

INTRODUÇÃO

A obtenção de materiais inorgânicos organizados é de suma importância para o desenvolvimento de novos materiais de estruturas complexas e que sejam funcionais ao homem. Alguns animais marinhos, esponjas (*Suberites domuncula*), tem uma alta capacidade de formar materiais inorgânicos de alta complexidade contendo átomos de silício. Este projeto visou estudar a proteína silicateína mutante, envolvida no processo biológico de formação de biosilicatos.

Neste trabalho, o foco dado foi a obtenção, purificação e determinação da melhor condição de uso desta proteína em solução para estudos de determinação estrutural via RMN. Desta forma, pode-se conhecer características próprias da proteína silicateína quando sintetizada na linhagem na linhagem *E. coli* BL21(DE3), o que será útil no planejamento de sínteses posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos gráficos de teste de expressão em diferentes meios e temperaturas, pode-se notar que o armazenamento não influenciou na produção das células, uma vez que estes não diferem de forma considerável entre si, e se assemelham ao gráfico esperado do crescimento de bactérias na fase log.

Os géis mostrados na figura 1 indicam que, após a adição do indutor de síntese protéica (IPTG), ocorreu o surgimento de bandas de proteína na região entre 21 e 31kDa, o que era esperado uma vez que a silicateína mutante tem peso molecular ao redor de 24 kDa, indicando o sucesso na expressão tanto em meio rico (LB) quanto em meio mínimo (M9). Além disso, pode-se concluir a partir dos géis que, após a expressão, a proteína silicateína mutante permanece majoritariamente no pellet das amostras.

A figura 2 indica o sucesso da expressão em meio M9 marcado. A partir do gel na figura 3, observou-se que a proteína desliga-se da coluna após a passagem das soluções TRIS contendo 100mM(volumes A e B) e 250mM(volume A) de imidazolol.

