

Trabalho



Título em Português:	Expressão heteróloga da álcool desidrogenase de Bacillus subtilis e análise da sua atividade intrínseca
Título em Inglês:	Heterologous expression of alcohol dehydrogenase from Bacillus subtilis and analysis of its intrinsic activity
Autor:	Eduardo Oetting Utiyama
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Química de São Carlos
Orientador:	Fernanda Canduri
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biologia Molecular
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas



EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ÁLCOOL DESIDROGENASE DE *BACILLUS SUBTILIS* E ANÁLISE DA SUA ATIVIDADE INTÍNSECA

Eduardo Oetting Utiyama

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Canduri

Colaborador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos

eduardo.utyama@usp.br

Objetivos

(1) Produção da Álcool desidrogenase de *Bacillus subtilis* em sistema de *E. coli* BL21(DE3) e obtenção de sua forma solúvel; (2) Utilização da ADH heteróloga para ensaios de conversão de cetonas, e análise em cromatografia gasosa; (3) Familiarização do aluno com os equipamentos e técnicas empregadas no projeto, assim como aprendizado teórico sobre produção científica.

Métodos e Procedimentos

Clonagem e Transformação: Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pET28a-adh. As células foram submetidas a um choque térmico, sendo transferidas para banho térmico a 42°C por 2 minutos e depois para banho de gelo. Após a transformação, as células foram aplicadas em placas de Petri contendo meio LB-água com o antibiótico canamicina.

Expressão da Proteína: Uma colônia isolada foi usada para iniciar uma cultura em meio líquido. A expressão da ADH foi induzida pela adição de IPTG na concentração de 0,4 mmol/L quando a cultura atingiu uma densidade óptica entre 0,8 e 1,0. A cultura foi então incubada por

18 a 20 horas a 25°C. Ao final, o inóculo foi centrifugado e o pellet, pesado e armazenado a -20°C.

Lise Bacteriana e Purificação: O pellet foi ressuscitado em tampão de lise e submetido à lise química com lisozima e DNase, seguido de lise física por sonicação em 10 ciclos de 30 seg. *on* e 60 seg. *off*. A purificação da proteína solúvel foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) no equipamento AKTA PURE (GE), utilizando uma coluna HisTrap HP 5 ml carregada com níquel. A eluição foi feita com um gradiente de tampão contendo imidazol (0 – 100%).

Análise e Verificação:

- **SDS-PAGE:** Para avaliar a expressão e a purificação, amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R.

Otimização e Estratégias Adotadas: Ao todo, foram realizadas oito testes de expressão, nas quais mudanças foram feitas com o objetivo de acurar o protocolo inicial. Diante da dificuldade em obter a proteína, justificou-se a decisão de trocar o vetor de clonagem do pET28a para o pET-Sumo, passando por etapas de amplificação por PCR, digestão com enzimas de restrição e reação de ligação.

PCR e Gel de Agarose: Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi utilizada a enzima *pfu* DNA polimerase. A análise dos

produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Resultados

A análise dos experimentos foi realizada em ordem cronológica, com as seguintes observações e conclusões:

1ª Expressão: O experimento apresentou um resultado positivo, com uma banda de superexpressão em alta concentração proteica observada no sobrenadante, abaixo do marcador de 45 kDa (Fig. 1), o que pode indicar a presença da ADH heteróloga (massa molecular de ~42 kDa). No pellet, não houve banda de superexpressão.

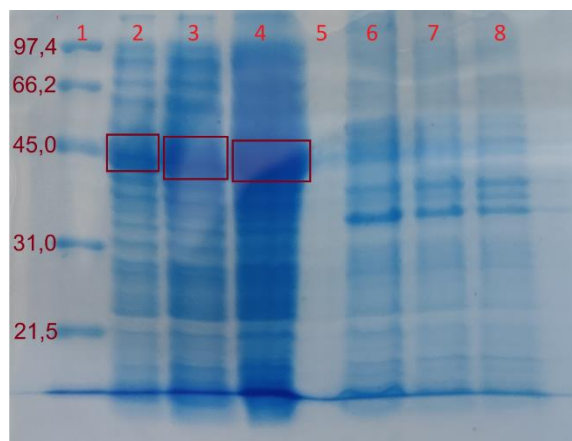


Figura 1: (1) Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo); (2), (3) e (4) Sobrenadante em diluições (uL) 4/20, 8/20 e 16/20; (5) vazio; (6), (7), (8) pellet em diluições (uL) 8/20, 4/20 e 2/20; os retângulos em vermelho indicam as bandas de superexpressão com massa molecular similar à ADH de *B. subtilis* (42 kDa).

2ª Expressão e Purificação em HPLC:

- **Resultado da expressão:** A segunda expressão confirmou o resultado anterior, apresentando novamente a banda de superexpressão.

- **Purificação:** A purificação em HPLC não ocorreu como esperado. Inferiu-se que havia contaminantes no interior da coluna que foram eluídos com a amostra. Além disso, a banda de

superexpressão continuou presente no *flow-through*, indicando que a ADH heteróloga pode não ter se ligado de maneira eficaz à coluna.

- **Aplicações subsequentes:** Uma segunda e terceira aplicação da amostra na coluna de HPLC foram realizadas. Na terceira tentativa, foi adicionado SDS 2% para desnaturar a proteína e expor a cauda de histidina, porém, a tentativa foi pouco eficiente.

3ª e 4ª Expressões: Na terceira expressão, a presença de contaminantes se manteve, e inferiu-se que a coluna estava contaminada ou com baixo teor de níquel. Na quarta expressão, a coluna foi limpa e recarregada com cobalto, mas notou-se que as bandas de superexpressão, antes obtidas na 1ª e 2ª expressão, não estavam mais presentes. A melhor explicação para isso foi a mudança das células de *E. coli* utilizadas.

5ª à 7ª Expressões:

- Na quinta expressão, mesmo retornando ao uso das células antigas, não foi possível obter bandas de superexpressão.

- Na sexta e sétima expressões, também não foram observadas bandas de superexpressão, e decidiu-se por trocar o vetor de expressão, do pET28a para o pET-Sumo.

Troca de Vetor de Expressão: Foram realizadas três tentativas de amplificar o gene da ADH por PCR e digeri-lo com enzimas de restrição para inserção no novo vetor. Embora o PCR tenha funcionado em duas das tentativas, o produto da digestão apresentou arraste ou baixa quantidade de DNA no gel de agarose, tornando a amostra inadequada para prosseguir para a etapa de ligação.

8ª Expressão: Utilizou-se um estoque de DNA antigo do plasmídeo pET28a-adh, armazenado desde 2012. No entanto, não houve banda de superexpressão, e o padrão de bandas foi similar aos resultados negativos anteriores, não sendo possível obter a ADH heteróloga.

Conclusões

Pelos resultados obtidos, não foi possível avançar para etapas de análise. Houve dificuldades durante as etapas de amplificação

e digestão do plasmídeo, assim como na produção da proteína ADH recombinante. É necessário, neste caso rever os procedimentos adotados, assim como os reagentes e protocolos utilizados para futuros estudos.

Entretanto, os experimentos realizados durante o primeiro semestre foram de suma importância para o aprendizado, assim como para a familiarização com os equipamentos usados em laboratório. Durante esse período foi possível manejar e entender o funcionamento de aparelhos como: Espectrofotômetro, Shakers, sonificadores, centrífugas, autoclaves, fluxo laminar, HPLC Akta pure. Houve também melhora significativa da destreza no preparo de soluções, géis de SDS-PAGE, géis de agarose, digestão de plasmídeos recombinantes, PCR, purificação de DNA por Miniprep, assim como manejo de vidrarias. Tirou-se, também, grande proveito dos conselhos e aprendizados obtidos através da orientação de todos os membros do laboratório.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos (opcional)

Agradeço a:

Profa. Dra. Fernanda Canduri, pela oportunidade e pelo apoio.

A Doutoranda Jessyka Lima Santos, que me ensinou com paciência e clareza.

Ao Doutorando Leandro Bertacchini de Oliveira, pelo tempo e dedicação em me ajudar.

Referências

Araujo, Y. J. K. **Enzimas na biocatálise (Esterificação de aminas, adição de Michael, clonagem e expressão de álcool desidrogenase)**. 2012. Tese (doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Worthington Biochemical Corporation (2024). **Alcohol dehydrogenase**. Disponível em: <https://www.worthingtonbiochem.com/products/alcohol-dehydrogenase/manual>. Acesso em: 17 de junho 2024.

Nelson, D.L., Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 8a edição, 2022. Editora Artmed.

Nishimura, M. **Protein Expr Purif**. 89(1):109-15, 2013.

Moszer, I., Kunst, F., Danchin A. **Microbiology (Reading)**. 142 (Pt 11):2987-91, 1996.

Mouad, A., Martins, M., Deboni, H., de Oliveira, A., de Felicio, R., Yokoya, N., Fujii, M., de Menezes, C., Fantinatti-Garboggini, F., & Porto, A. **Helvetica Chimica Acta**, 94(8):1506–1514, 2011. 13

Voet, D., Voet, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

Zhou, J., Han, T., Ahmad, S., Quinn, D., Moody, T.S., Wu, Q., Huang, M. **Phys Chem Chem Phys**, 22;25(45):31292-31300, 2023.



HETEROLOGOUS EXPRESSION OF ALCOHOL DEHYDROGENASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* AND ANALYSIS OF ITS INTRINSIC ACTIVITY

Eduardo Oetting Uttyama

Advisor: Prof. Dra. Fernanda Canduri

Collaborator: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

University of São Paulo – Institute of Chemistry of São Carlos

eduardo.uttyama@usp.br

Objectives

(1) Production of Alcohol dehydrogenase from *Bacillus subtilis* in an *E. coli* BL21(DE3) system and obtaining its soluble form; (2) Utilization of the heterologous ADH for ketone conversion assays and analysis by gas chromatography; (3) Familiarization of the student with the equipment and techniques used in the project, as well as theoretical learning about scientific production.

Methods and Procedures

Cloning and Transformation: Competent *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with the pET28a-adh plasmid. The cells were subjected to a heat shock, being transferred to a 42°C water bath for 2 minutes and then to an ice bath. After transformation, the cells were plated on Petri dishes containing LB-agar medium with the antibiotic kanamycin.

Protein Expression: An isolated colony was used to start a liquid culture. ADH expression was induced by the addition of IPTG at a concentration of 0.4 mmol/L when the culture reached an optical density between 0.8 and 1.0. The culture was then incubated for 18 to 20 hours at 25°C. At the end, the inoculum was

centrifuged, and the pellet was weighed and stored at -20°C.

Bacterial Lysis and Purification: The pellet was resuspended in lysis buffer and subjected to chemical lysis with lysozyme and DNase, followed by physical lysis by sonication in 10 cycles of 30 sec. on and 60 sec. off. The purification of the soluble protein was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an AKTA PURE (GE) system, using a HisTrap HP 5 ml column charged with nickel. Elution was performed with a gradient of buffer containing imidazole (0–100%).

Analysis and Verification:

- **SDS-PAGE:** To evaluate the expression and purification, samples were applied to a 15% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R.

Optimization and Strategies Adopted: A total of eight expression tests were performed, in which changes were made with the aim of refining the initial protocol. Given the difficulty in obtaining the protein, the decision was made to change the cloning vector from pET28a to pET-Sumo, involving steps of PCR amplification, digestion with restriction enzymes, and ligation reaction.

PCR and Agarose Gel: For the Polymerase Chain Reaction (PCR), the *pfu* DNA polymerase

enzyme was used. The analysis of the PCR products was done by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

Results

The analysis of the experiments was carried out in chronological order, with the following observations and conclusions:

1st Expression: The experiment showed a positive result, with a super-expression band at a high protein concentration observed in the supernatant, below the 45 kDa marker (Fig. 1), which may indicate the presence of heterologous ADH (molecular mass of ~42 kDa). In the pellet, there was no super-expression band.

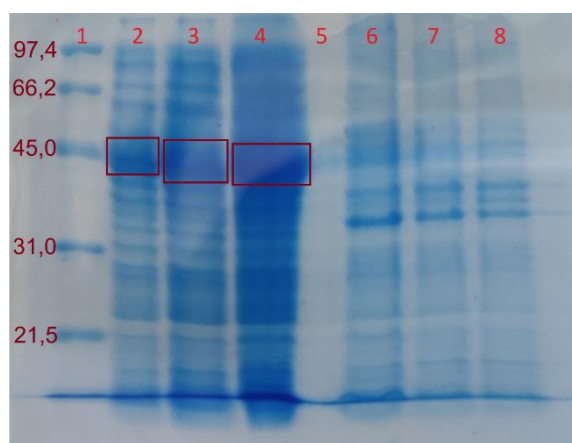


Figure 1: (1) Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo); (2), (3), and (4) Supernatant in dilutions (μL) 4/20, 8/20, and 16/20; (5) empty; (6), (7), (8) pellet in dilutions (μL) 8/20, 4/20, and 2/20; the red rectangles indicate the super-expression bands with a molecular mass similar to that of *B. subtilis* ADH (42 kDa)

2nd Expression and HPLC Purification:

Expression result: The second expression confirmed the previous result, again showing the super-expression band.

Purification: The HPLC purification did not proceed as expected. It was inferred that there were contaminants inside the column that were eluted with the sample. Furthermore, the super-

expression band was still present in the flow-through, indicating that the heterologous ADH may not have bound effectively to the column.

- Subsequent applications: A second and third application of the sample to the HPLC column were performed. In the third attempt, 2% SDS was added to denature the protein and expose the histidine tail; however, the attempt was not very efficient.

3rd and 4th Expressions: In the third expression, the presence of contaminants persisted, and it was inferred that the column was contaminated or had a low nickel content. In the fourth expression, the column was cleaned and recharged with cobalt, but it was noted that the super-expression bands, previously obtained in the 1st and 2nd expressions, were no longer present. The best explanation for this was the change of the

E. coli cells used.

5th to 7th Expressions:

- In the fifth expression, even after returning to the use of the old cells, it was not possible to obtain super-expression bands.

- In the sixth and seventh expressions, no super-expression bands were observed either, and it was decided to change the expression vector from pET28a to pET-sumo.

Change of Expression Vector: Three attempts were made to amplify the ADH gene by PCR and digest it with restriction enzymes for insertion into the new vector. Although the PCR worked in two of the attempts, the digestion product showed smearing or a low amount of DNA on the agarose gel, making the sample unsuitable to proceed to the ligation step.

8th Expression: An old DNA stock of the pET28a-adh plasmid, stored since 2012, was used. However, there was no super-expression band, and the band pattern was similar to previous negative results, making it impossible to obtain the heterologous ADH.

Conclusions

Based on the results obtained, it was not possible to advance to the analysis stages. There were difficulties during the plasmid

amplification and digestion steps, as well as in the production of the recombinant ADH protein. In this case, it is necessary to review the procedures adopted, as well as the reagents and protocols used for future studies.

However, the experiments carried out during the first semester were of utmost importance for learning, as well as for familiarization with the equipment used in the laboratory. During this period, it was possible to handle and understand the operation of devices such as: Spectrophotometer, shakers, sonicators, centrifuges, autoclaves, laminar flow hoods, and HPLC Akta pure. There was also a significant improvement in dexterity in preparing solutions, SDS-PAGE gels, agarose gels, digestion of recombinant plasmids, PCR, DNA purification by Miniprep, as well as glassware handling. Great benefit was also derived from the advice and lessons learned through the guidance of all laboratory members.

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

I thank:

Prof. Dr. Fernanda Canduri, for the opportunity and support.

PhD student Jessyka Lima Santos, who taught me with patience and clarity.

PhD student Leandro Bertacchini de Oliveira, for his teachings and dedication to me. judar.

References

Araujo, Y. J. K. **Enzimas na biocatálise (Esterificação de aminas, adição de Michael, clonagem e expressão de álcool desidrogenase)**. 2012. Tese (doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Worthington Biochemical Corporation (2024). **Alcohol dehydrogenase**. Disponível em: <http>

<s://www.worthington>

biochem.com/products/alcohol

dehydrogenase/manual. Acesso em: 17 de junho 2024.

Nelson, D.L., Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 8a edição, 2022. Editora Artmed.

Nishimura, M. **Protein Expr Purif**. 89(1):109-15, 2013.

Moszer, I., Kunst, F., Danchin A. **Microbiology (Reading)**. 142 (Pt 11):2987-91, 1996.

Mouad, A., Martins, M., Debonisi, H., de Oliveira, A., de Felicio, R., Yokoya, N., Fujii, M., de Menezes, C., Fantinatti-Garboggini, F., & Porto, A. **Helvetica Chimica Acta**, 94(8):1506–1514, 2011. 13

Voet, D., Voet, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

Zhou, J., Han, T., Ahmad, S., Quinn, D., Moody, T.S., Wu, Q., Huang, M. **Phys Chem Chem Phys**, 22;25(45):31292-31300, 2023.