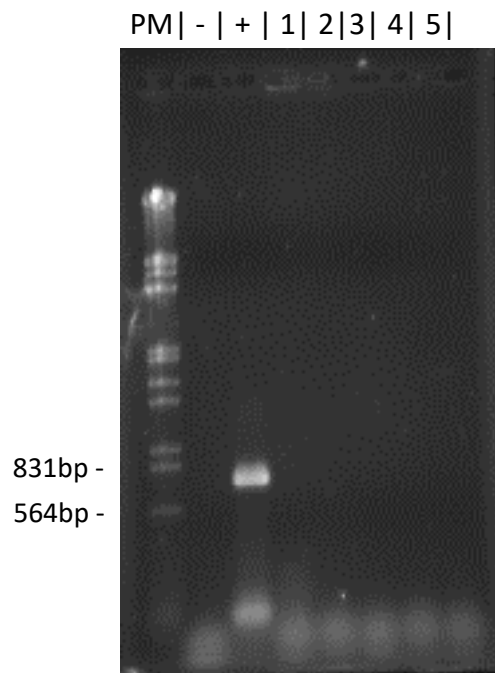


FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose 1% para visualização do PCR de colônia. Um controle negativo (sem DNA) e um positivo (amplificação do fragmento) foram adicionados ao gel, além das 5 colônias obtidas, em sequência após o padrão de peso molecular. Não são observadas bandas na altura do fragmento (618bp) em nenhum dos poços, além da reação positiva. As bandas observadas ao final do gel representam os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.

5. Discussão

Os sistemas de expressão de proteínas heterólogas surgiram como uma importante ferramenta para facilitar a expressão e purificação de quantidades maiores de proteínas normalmente não tão acessíveis, inclusive para o estudo de proteínas pela biologia estrutural (Baeshen *et al.*, 2015).

Estes sistemas de expressão devem ser bem estudados, de forma a garantir uma maior eficiência no processo de obtenção de uma proteína tanto para o estudo científico quanto para o uso biotecnológico como para a produção de biofármacos, por exemplo (Miyake *et al.*, 2007). Entre os sistemas mais utilizadas e bem estudadas, podemos mencionar *E. coli* K12, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, e linhagens celulares eucariotas como baculovírus em linhagem de células de inseto, ou células Vero, Hela e outros.

Cada sistema tem vantagens e desvantagens. Entre estas últimas, mencionamos limitações na secreção de proteínas para o meio extracelular, alto custo e baixo rendimento de cultivo e expressão, capacidade ou não de adicionar modificações pós-traducionais. *E. coli* é o organismo mais acessível e fácil de cultivar, sendo o principal microrganismo utilizado atualmente para a produção de peptídeos heterólogos (Bashiri & Baker, 2014). A utilização de micobactérias ambientais não-tuberculosas como as espécies *M. smegmatis* e *M. vaccae* (Fernandez & Vega, 2013) vem sendo apontada como uma importante opção especialmente para a expressão de genes derivados de Mtb (Bashiri & Baker, 2014), ou para a produção de proteínas com secreção para o meio de cultura.

Nesse sentido, avaliamos o plasmídeo pJAM2 como um possível vetor induzível de expressão de proteínas heterólogas em *M. smegmatis* mc²155. Analisamos a opção do vetor de se estabelecer em cepas de *E. coli* TOP10, de forma a observar o funcionamento da sua origem de replicação para *E. coli* (OriC), além de garantir sua expansão. O alto número de colônias obtidas após a transformação pelo método da eletroporação nas placas contendo LB – ágar acrescido do antibiótico canamicina nos permite afirmar uma alta eficiência de competência e transformação obtida neste processo, e a manutenção satisfatória do plasmídeo em *E. coli* através de seleção com canamicina.

Ao realizar a expansão do DNA plasmidial em *E. coli*, sua extração se torna facilitada, devido à fácil manipulação e a utilização de kits de que garantem um menor tempo no processo.

A transformação da cepa de *M. smegmatis* mc²155 também ocorreu de forma bem sucedida, por meio da eletroporação, a partir da observação da formação de um elevado número de colônias nas placas contendo meio LB – ágar acrescidas com o antibiótico canamicina, confirmando a eletrocompetência, o marcador de seleção e o funcionamento da região correspondente à origem de replicação para micobactérias (OriM).