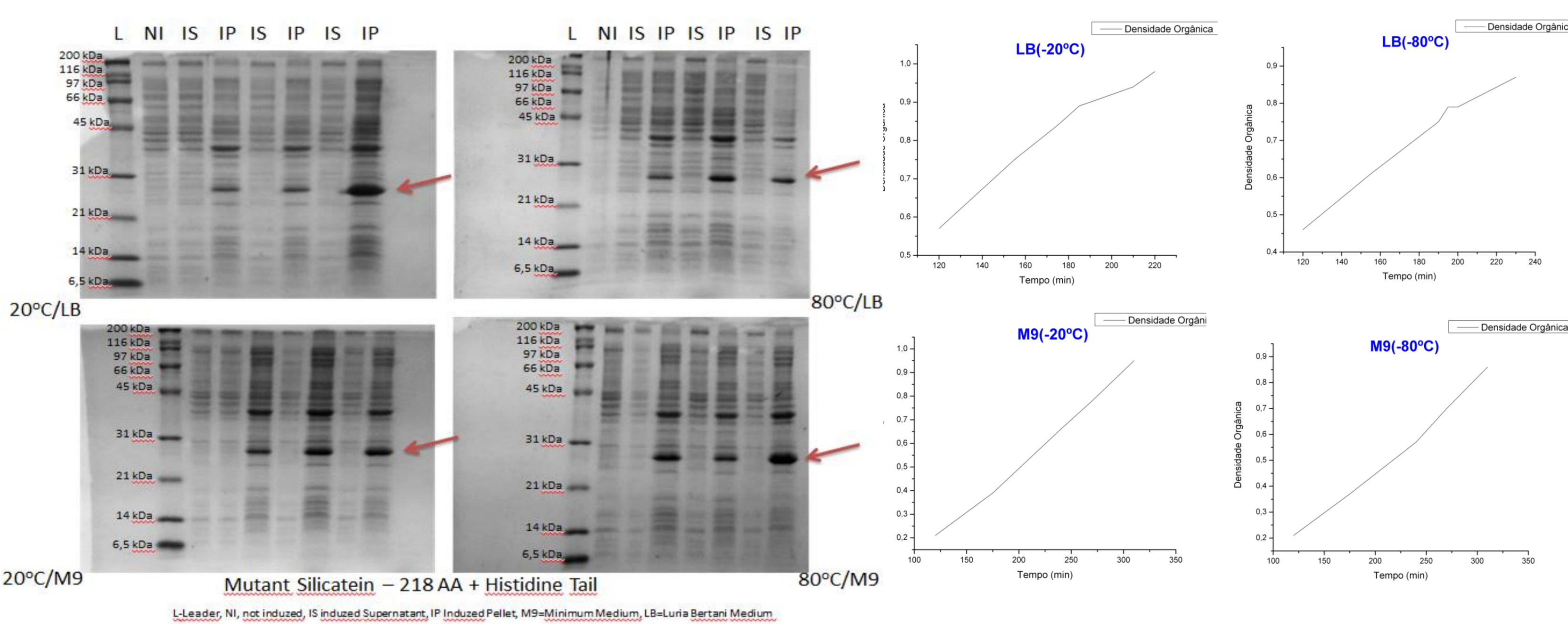


FIGURA 1 Expressão em diferentes meios e temperaturas. As setas indicam a proteína estudada silicateína produzida com sucesso em todos os meios e temperaturas de armazenamento de DNA.

1: Marcador de peso 2: Sobrenadante antes da adição de IPTG 3: Sobrenadante 1 h após a adição de IPTG 4: Pellet 1 h após a adição de IPTG 5: Sobrenadante 2 h após a adição de IPTG 6: Pellet 2 h após a adição de IPTG 7: Sobrenadante 4 h após a adição de IPTG 8: Pellet 4 h após a adição de IPTG

