

2. se incubează amestecul de reacție timp de patru ore la temperatura indicată de producător (în general, 37°C);
3. se separă fragmentul de clonat și respectiv vectorul liniarizat din amestecul de reacție prin electroforeză în geluri de agaroză, după care se purifică prin extragerea din gel urmând protocolul descris în subcapitolul IV. 4 – Izolarea ADN-ului din geluri de agaroză la pagina 103;
4. urmând indicațiile producătorului trusei de reactivi pentru ligare Rapid DNA ligation Kit (Roche), se realizează ligarea fragmentului în vector; este indicat ca raportul dintre concentrația fragmentului de clonat și a vectorului să fie de 1:3;
5. după ligare, amestecul de reacție poate fi utilizat direct pentru transformare; astfel, 200 μl celule preparate după indicațiile producătorului (Roti®-Transform, Roth, Germania) se combină cu 10 μl amestec de ligare și se incubează pe gheață timp de 30 minute;
6. amestecul de transformare se etalează pe plăcile cu mediu LB și ampicilină preîncălzite la 37°C; după uscarea completă a mediului în exces, se incubează peste noapte la 37°C; prezența plasmidului pH6EX3 va determina rezistența microorganismului la antibioticul mai sus menționat, astfel încât doar celulele care poartă plasmidul se vor dezvolta;
7. coloniile obținute se verifică prin secvențiere pentru a confirma prezența fragmentului inserat în mod corect în situsul multiplu de clonare.

VIII.2 Identificarea condițiilor optime de supraexpresie a proteinelor recombinante

De departe cel mai folosit sistem pentru supraexpresia și obținerea proteinelor recombinante este bacteria *E. coli*, datorită faptului că necesită pentru cultivare o dotare foarte simplă și medii de cultură relativ ieftine.

Supraexpresia unei proteine recombinante în *E. coli* este strict dependentă de *vectorii plasmidiali de expresie*. Gena clonată în acești vectori este pusă sub controlul unui *promotor puternic* ce permite o verificare foarte strictă a intensității și momentului expresiei. Cei mai importanți promotori utilizabili în *Escherichia coli* sunt *lac*, *tacși lacUV5* din sistemul T7 (13); mai multe detalii legate de avantajele și dezavantajele fiecăruia pot fi găsite în lucrarea lui Makrides (1996) (14).

Un promotor corespunzător este absolut necesar, dar și suficient pentru a asigura un nivel bun de expresie al unei proteine exogene. Alți factori ce influențează nivelul de expresie al unei proteine recombinante în *E. coli* sunt:

1. existența unui semnal de terminare a transcripției eficient, ce asigură o mai mare stabilitate a ARN-ului mesager;

2. procesele de proteoliză. *E. coli* prezintă numeroase sisteme proteazice localizate în citoplasmă, periplasmă sau asociate cu membranele externă și internă care au rolul de a inactiva proteinele exogene (15). Utilizarea unor tulpini de *E. coli* modificate genetic precum BL21, alături de cultivarea la temperaturi scăzute, fuzionarea cu o proteină cunoscută ca fiind stabilă, fuzionarea cu o secvență ce dirijează proteina de interes spre spațiul periplasmic unde există un număr mai mic de proteaze sunt câteva abordări care pot fi utilizate pentru a diminua neajunsurile fenomenelor de proteoliză (8).

E. coli este un organism procariot și din acest motiv utilizarea sa pentru producerea de proteine exogene prezintă o serie de dezavantaje. Celulele de *E. coli* nu pot procesa introni, nu pot realiza modificări post-transcripționale complexe, precum glicozilarea, miristilarea, fosforilarea, nu pot forma un număr mare de punți disulfidice și nu prezintă sistemele specifice de tip *chaperones* necesare asamblării moleculelor multimerice (14). Șansele de obținere a unei proteine cu structură tridimensională normală, nativă atunci când este supraexprimată în *E. coli* cresc dacă:

1. organismul din care provine gena clonată este mai apropiat filogenetic de *E. coli*;
2. proteina are masă moleculară redusă, mai mică de 70 kDa;
3. nu are resturi de cisteină libere;
4. nu are mai mult de 3-4 punți disulfidice intramoleculare;
5. nu necesită modificări posttranscripționale pentru activitate sau solubilitate (16).

În general, pentru a mări randamentul de purificare și pentru a obține rapid cantități mari de proteină pură este de dorit ca gena clonată să fie exprimată cât mai puternic. Prin utilizarea unor promotori puternici precum *tac* sau *lac*, nivelul de expresie atins este ridicat și poate duce la destabilizarea întregului mecanism de sinteză proteică a celulei bacteriene. Ca măsură de apărare, celulele de *E. coli* depozitează proteina supraexprimată sub forma unor așa numiți *corpi de incluziune*. Aceștia reprezintă aglomerări masive cuprinzând, în general, o singură proteină

inactivă, depliată (17). Recent s-a demonstrat că, de fapt, deplierea nu este totală, ci proteina păstrează un anumit grad de organizare a structurii secundare (18).

Esențial pentru producerea proteinelor recombinante în *E. coli* este realizarea unui echilibru între intensitatea expresiei și solubilitatea acestora. Acest echilibru poate fi controlat prin variația unor parametri de cultivare a microorganismului precum:

- *temperatura de cultivare* – temperaturi mai joase frânează metabolismul microorganismului și asigură nivele de expresie mai reduse; în general, se pornește de la temperatura de 35°C și se coboară gradual cu câte 2-3°C până la valoarea de 20°C; odată cu reducerea temperaturii perioada de incubare va trebui prelungită;
- *nivelul de agitare* – în timpul cultivării agitarea poate să influențeze solubilitatea proteinei supraexprimate prin nivelul de aerare al culturii care, la rândul său, influențează viteza sintezei proteice; în general, se utilizează o viteză de rotație de 190 rpm care poate fi diminuată, după caz, până la 90 rpm;
- *nivelul de inducere a expresiei* – este controlat prin concentrația de agent inductor adăugat în mediu; pentru promotorii *lac* și *tac* agentul inductor este un derivat artificial al lactozei, izopropil β-D-1-tiogalactopiranozid sau prescurtat IPTG (19); cel mai frecvent, concentrația de IPTG utilizată în mediul de cultură este 1 mM, dar aceasta poate fi redusă până la 10 μM;
- *compoziția mediului de cultură* – adăugarea în mediul de cultură a unor agenți care produc stres osmotic precum sorbitol sau betaină poate conduce în unele cazuri la îmbunătățirea solubilității unor proteine exprimate sub formă de corpi de incluziune (20); de asemenea, s-a demonstrat că utilizarea unui mediu autoinductibil poate îmbunătăți foarte mult nivelul de expresie și solubilitatea unor proteine dificil de exprimat (21)(22).
- *tulpina de E. coli utilizată* – distribuitori precum NEB, Fermentas sau Roche oferă o gamă variată de tulpini de *E. coli* modificate special pentru a permite expresia proteinelor exogene; astfel, tulpina BL21 (DE3) este recunoscută ca fiind mai indicată pentru producerea de proteine recombinante decât XL1 Blue.

Principiul metodei:

Tulpina purtând vectorul de expresie recombinat este cultivată până în faza de creștere exponențială, după care se adaugă IPTG în mediu pentru inducerea expresiei genei clonate. După patru ore de cultivare, celulele sunt separate de mediul de cultură prin centrifugare și lizate prin sonicare. