

Trabalho

Título em Português: Construção e organização de um banco de vetores

Título em Inglês: Building and organization of a vector bank

Autor: Marco Antonio Gonçalves de Melo Pereira

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Ana Paula Ulian de Araujo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biologia Molecular

Agência Financiadora: USP - Programa Unificado de Bolsas

Construção e organização de um banco de vetores

Marco Antônio Gonçalves de Melo Pereira

Giovanna Christe dos Reis Saladino

Prof. Dr. Italo Augusto Cavini

Profª. Drª. Ana Paula Ulian de Araujo

Universidade de São Paulo - Campus São Carlos

marco.goncalves.pereira@usp.br

Objetivos

- Organização e manutenção do banco físico e *in silico* de vetores plasmidiais do grupo de Biofísica e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos;
- Planejamento e implementação de mudanças moleculares na região promotora T7 e na região TIR em vetores de expressão bacterianos, visando melhores rendimentos.

Métodos e Procedimentos

Banco de Plasmídeos

Os clones do grupo foram obtidos com os pesquisadores, os quais foram submetidos a procedimento de transformação bacteriana em linhagem de propagação DH5 α , competente por CaCl₂ (Ausubel, 2002) e inoculação em 5 mL de meio de cultura LB (incubadas sob agitação a 37 °C, por 16 horas). A extração de DNA plasmidial foi realizada pelo kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep Kit* (Promega) e quantificação em Espectrofotômetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific). Os plasmídeos foram organizados num banco físico, numerados sequencialmente, e vinculados a uma planilha contendo sua descrição e mapas detalhados. Estes mapas foram construídos utilizando a versão gratuita do software *SnapGene*.

Clonagem

Com base nos estudos de evolução sintética realizados por Shilling *et al.* (2020) foram implementadas mutações na região promotora

T7 e na região TIR, uma sequência de ~30 nucleotídeos que contém um espaçador e uma região de interação com ribossomo. As mutações incluem uma inserção de 4 nucleotídeos no sítio promotor T7 e alterações de 12 bases na região TIR. Esse procedimento foi realizado no vetor pET28a-SUMO, a partir das técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ligação por T4 DNA Ligase (Cellco) e transformação em linhagem DH5 α . Os clones positivos foram confirmados por sequenciamento do DNA.

Subclonagem

Para avaliar o impacto das mudanças realizadas no vetor, foi utilizada a sequência de DNA codificante (CDS) da Septina 6 (construção SEPT6 α 0GC), disponível no banco de plasmídeos. Para isso, realizou-se digestão enzimática do vetor doador da CDS, a qual foi inserida no vetor modificado através da ligação com T4 DNA Ligase (Cellco). A construção foi propagada em linhagem de *E. coli* DH5 α . A verificação da subclonagem foi realizada por análise de restrição. O DNA plasmidial do novo vetor contendo a CDS, bem como o vetor de expressão não modificado contendo a mesma CDS (controle) foram usados na transformação de células de expressão e avaliados quanto aos níveis de expressão de SEPT6 α 0GC.

Resultados

Com relação ao banco de plasmídeos, foram adicionados aproximadamente 186 novos

clones, distribuídos tanto entre construções expressando septinas humanas quanto em outros organismos modelo. As adições foram físicas (DNA propagado no banco) e virtuais (mapas e tabelas complementares).

Em relação à construção do novo vetor, o sequenciamento confirmou que a inserção das mudanças no vetor pET28a-SUMO estavam parcialmente corretas. Isto porque somente na região TIR o sequenciamento foi fiel à sequência esperada. Entretanto, na região promotora T7, houve uma duplicação da sequência inserida, o que precisará ser corrigido. Apesar disso, como as duas alterações no plasmídeo foram realizadas de forma independente, foi possível avaliar, preliminarmente, a expressão do vetor com a mudança na região TIR. Abaixo seguem os principais resultados alcançados durante os experimentos.