GRÁFICOS DE TESTE DE EXPRESSÃO EM DIFERENTES MEIOS E TEMPERATURAS

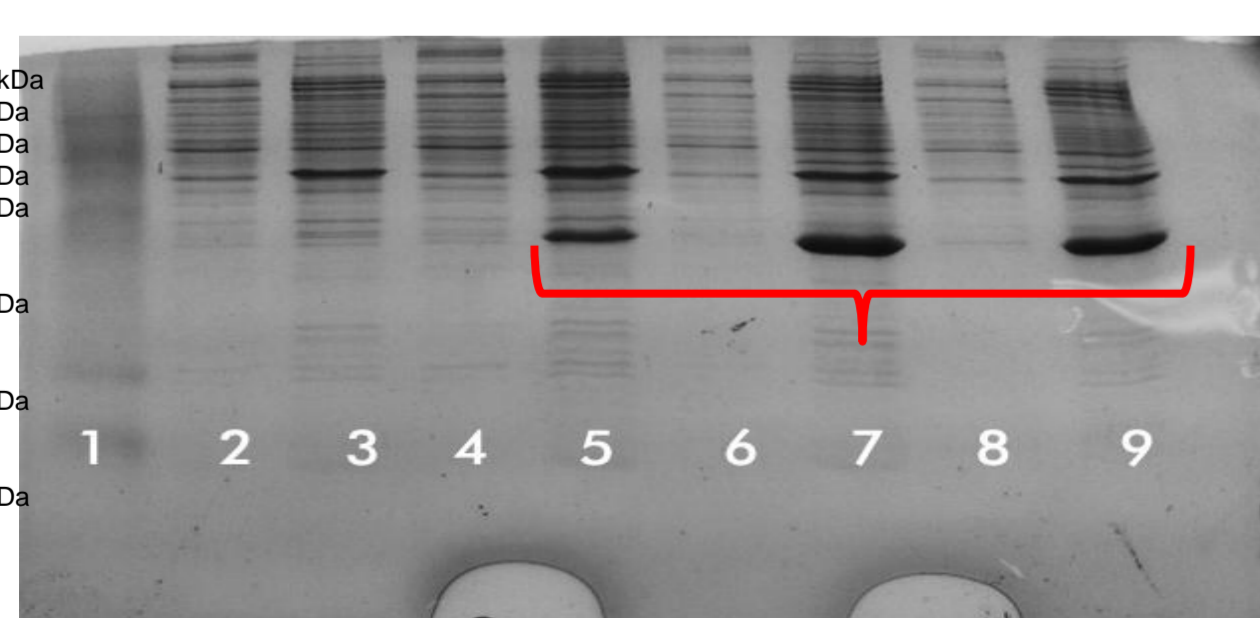


FIGURA 2 – Expressão em Meio M9 marcado
1: Marcador de peso 2: Sobrenadante antes da adição de IPTG 3: Pellet antes da adição de IPTG 4: Sobrenadante 1 h após a adição de IPTG 5: Pellet 1 h após a adição de IPTG 6: Sobrenadante 2 h após a adição de IPTG 7: Pellet 2 h após a adição de IPTG 8: Sobrenadante 4 h após a adição de IPTG 9: Pellet 4 h após a adição de IPTG.
Nota-se banda forte entre 21-31kDa, referente à silicateína de peso 24kDa.

