

## PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FORMA RECOMBINANTE DAS ENZIMAS HISF E HISH DE *Thermotoga maritima*

Livia Ranieri Esteves dos Santos

Sandro Roberto Marana

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – Brazil

[ranieriliv@usp.br](mailto:ranieriliv@usp.br)

### Objetivos

Producir separadamente as enzimas HisH e HisF de *Thermatoga maritima* como proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, empregando estas bactérias extrair as HisH e HisF recombinantes e purificá-las. Finalmente, detectar a formação do complexo IGPS de *T. maritima* (heterodímero HisF-HisH) por meio de espectros de fluorescência intrínseca de triptofanos.

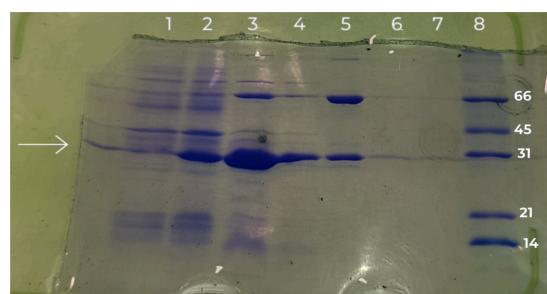
### Materiais e métodos

HisF e HisH foram produzidas isoladamente, utilizando os mesmos processos, exceto pela mudança do plasmídeo pET28a contendo a sequência de nucleotídeos de cada proteína. Para a expressão e purificação das enzimas recombinantes HisF selvagem (WT) e HisH selvagem (WT) foram usados os procedimentos: Transformação de bactérias *E. coli* competentes com plasmídeos pET28a que contém a sequência que codifica a proteína recombinante HisF WT e, posteriormente, HisH WT através de choque térmico. As colônias crescem por 18 horas a 37°C em meio LB-ágar com canamicina. Com uma colônia, um pré-inóculo em meio LB e canamicina é cultivado por 16 horas a 37°C e 150 rpm. O inóculo é gerado pelo cultivo do pré-inóculo em um grande volume de LB com canamicina a 37°C e 180 rpm até atingir 0,5-1 OD. A partir disso, IPTG é adicionado para induzir a expressão da proteína recombinante. A mistura

resultante é incubada a 30°C e 180 rpm por 16 horas. A cultura é centrifugada para obter as bactérias, as quais são lisadas por sonicação e tratamento de calor de 70°C por 20 minutos. O lisado clarificado resultante é incubado em resina Ni-NTA para purificação da proteína recombinante com tag His<sub>6x</sub>. Uma vez que a verificação por SDS-PAGE é feita, a detecção da formação do complexo IGPS é detectada por monitoramento em fluorímetro.

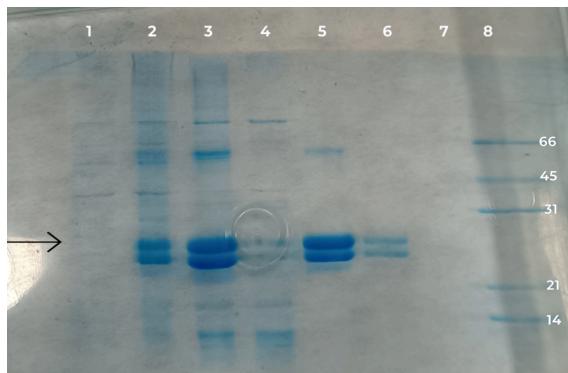
### Resultados

A expressão e purificação da HisF WT e HisH WT foram feitas e cada etapa foi analisada por SDS-PAGE (Fig. 1, 2)

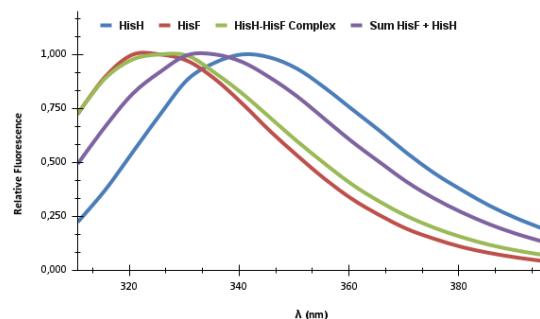


**Fig. 1:** Gel de SDS-PAGE resultante de eletroforese com amostra de todas as etapas de produção e purificação por afinidade da proteína HisF. A seta aponta o peso molecular da HisF WT. Da esquerda para a direita temos as seguintes amostras: (1) *E. coli* BL21DE3

com plasmídeo antes da indução da expressão por IPTG; (2) após a indução por IPTG; (3) lisado clarificado; (4) Flow through; (5) eluição 1 (E1) da cromatografia de afinidade; (6) eluição 2 (E2); (7) eluição 3 (E3); (8) padrão de peso molecular (kDa). Fonte: autoria própria.



**Fig. 2:** Gel de SDS-PAGE resultante de eletroforese com amostra de todas as etapas de produção e purificação por afinidade da proteína HisH. A seta aponta o peso molecular da HisF WT. Da esquerda para a direita temos as seguintes amostras: (1) *E. coli* BL21 DE3 com plasmídeo antes da indução da expressão por IPTG; (2) após a indução por IPTG; (3) lisado clarificado; (4) Flow through; (5) eluição 1 (E1) da cromatografia de afinidade; (6) eluição 2 (E2); (7) eluição 3 (E3); (8) padrão de peso molecular (kDa). Fonte: autoria própria.



**Fig. 3:** Espectros de fluorescência de HisF e HisH isoladas, do complexo Hisf-HisH e da soma dos dados individuais de HisF e HisH. Fonte: autoria própria.

É possível observar a diferença entre os picos de fluorescência entre as amostras, indicando a formação do complexo<sup>[1]</sup>

## Conclusões

HisF WT e HisH WT foram expressas e purificadas com sucesso, além de serem capazes de formar o complexo IGPS.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer à CNPq pelo financiamento através do concedimento da bolsa de iniciação científica, à FAPESP pelo financiamento do projeto CEPID B3 e ao meu orientador, Sandro Roberto Marana, pelo seu tempo, orientação, dedicação e compreensão.

## Referências

- [1] Almeida VM, Loria JP, Marana SR (2022) A simple method to determine changes in the affinity between HisF and HisH in the Imidazole Glycerol Phosphate Synthase heterodimer. PLoS ONE 17(4): e0267536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267536>