

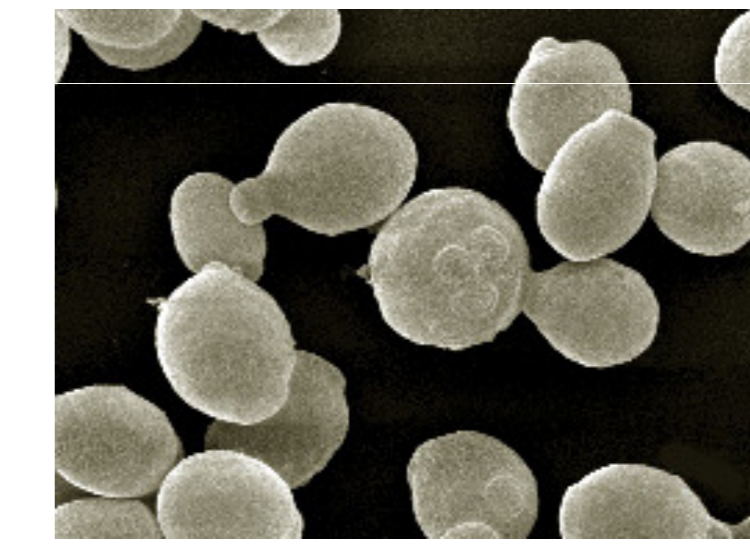


Dantas, L. E. C.; de Oliveira, L. G.

LabiComb - Departamento de Química Orgânica  
Instituto de Química - UNICAMP

E-mail: larissaecd@hotmail.com

Palavras-Chave: clonagem, expressão, epóxido hidrolase



## Introdução

A demanda por fármacos que possam ser produzidos como único enantiômero vem crescendo consideravelmente para se alcançar os padrões impostos pela US Food and Drug Administration (FDA).

Os requerimentos para a síntese de compostos opticamente ativos podem ser alcançados via catálise química assimétrica utilizando, por exemplo, catalisadores de metais de transição ou por biocatálise com a aplicação de enzimas. Um grande número de sistemas de triagem enzimática tem sido utilizados para detectar atividades catalíticas para aplicação em reações enantiosseletivas.

Os métodos de evolução dirigida vem sendo utilizados para produzir enzimas com especificidade modificada com relação a substratos naturais ou artificiais, para gerar termoestabilidade e aumentar a estabilidade e resistência a solventes orgânicos. As hidrolases tem um papel de destaque englobando 44% dos processos, seguidas dos biocatalisadores redox (30%).

## Objetivos

O objetivo deste projeto foi clonar e expressar o gene SEH associado à produção da enzima epóxido hidrolase, isolado da linhagem *Pichia stipitis* CBS 6054, em *P. pastoris* X-33, passando por *E. coli*. O sistema de expressão usado foi o vetor pPICZαA.