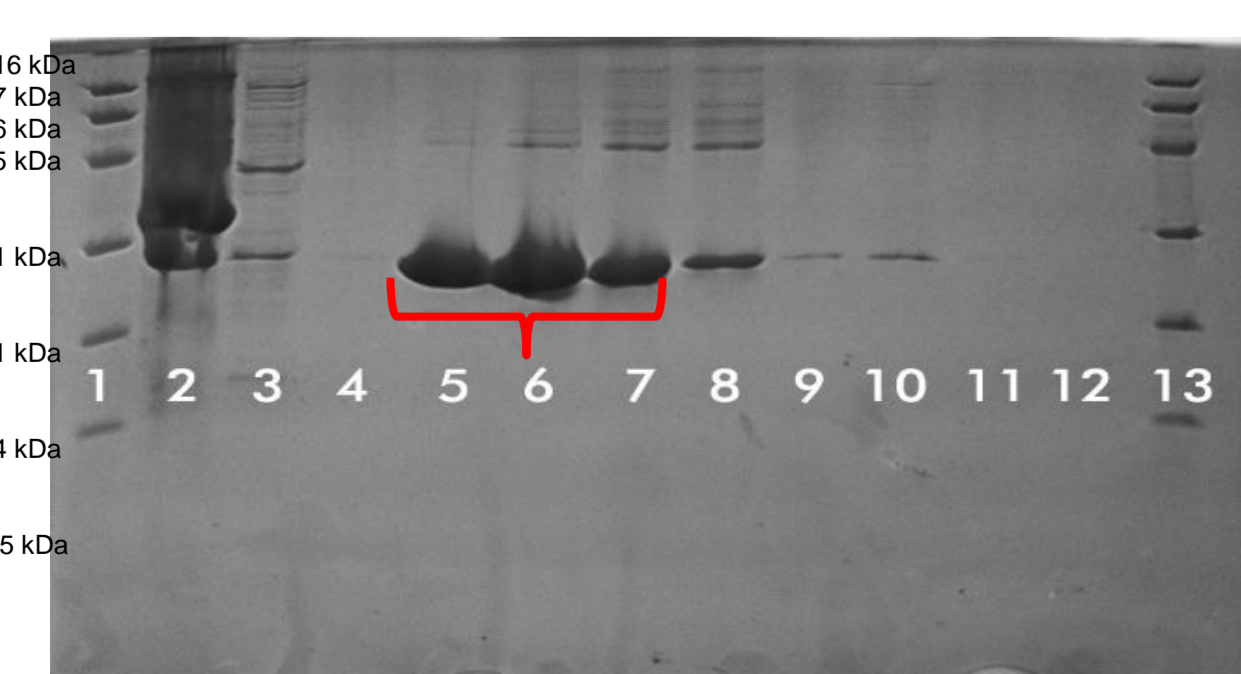
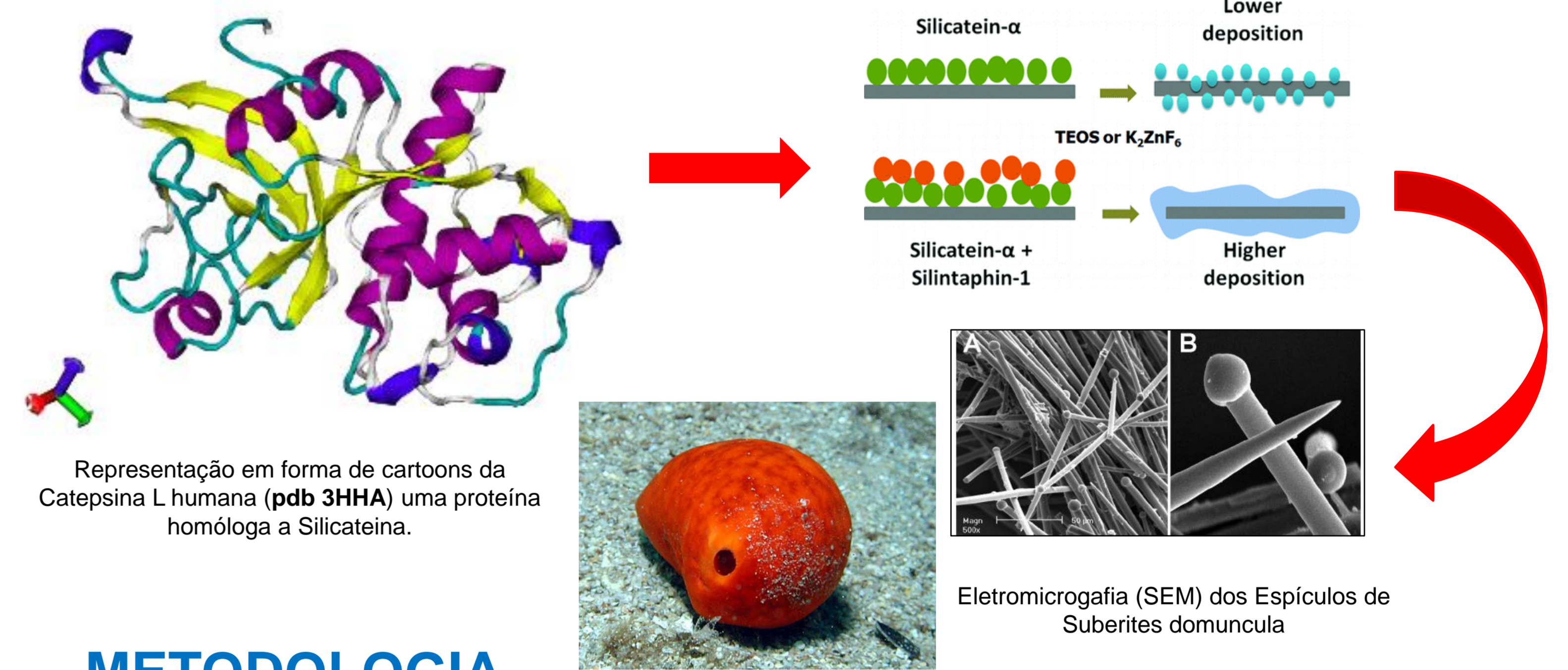