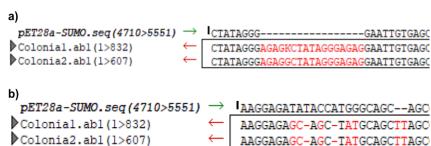


Figura 1. Sequenciamento das regiões a) promotor T7 e b) TIR.

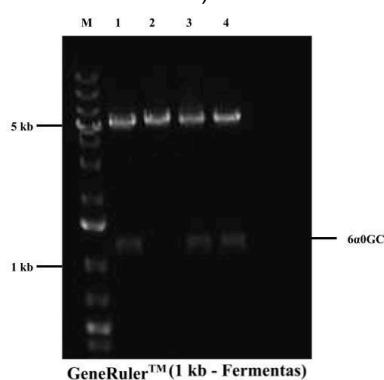


Figura 2. Análise de restrição do produto de ligação da septina 6 no vetor pETSUMO-T2, utilizando *Bam*H1 e *Xba*I. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob transiluminador. M: Marcador GeneRuler 1kb plus (Fermentas); 1 a 4: Digestão do DNA de colônias



Figura 3. Expressão da construção SEPT6 α 0GC. M: Padrão de massa molecular (kDa). 1, 2 e 3: pET28a-SUMO com a modificação na região TIR. 4, 5 e 6: pET28a-SUMO nativo.

Conclusões

Com o trabalho desenvolvido foi possível organizar, padronizar DNAs e mapas de construções incluídos no banco de plasmídeos do Grupo e Biofísica e Biologia Estrutural para todos os usuários, proporcionando fácil e rápido acesso, uma vez que as planilhas e link estão em drive compartilhado. Além disso, um vetor modificado, que potencialmente aumenta a expressão foi construído e está disponível. A avaliação preliminar deste vetor, não mostrou diferença visual na expressão frente ao controle, mas isso precisa ser ainda confirmado em experimentos quantitativos.

Agradecimentos

Meus agradecimentos a toda equipe do grupo de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas” (BBE) e à Universidade de São Paulo pelo financiamento através do Programa Unificado de Bolsas.

Referências

- Ausubel, F. M., et al. 2002. Short protocols in molecular biology, 5th ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Shilling, P.J., et al. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. Commun Biol 3, 214 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>

Building and organization of a vector library

Marco Antônio Gonçalves de Melo Pereira

Giovanna Christe dos Reis Saladino

Prof. Dr. Italo Augusto Cavini

Profª. Drª. Ana Paula Ulian de Araujo

Universidade de São Paulo - Campus São Carlos

marco.goncalves.pereira@usp.br

Objectives

- Organization and maintenance of the physical and *in silico* bank of plasmid vectors of the Biophysics and Structural Biology group at the Institute of Physics of São Carlos;
- Planning and implementation of molecular changes in the T7 promoter region and the TIR region in bacterial expression vectors aiming for better yields.

Materials and Methods

Plasmid Library

The clones from the group were obtained from the researchers and subjected to bacterial transformation in DH5 α strain competent with CaCl₂ (Ausubel 2002) and inoculated in 5 mL of LB culture medium (incubated under agitation at 37 °C for 16 hours). Plasmid DNA extraction was performed using the Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep Kit (Promega) and quantified using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). The plasmids were organized in a physical library sequentially numbered and linked to a spreadsheet containing their description and detailed maps. These maps were created using the free version of the SnapGene software.

Cloning

Based on the synthetic evolution studies conducted by Shilling et al. (2020), mutations

were implemented in the T7 promoter region and the TIR region, a sequence of ~30 nucleotides containing a spacer and a ribosome recognition region. The mutations include a 4-nucleotide insertion in the T7 promoter site and changes of 12 bases in the TIR region. This procedure was performed in the pET28a-SUMO vector using PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques, T4 DNA Ligase (Cellco) ligation, and transformation in DH5 α strain. Positive clones were confirmed by sequencing.

