

# CLONAGEM E EXPRESSÃO DA ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *Bacillus subtilis* PARA REALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE SUA ATIVIDADE REDUTIVA

Leandro Bertacchini de Oliveira

Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos

leandrobertacchini@usp.br

## Objetivos

Clonar e expressar a enzima álcool desidrogenase de *B. subtilis* em *E. coli*, utilizando o vetor pET-28a(+), com o objetivo de alcançar altos níveis de expressão da proteína estruturada e isolada, necessária aos ensaios de sua atividade redutora.

## Métodos e Procedimentos

Foram realizados os processos de transformação, expressão e isolamento da proteína de interesse a partir de duas cepas de *E. coli*, a fim de avaliar o rendimento da fração solúvel, obtida a partir da propagação e expressão do vetor recombinante em diferentes temperaturas, tempos de indução e meios nutritivos. A avaliação dos resultados foi baseada na análise por eletroforese nativa e SDS-PAGE, e o isolamento foi feito por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Uma vez isolada com bom rendimento, a proteína de interesse será avaliada, por meio de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano, e por ensaios enzimáticos para análise de sua atividade redutiva, utilizando espectroscopia UV-Vis.

## Resultados

Foram realizadas a transformação, propagação e ensaios de expressão e purificação da álcool desidrogenase em células competentes de *E. coli* das linhagens BL21(DE3) e pG-KJE8(BL21) chaperona-competente, na tentativa de propiciar o enovelamento assistido de proteínas [1]. Foram utilizados meios LB e

*Super Optimal Broth* (SOB) sob diversas temperaturas e tempos de indução, os quais não apresentaram resultados promissores quanto à produção da enzima-na fração solúvel do lisado. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a fração insolúvel, onde a proteína foi superexpressa a partir da linhagem BL21(DE3) em meio SOB, a 37°C por um período de 5h. Para solubilizá-la e promover seu reenovelamento, foi utilizado o protocolo estabelecido por He e Ohnishi [2], capaz de render altas concentrações de proteína, a qual foi submetida à cromatografia de afinidade ao níquel.

## Conclusões

Encontrada a condição ideal para a expressão heteróloga da álcool desidrogenase de *B. subtilis*, foi possível a obtenção da proteína por reenovelamento e purificação, utilizando um protocolo simples e eficiente. A proteína será submetida aos ensaios de espectroscopia para avaliação de sua estrutura tridimensional, bem como análise funcional a partir da atividade redutora intrínseca da álcool desidrogenase.

## Referências Bibliográficas

- [1] A. I, Grigorouds et al. Efficient soluble expression of active recombinant human cyclin A2 mediated by *E. coli* molecular chaperones. **Protein expression and purification**, 113, 8-16, 2015.
- [2] He, C.; Ohnishi, K. Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 490, 1250-1253, 2017.