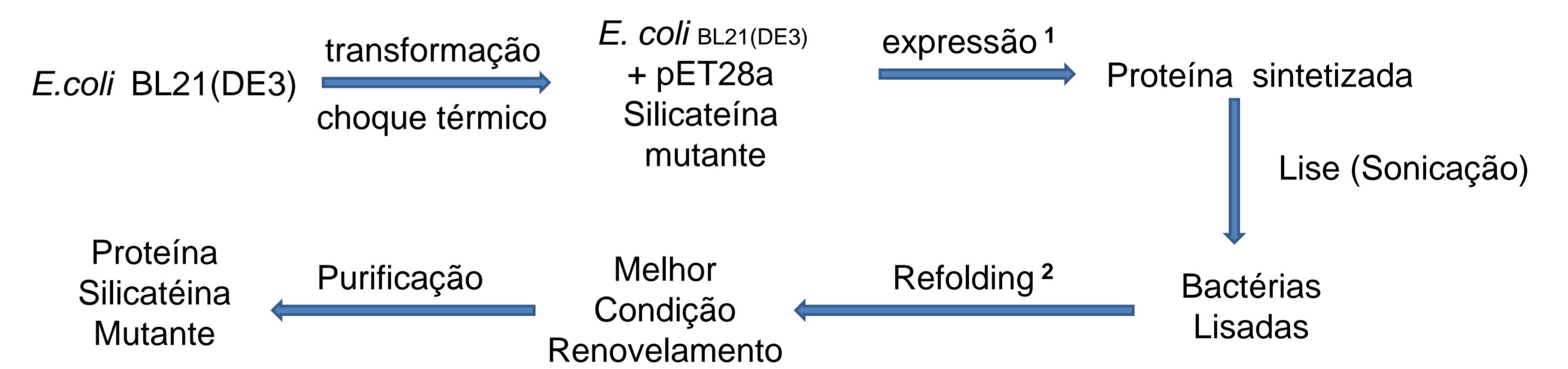
FIGURA 3 - Purificação

1: Marcador de peso 2: Flow Through 3: Pellet antes a adição de IPTG 4: Após passagem de volume 75C 5: Após passagem de volume 100A 6: Após passagem de volume 100B 7: Após passagem de volume 100C 8: Após passagem de volume 250A 9: Após passagem de volume 250B 10: Após passagem de volume 1000A 11: Após passagem de volume 1000B 12: Após passagem de volume 2000A 13: Marcador de peso.
Nota-se banda forte entre 21-31kDa, referente à silicateína de peso 24kDa.

Força do tampão(mM)	Soluções	Tampão com imidazolol	Tampão sem imidazolol
10	(A/B)	0,2 mL	4,8 mL
25	(A/B)	0,5 mL	4,5 mL
50	(A/B)	1,0 mL	4,0 mL
75	(A/B/C)	1,5 mL	3,5 mL
100	(A/B)	2,0 mL	3,0 mL
250	(A/B/C)	5,0 mL	0,0 mL



METODOLOGIA



O teste de refolding² indicou que a melhor condição de renovamento é no buffer 13 de composição: Tris-HCl 50 mmol/L, em pH 8,5, contendo Gnd-HCl 750 mmol/L, NaCl 240 mmol/L, KCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, L-arginina 200 mmol/L, Triton X-100 0,5% e DTT 1 mmol/L. Prossegui-se renovando a amostra e submetendo ao equipamento Bruker Avance III - 600MHz.. O espectro de RMN abaixo (Figura 4) indica o sucesso dos experimentos, apesar de uma amostra pouco concentrada.

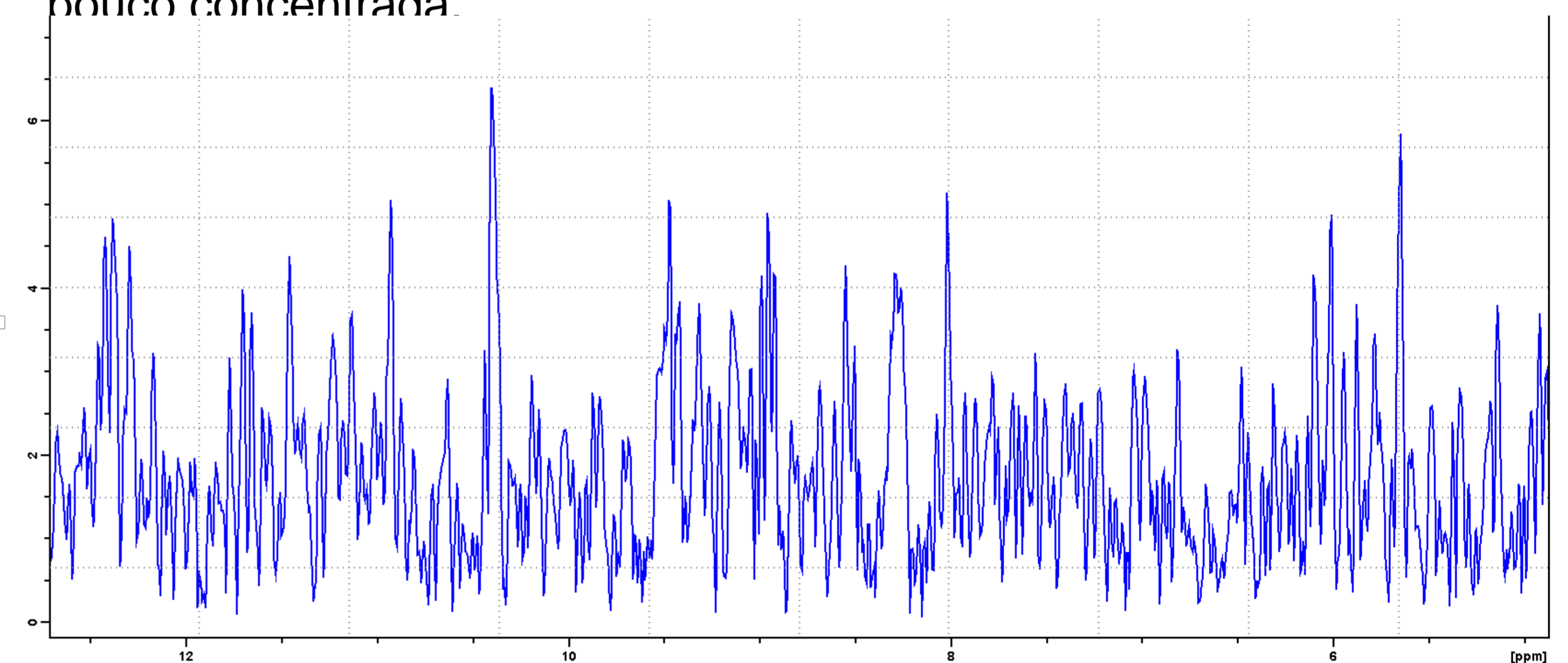


FIGURA 4 – Espectro de Ressonância Magnética (RMN) da amostra enovelada

CONCLUSÕES

- A expressão da proteína silicateína mutante em bactérias *E. coli* BL21(DE3) mostrou-se eficaz tanto em meio LB quanto M9. Além disso, a temperatura de armazenamento não pode ser considerado um fator de interferência nesse processo.
- A purificação via coluna de afinidade (His-Trap) em condição desnaturante mostrou-se eficaz para a silicateína mutante.
- A melhor condição de solubilização da proteína foi obtida no buffer 13, previamente citado..
- O espectro de RMN mostrou o sucesso na produção da proteína.
- Esta amostra ainda não se encontra em condição ideal de concentração para realizarmos a determinação estrutural da proteína silicateína mutante via protocolos de RMN.

REFERÊNCIAS

- STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods. Enzymol.*, v. 185, p. 60-89, 1990.
- ATHENA ENZYME SYSTEMS™. The QuickFold Protein Refolding Kit V.2.1, p 7-9.
- Wüthrich, K, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1986, Baker Lectures. Seires