O sistema promotor e de regulação do operon de amidase foi testado. Uma colônia das micobactérias transformadas foi então escolhida aleatoriamente para a indução com acetamida na concentração de 0,2 e 2% no meio LB - Tw80TM/Kan. Embora a indução da enzima amidase não seja evidente de imediato através da análise visual do gel de separação das proteínas intracelulares, a técnica do *Western Blot* proporcionou a confirmação e visualização da expressão da enzima.

Como a acetamidase é uma enzima intracelular, a sua presença foi detectada principalmente após a extração das proteínas presentes no sedimento das culturas induzidas (massa bacteriana centrifugada), após lise celular.

Uma construção disponível no laboratório contendo o gene codificante para uma proteína normalmente secretada por micobactérias, ERP, clonado no vetor pJAM2 foi utilizada para avaliar a capacidade de indução e secreção em *M. smegmatis*. De fato, a proteína ERP foi visualizada no filtrado de cultura, correspondente à fração das proteínas secretadas e presentes no sobrenadante das culturas de mc²155 induzidas, sendo este filtrado à 0,2µm antes do processo de precipitação.

Uma primeira comparação entre as bandas correspondentes às culturas induzidas e não induzidas permite observar um aumento considerável na quantidade de proteína obtida após indução da expressão. Ensaios de quantificação dessas proteínas seriam necessários para confirmar o fator de aumento alcançável na expressão de acetamidase na presença de acetamida em *M. smegmatis* mc²155 (Parish *et al.*, 1997).

A presença da proteína ERP no sobrenadante corrobora a alta capacidade de secreção de proteínas heterólogas expressas em *M. smegmatis* mc²155 utilizando-se esse sistema induzível.

Tentamos clonar o gene codificante para um outro antígeno secretado de *M. bovis* BCG, MPB64, neste sistema, com o intuito de dirigir a produção deste antígeno, possivelmente útil para o diagnóstico sorológico de infecção por *M. tb*. A análise, por PCR, de colônias na placa contendo *E. coli* TOP10 transformadas com a nova construção pretendida (pJAM2 – MPB64) não apresentou, porém, amplificação do fragmento correspondente ao gene corretamente clonado, indicando que a construção ainda não foi alcançada.

6. Conclusão

Tanto as células de *E. coli* TOP10 quanto as de *M. smegmatis* mc²155 apresentaram uma alta taxa de eletrocompetência e eficiência de transformação utilizando os plasmídeos pJAM2 e pJAM2-erp na transformação. O vetor por sua vez, apresentou uma boa capacidade de indução com o composto acetamida, ao utilizar o promotor da acetamidase em *M. smegmatis* mc²155. Os sinais de secreção do gene *erp* de *M.tb* foram corretamente reconhecidos e processados por *M. smegmatis* levando à secreção da proteína recombinante e sua localização no meio extracelular.

Iniciamos os procedimentos para obtenção da construção pJAM2–MPB64 mas ainda não obtivemos sucesso, sendo necessária uma nova tentativa de ligação entre plasmídeo e fragmento digeridos e purificados.

7. Referências

ADÉKAMBI T. & DRANCOURT M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 54, p. 2095 – 2105, 2004;

BALONI P., PADIADPU J., SINGH A., GUPTA K. R., CHANDRA N. Identifying feasible metabolic routes in *Mycobacterium smegmatis* and possible alterations under diverse nutrient conditions. *BMC Microbiology*. 14:276. 2014

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H., WEZEL, G. P. Van. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n1, p.1 – 43, 2016;

BAESHEN M. N., AL-HEJIN A. M., BORA R. S., AHMED .M .M., RAMADAN H. A. I., SAINI K. S., BAESHEN N. A., REDWAN E. M. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* V. 25, n 7, p 953-962. 2015

BASHIRI, G., BAKER, E. N. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *Protein Science*, v. 24, n. 1, p. 1 – 10, 2015;

BROCK, t. D.; MADIGAN, m. T.; MARTINKO, j. M. *Microbiologia de Brock*. 8ª ed. São Paulo: Prentice Hall. p 734. 1997.

CAREL C, NUKDEE K, CANTALOUBE S, BONNE M, DIAGNE CT, et al. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* Proteins Involved in Mycolic Acid Synthesis and Transport Localize Dynamically to the Old Growing Pole and Septum. *PLoS ONE*, v. 9. Issue 5 e97148.

DAHL J. L., ARORA K., BOSHOF H. I., WHITEFORD D. C., PACHECO S. A., WALSH O. J., BONILLA-LAU D., DAVIS W. B., GARZA A. G. The *relA* Homolog of *Mycobacterium smegmatis* Affects Cell Appearance, Viability and Gene Expression. *Journal of Bacteriology*. V 187, No 7, p 2439 – 2447. 2005;

FERNÁNDEZ, F. J., VEGA, M. C. Technologies to keep an eye on: Alternative hosts for protein production in structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 23, n. 3, p. 365 – 373, 2013;

JAGIELSKI T., INGEN J. V., RASTOGI N., DZIADEK J., MAZUR P. K. BIELECKI J. Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *BioMed Research International*. V 2014, 21 pages. 2014;

KUMAR A., PARKASH O., GIRDHAR B. K. Analysis of Antigens of *Mycobacterium leprae* by Interaction to Sera IgG, IgM and IgA Response to Improve Diagnosis of Leprosy. *BioMed Research International*. V 2014, 10 pages. 2014;

MAHENTHIRALINGAM E., DRAPER P., DAVIS EO, COLSTON MJ. Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol*. V. 139, p. 575–583. 1993;

MANDEWALE, M.C., THORAT, B., SHELKE D., YAMGAR, R. Synthesis and Biological Evaluation of New Hydrazone Derivates of Quinoline and Their Cu(II) and Zn(II) Complexes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. V 2015, ID 153015, 14 páginas. 2015

MARRAKCHI, H., LANÉLLE M-A., DAFFÉ M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Cell Press: Chemistry & Biology Review*. V.21. Issue 1, p 67-85. 2014.

MENDONÇA-LIMA L. DE, PICARDEAU M., RAYNAUD C., RAUZIER J. SALMONIERE Y. O. G DE LA, BARKER L., BIGI F., CATALDI A., GICQUEL B., REYRAT J. M. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria. *Microbiology*. V 147, p 2315-2320. 2001;

MENICHE, X., OTTEN, R., SIEGRIST, M.S., BAER, C.E., MURPHY, K.C., BERTOZZI, C.R., SASSETTI, C.M. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *PNAS*. E3243-E3251. 2014

MIYAKE, R., KAWAMOTO, J., WEI, Y. L., KITAGAWA, M., KATO, I., KURIHARA, T., ESAKI, N. Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the host. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, n. 15, p. 4849 – 4856, 2007;

PARISH T., MAHENTHIRALINGAM E., DRAPER P., DAVIS E. O., COLSTON M. J. Regulation of the inducible acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, V 143, p 2267-2276. 1997;

RASTOGI, N., LEGRAND, E., SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 20, n. 1, p. 21 – 54, 2001.

ROGALL, T., WOLTERS, J., FLOHR, T., BOTTGER, E. C. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Intern Journal of System Bacteriol*, v. 40, n. 4, p. 323 – 330, 1990;

SAMBROOK J., & RUSSELL D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory press. 3a ed. 3o volume, New York, EUA, 2001;

SAVIOLA, B., BISHAI, W. The Genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 24, n. 2, p. 308 – 308, 2006;

SHILOH M. U., CHAMPION. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier. V 13, p 86-92. 2009;

SUNDARARAMAN B., PALANIYANDI K., VENKATESAN A., NARAYANAN S. Expression, purification and functional characterization of *amiA* of acetamidase operon of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiological Research*. V. 169, p 873-880. 2014;

TAMADA Y., KANDA S. YOSHIDOME A., HAYASHI I., MIYAKE M., NISHIYAMA T. Diagnosis of active tuberculosis using MPB64, a specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol*. V. 56, p 740 – 747. 2012;

TELENTI A., MARCHESI F., BALZ M., BALLY F., BOTTGER E. C., & BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase

chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 175 – 178, 1993;

TERPE K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72:211. 2006;

TORTOLI E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microb Reviews*, v. 16, n. 2, p. 319 – 354, 2003;

TRICCAS J. A., PARISH T., BRITTON W. J., GICQUEL B. An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters*. V 167, p 151 – 156, 1998;

VENTURA, M., CANCHAYA, C., TAUCH, A., CHANDRA, G., FITZGERALD, G. F., CHATER, K. F., VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, v. 71, n. 3, p. 495 – 548, 2007;

WILLIAMS & WILKINS. *Bergey's – Manual of systematic bacteriology*. 9^a ed., Baltimore, v. 2, p. 1436 – 1438, 1986;

YAMAGUCHI R., MATSUO K., YAMAZAKI A., ABE C., NAGAI S., TERASAKA K., YAMADA T. Cloning and Characterization of the Gene for Immunogenic Protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*. V. 57, p 283-288. 1989;

8. ANEXOS

8.1 Eletroporação

Meio GYT (Glicerol, Levedura, Triptona)

Glicerol	10 % v/v
Estrato de levedura	0,125 % m/v
Triptona	0,25 % m/v
H ₂ O Mili-Q®	q.s.p. 2,5 mL
Temperatura de estoque	4 °C

Esterilização mediante filtro de 0,22 µm.

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

8.2 Eletroforese em gel de agarose

Tampão de amostra 6X

Aumenta a densidade da amostra, cora e fornece a faixa do movimento constante e previsível do DNA.

Bromofenol azul*	0,25 % m/v
Xileno cianol FF	0,25 % m/v
Glicerol em H ₂ O Mili-Q®	30 % v/v
Temperatura de estoque	4 °C

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

Gel de agarose 1 %

Agarose	3 g
TBE 0,5 X	30 mL
H ₂ O Mili-Q®	q.s.p. 300 mL

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

No preparo do gel, primeiramente deve-se aquecer a solução de agarose preparada, derrama-la em seguida sobre a cama com o pente e deixar esfriar até gelatinizar. A concentração de 1% foi usada baseando-se no tamanho do plasmídeo utilizado.

Tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 10X

Acetato de potássio	60 mM
Tris-HCl	8,3 mM (pH = 7,5)
EDTA	0,04 mM (pH = 8,0)
Etanol	60 % v/v
Temperatura de estoque	TA

A solução de estoque é diluída para uma concentração final 0,5X para ser utilizada como tampão de corrida e diluição da agarose sólida.

Corante de géis brometo de etídio (BEt)

Uma gota do corante é adicionada à 250mL de água MiliQ, a fim de se obter uma concentração de 10mg/mL.

8.3 Extração do DNA plasmidial: Kit *Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega)

Solução de ressuspensão celular

Tris-HCl	50 mM (pH = 7,5)
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/mL

Fonte: *Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Solução de lise celular

NaOH	0,2 M
SDS	1 % v/v

Fonte: *Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Solução neutralizante

Hidrocloreto de guanidina	4,09 M
Acetato de potássio	0,759 M
Ácido acético glacial	2,12 M
pH da solução	4,2

Fonte: *Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Solução da lavagem colunar

Acetato de potássio	60 mM
Tris-HCl	8,3 mM (pH = 7,5)
EDTA	0,04 mM (pH = 8,0)
Etanol	60 % v/v

Fonte: *Wizard® Plus SV Minipreps – DNA purification system* (Promega), 2009.

Todas as soluções são armazenadas à temperatura ambiente.

8.4 Meios de cultura utilizados

Microorganismo	Meio utilizado	Componentes	Uso
<i>E. coli</i> TOP10	LB - líquido	LB líquido	Cultivo para eletroporação
<i>E. coli</i> TOP10 + pJAM2 <i>E. coli</i> TOP10 + pJAM2-erp	LB – líquido + canamicina	LB – líquido + canamicina (25 µg/mL)	Incubação pós-eletroporação (1h)
<i>E. coli</i> TOP10 + pJAM2 <i>E. coli</i> TOP10 + pJAM2-erp	LB – ágar + canamicina	LB – ágar Canamicina 25 µg/mL	Crescimento pós-eletroporação para obtenção de colônias isoladas
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	LB/Tw80™ – líquido	LB – líquido (5mL) + Tw80™ 0,05%	Cultivo para eletroporação
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 + pJAM2 <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 + pJAM2-erp	LB/Tw80™ – líquido + canamicina	LB – líquido (5mL) + Tw80™ 0,05% + canamicina (25 µg/mL)	Incubação pós-eletroporação (4h)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 + pJAM2 <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 + pJAM2-erp	LB – ágar + canamicina	LB – ágar + canamicina (25 µg/mL)	Crescimento pós-eletroporação para obtenção de colônias isoladas

Utilizou-se o monossulfato de canamicina, à 25 µg/mL para *E. coli* e à 50 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155, estocada à 50mg/mL à -20°C. O gene aph (Kan^r) presente

nos plasmídeos utilizados codifica uma proteína que transfere o γ -fosfato do ATP para o grupo hidroxil na 3a posição do pseudosacarídeo da canamicina, inibindo a ação desta sobre o microrganismo (Sambrook & Russell, 2001).

O Tween 80TM (Tw80TM) é um surfactante não iônico e um emulsificante amplamente utilizado. Em culturas líquidas de micobactérias, é utilizado na concentração de 0,05% para impedir a formação de grumos celulares no meio.

Soluções estoque:

Tween 80TM à 20%

Tw 80 TM	8mL
H ₂ O MiliQ	32mL

Filtrar à 0,2 μ m no fluxo. Guardar à 4°C

Acetamida à 20%

Acetamida	8g
H ₂ O MiliQ	40mL

Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-Triptona (Difco [®])	10,0 g/L
Extrato de levedura (Difco [®])	5,0 g/L
NaCl (Merck [®])	10,0 g/L
pH (ajustado com NaOH 5 N)	7,2
Temperatura de estoque	TA

A esterilização ocorre por autoclavação durante 15 minutos à 121 °C. Ao se preparar LB – ágar, adiciona-se 15g de ágar (Difco[®]) em 1000mL de solução LB.

Fonte: Sambrook & Russell, 2001.

8.5 Extração de proteínas

8.5.1 Lise de Micobactérias

Meio HEPES/KOH

HEPES/KOH 50 mM pH 8.0	25mL 0,5M
MgCl ₂ 10mM	2,5mL 1M
NH ₄ Cl 60mM	15mL 1M
Glicerol (v/v) 10%	50mL 50%
H ₂ O MiliQ	Qsp 250mL

0,5M HEPES/KOH pH 7,5 (1000mL)

HEPES	11,9g
H ₂ O MiliQ	70mL

O pH da solução é ajustado para 7.5 com KOH 1N (cerca de 25mL) e, após ser atingido, o volume é completado para 100mL.

1M NH₄Cl:

5,3 NH₄Cl em 100 mL de H₂O MiliQ

1M KOH:

5,6g KOH em 100 mL de H₂O MiliQ

8.5.2 Lise bacteriana

Tampão de lise bacteriana

Tris-HCl pH 7,5	20mM
KCl	100mM
EDTA	5mM

8.6 Soluções utilizadas para géis SDS-PAGE:

Tampão (1X) para aplicação de proteínas em gel SDS-PAGE

Tris-HCl (pH6,8)	62,5 mM
SDS	2%
β -mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,002%
Glicerol	10% (v/v)

Tampão de corrida LaemmLi (5X)

Tris-base	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

Preparo de géis SDS-PAGE:

Gel de separação 12%

Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,5 mL
Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8%	3,0 mL
SDS 10%	60 μ L
APS 10%	60 μ L
TEMED	6 μ L
H ₂ O Milli-Q	qsp 6mL

Gel de empacotamento 4%

Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	0,5 mL
Acrilamida 30% / Bis-Acrilamida 0,8%	0,67 mL
SDS 10%	40 μ L
APS 10%	40 μ L
TEMED	4 μ L
H ₂ O Milli-Q	qsp 4mL

Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250

Etanol P.A	45,5%
Ácido acético glacial	9%
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)	0,2%

Solução descorante

Etanol P.A.	5%
Ácido acético	7,5%

8.7 Soluções utilizadas em *Western Blot*

Tampão TBS (10X)

1M Tris-HCl, pH 7,5	100 mL
NaCl	87g
H ₂ O	qsp 1000 mL

TBS Tw

TBS 10x	100 mL
Tween 20	1mL
H ₂ O	qsp 1000 mL

Bjrrum and Schafer-Nielsen

Composto	10X	1X (uso)
48mM Tris-base	58,2g	5,82g
39mM Glicina	29,3g	2,93g
20% Etanol	-----	200mL
H ₂ O	Qsp 1000mL	Qsp 1000mL

Soluções de anticorpos utilizadas

Componente/ solução	Bloqueio O/N	Anticorpo 1º(α- acetamidase; α-erp)	Anticorpo 2º (α- Mouse)
Leite molico	10%	5%	10%
Lisado de <i>E. coli</i>	-----	500µL	-----
TBS – Tw20	10mL	5mL	5mL
Anticorpo (α)	-----	5µL	5µL

8.8 Tampão utilizado para ressuspender os oligonucleotídeos:

TE 1X:

Tris-Cl pH 8	10mM
EDTA pH8	1mM