Subcloning

To assess the impact of the changes made to the vector, the coding DNA sequence (CDS) of Septin 6 (SEPT6 α 0GC construct), available in the plasmid library, was used. The donor vector containing the CDS was enzymatically digested, and the CDS was inserted into the modified vector through ligation using T4 DNA Ligase (Cellco). The construct was propagated in *E. coli* DH5 α strain. Subcloning verification was performed by restriction analysis. Plasmid DNA from the new vector containing the CDS and the unmodified expression vector containing the same CDS were used in the transformation of expression cells and evaluated for SEPT6 α 0GC expression levels.

Results

Approximately 186 new clones were added to the plasmid library, distributed between human septins and other model organisms studied by

the group. Additions included both physical (propagated DNA in the library) and virtual (maps and complementary tables) entries.

Regarding the construction of the new vector, sequencing confirmed that the insertion of changes into the pET28a-SUMO vector was partially correct. Specifically, in the TIR region, the sequencing accurately reflected the expected sequence. However, in the T7 promoter region, there was a duplication of the inserted sequence, which will need to be corrected. Despite this, since the two alterations in the plasmid were made independently, it was possible to preliminarily assess the expression of the vector with the modification in the TIR region. Below are the main results achieved during the experiments.

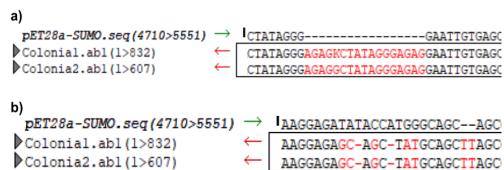


Figure 1. Sequencing of regions a) T7 promoter and b) TIR.

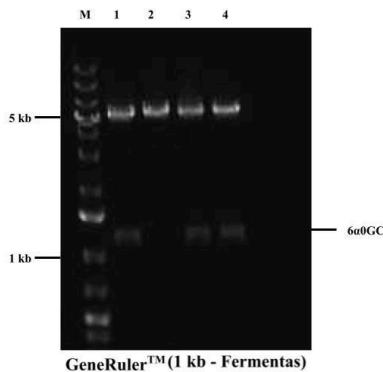


Figure 2. Restriction analysis of Septin 6 ligation product in the pETSUMO-T2 vector using BamHI and Xhol. Agarose gel electrophoresis (0.8%) stained with ethidium bromide and visualized under a transilluminator. M: GeneRuler 1kb plus marker (Fermentas); 1 to 4: Digestion of DNA from transforming colonies.

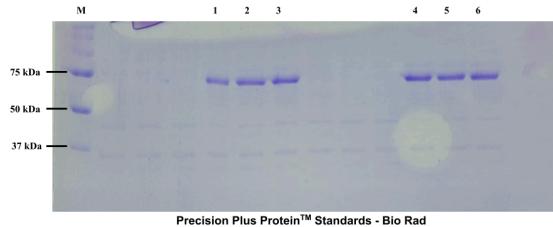


Figure 3. Expression of septin 6 in the vector pET28a-SUMO. M: Molecular mass standard (kDa). 1, 2 and 3: pET28a-SUMO with the modification in the TIR region. 4, 5 and 6: pET28a-native SUMO.

Conclusions

With the work developed, it was possible to organize and standardize DNAs and construction maps included in the plasmid library of the Biophysics and Structural Biology Group for all users, providing easy and fast access, as the spreadsheets and links are available on a shared drive. Additionally, a modified vector, which potentially increases expression, was constructed and is available. Preliminary evaluation of this vector did not show any visible difference in expression compared to the control, but this still needs to be confirmed through quantitative experiments.

Acknowledgements

My thanks to the entire team of the "Sérgio Mascarenhas" Biophysics and Structural Biology group (BBE).

My thanks to the University of São Paulo for funding through the Unified Scholarship Program.

References

- Ausubel F. M. et al. 2002. Short protocols in molecular biology 5th ed. John Wiley & Sons New York NY.
- Shilling P.J. et al. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. Commun Biol 3, 214 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>