## Material e Métodos

### Condições adotadas para amplificação do gene SEH por PCR

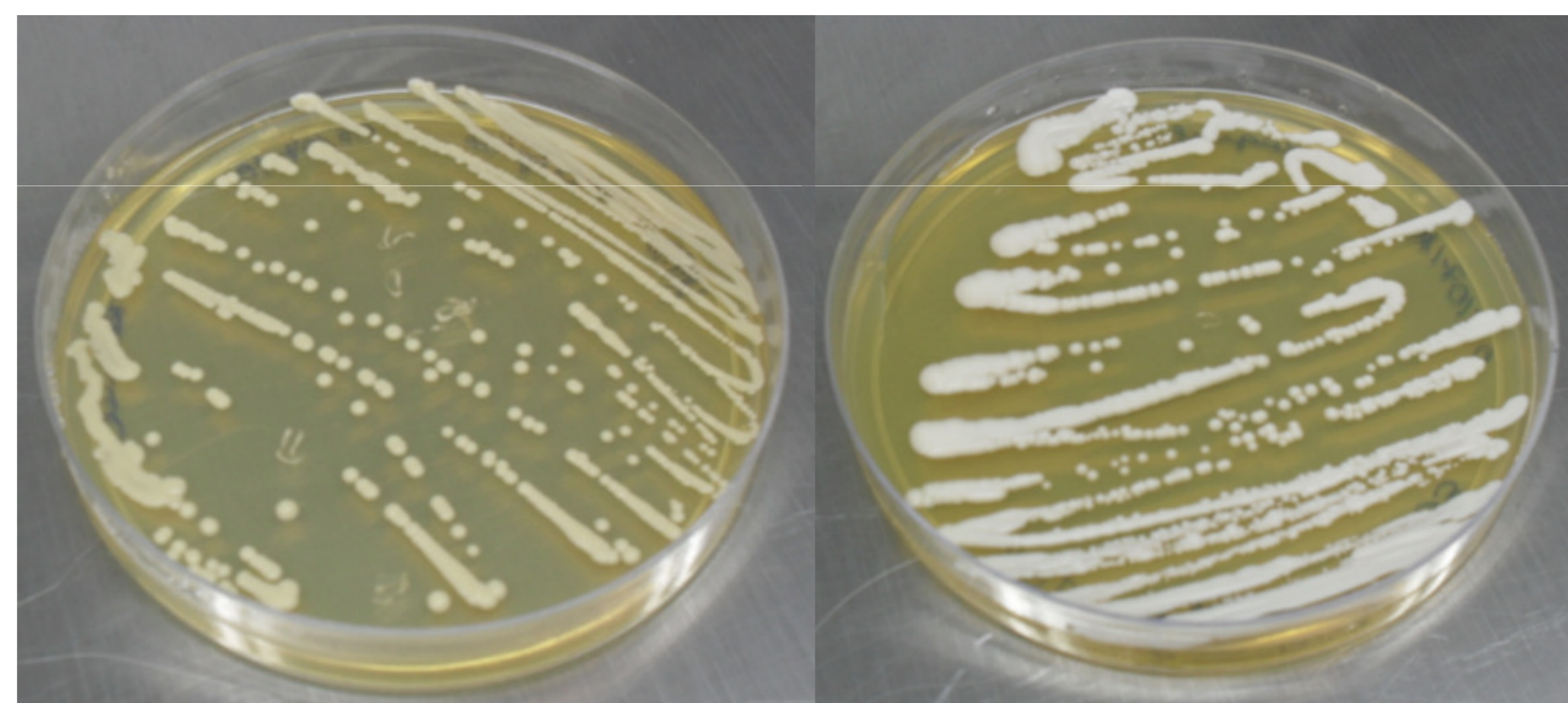
H <sub>2</sub> O	q.s.p.	10 µL
5x HF Buffer	2,0 µL	
dNTP 10mM	0,2 µL	
Primer F 100µM	0,04 µL	
Primer R 100µM	0,04 µL	
DMSO 10%	1,0 µL	
Phusion	0,1 µL	

### Ciclo para amplificação do gene SEH:

1 x	95°C	5 min
	98°C	10 s
32 x	51,3°C	30 s
	72°C	40 s
1 x	72°C	5 min
	4°C	∞

### Tratamento com enzima de restrição

(quantidade para 1 reação)	
DNA	3,0 µL
Eco R1	1,0 µL
React 3	2,0 µL
Água Milli Q	14,0 µL
Incubar por 3 horas à 37°C	



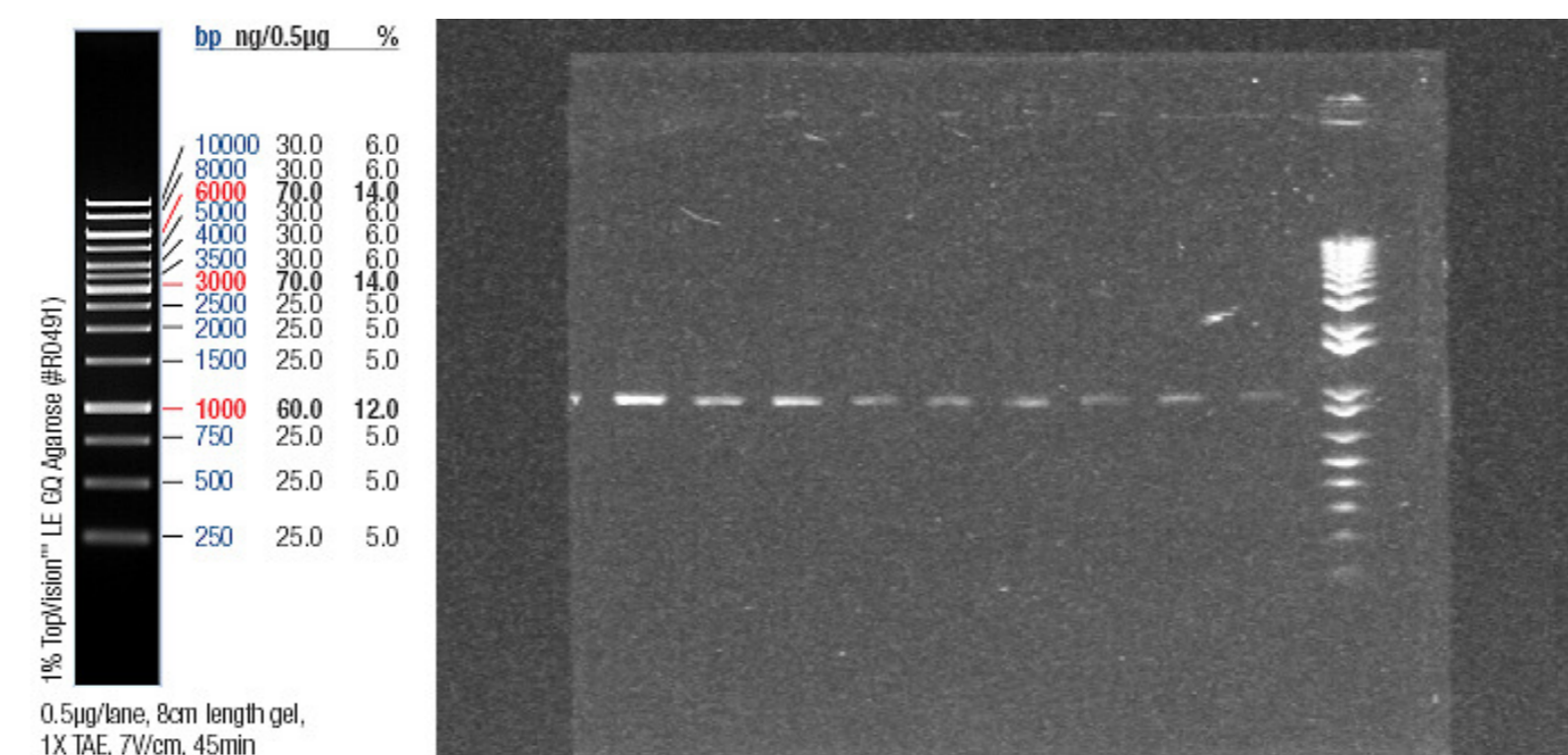
**Figura 1.** Placas de cultura de YPD ágar, usadas para cultivo das linhagens de *P. stipitis*, esquerda e de *P. pastoris* X-33, direita.

O sequenciamento do gene SEH-1 foi feito no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos utilizando o sequenciador MegaBace.

EcoRI	XbaI	NotI
5'-G AATTC-3'	5'-T CTAGA-3'	5'-GC GGCCGC-3'
3'-CTTAA G-5'	3'-AGATC T-5'	3'-CGCCG CG-5'

**Figura 2.** Sítio das endonucleases usadas nos experimentos. EcoR I para análise de colônias transformadas e Xba I e Not I para desenho dos primers para continuação do projeto.

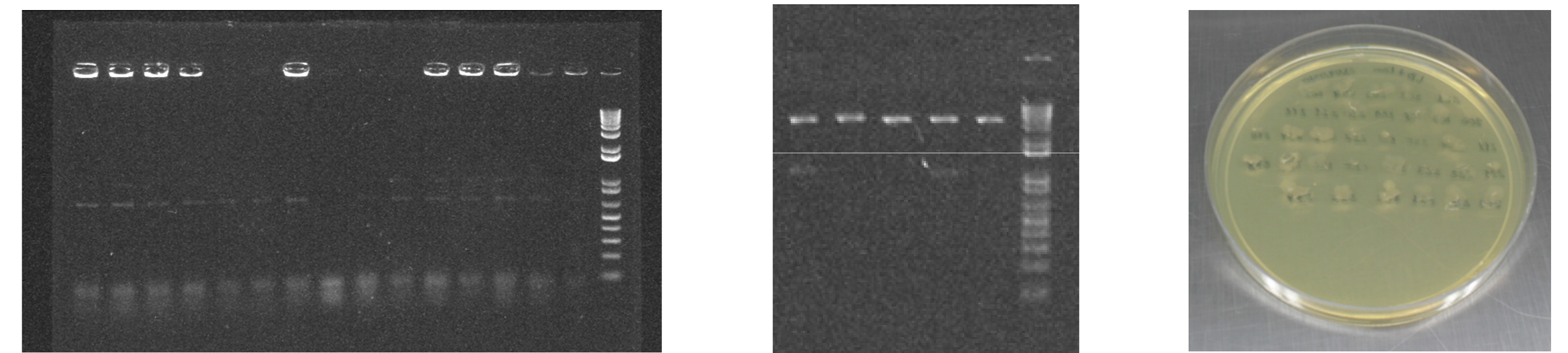
## Resultados



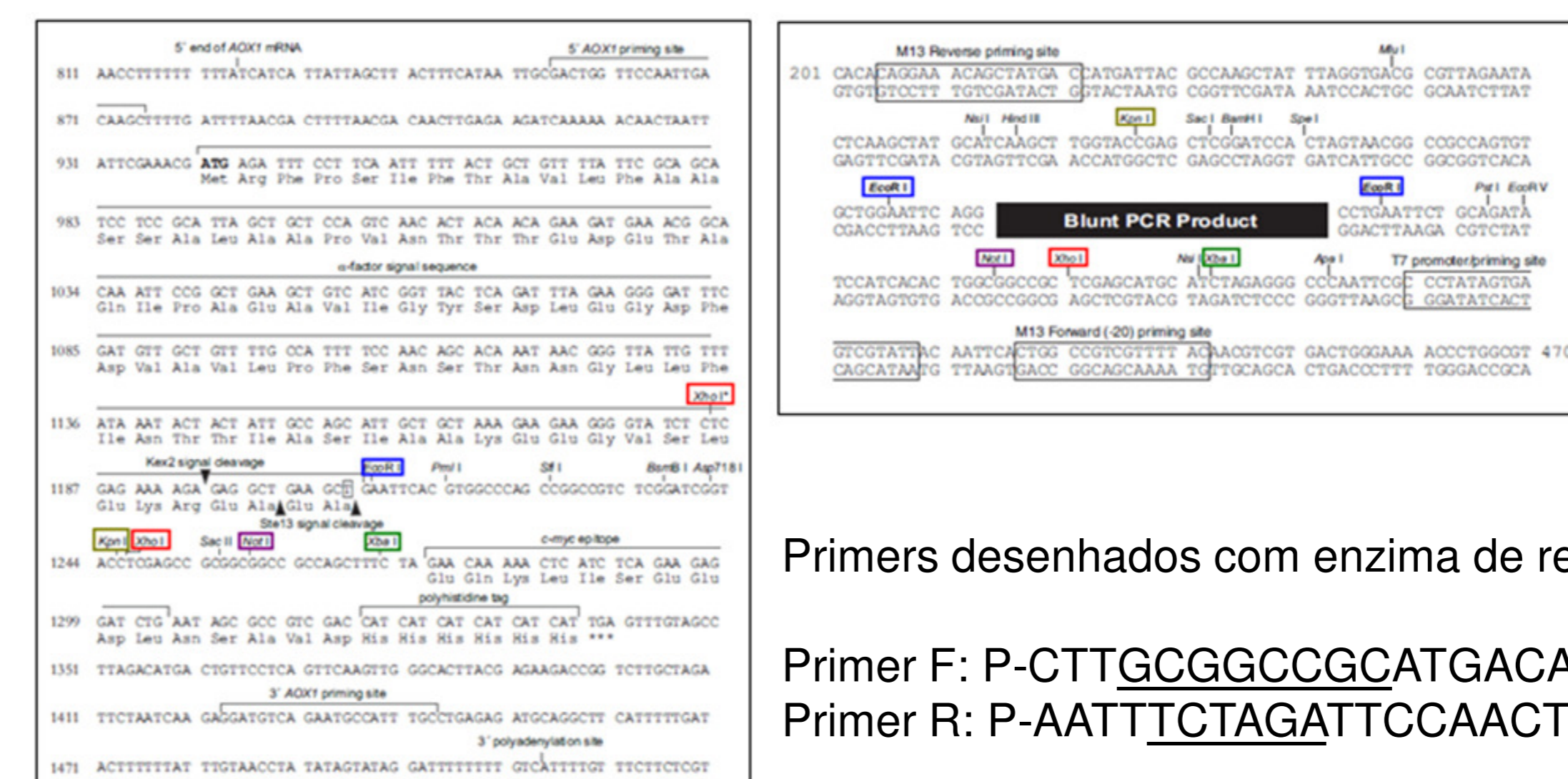
**Figura 3.** Gel analítico do produto de PCR – gradiente de temperatura: 51.3, 52.1, 53.1, 53.8, 54.6, 55.2, 56.6, 57.2 e 58.3 °C. A temperatura mais apropriada é a de 51.3 °C. A sequência amplificada apresenta ~1000 pb, o que confere com os dados da literatura - 966 bp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). O gene não possui introns, o que possibilita a sua amplificação direta a partir do DNA genômico da levedura.

GACCCGGAAAGGTTGATCACTATAGGGCGAATGGCGCCTCTTTATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTGAGGATGACAG  
AAAGATTCTTATCAAACCTACCCACGGTCCAGAAAGTTCCACCACCGTCTCGAAGTACAGCGAACAAGATGTTTCAAAGGTGCCGGAACCAATGGAC  
AAGAGTATCTTCTCTTGCATGGGTTTCCTGATGAAATNCGTCCATGATGAAGCCTGGCCGCATTAGCACAAAGGGTTTCTAATGAAAGGGTCTTTT  
GTTGCTAGCACCATTTAGAGAGGCTACGAAGAGCTGAGTTTGGGGCCAGACGAATATAGTACTCATGATGTCGCTGGAGACGTTGGTGCCTGGATCAAGC  
AGATTAAACCCAGCAACAAGGTTCCAGTTCCAGTTTGGGCCAGGATGGGGTGTATTAAGTGCCTTCAAAGCTGCTTCAAAGGTTCCAGAGTTGGTTACTT  
CAATTGTGACTTTGGCAATCTTATTTGACCAATGTGGTTCCTGGAAGTGGCTTGAATGTTCTGACAGTTGACTATTGCTGATATGGTGGACGAT  
GCAGTTATCGTTCCTGTAACACGATCCAGATTCGACACCAAAACACAAGGGCCANAAGAATACGACCTTAAGATTCCGCTCCTCGAAGTACTGGTCTCCT  
AACCTTGGAAAGTATACCGAAAAGAATATCAGTAAAGAACAGAGCCAGATTGAGGTGATCACAGAATCATGGATGCTACACAGCTTATTAACAGAGC  
CATCTTCAACCCGATTNACCTTATAACAGGAAGTCAAATGGCCGCTTGACTCACGCAAGTCCCATTTTTAGGTGGCGCCANAAGGTTNTGNCGCCATG  
GTTTCATCGCGCAGATTCGAGGACACAAAAGACTGTTGC

**Figura 4.** Sequência consenso obtida a partir do vetor de clonagem, para análise de restrição



**Figura 5.** Esquerda - amplificação do gene de interesse por PCR de colônia. No meio: análise de restrição (EcoRI). As bandas de maior peso molecular correspondem ao plasmídeo (3,5 kb), e as bandas de menor peso ao gene heterólogo SEH (1,0 kb). Direita - meio sólido com clones de *E. coli* obtidos após transformação.



Primers desenhados com enzima de restrição:

Primer F: P-CTTGGCGCCGCATGACAGAAAGATTCTGTTATCAAAC (Not I)  
Primer R: P-AATTTCTAGATTCCAACCTCTGGAAACCTTG (Xba I)

**Figura 6.** Análise de restrição, à direita região do vetor de expressão pPICZαA e à esquerda vetor de clonagem PCR-Blunt. A partir da análise foram desenhados novos primers, contendo enzimas de restrição para realização de uma nova subclonagem.

## Conclusões

Neste trabalho amplificamos o gene de interesse SEH a partir do DNA genômico de *P. stipitis*. O gene foi subclonado em pCR-Blunt. A inserção do fragmento foi verificada por PCR de colônia e tratamento com enzima de restrição. O gene SEH apresentou 94% de identidade com a sequência descrita no NCBI (Gene ID: 4850798). O sistema pPICZαA/*P. pastoris* X-33 será utilizado para expressão heteróloga.

## Referências Bibliográficas

Stemmer, W. P. C. Nature 1994, 370, 389; Zhang, J. H.; Dawes, G.; Stemmer, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 4504; Sharma, A.D.; Singh, J.; "A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete"; Analytical Biochemistry, 337(2005), 354 – 356; Reetz, M. T.: Enzyme Assays: High Throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting, Ed. Raymond J.-L. 2006; p. 41

## Apoio Financeiro: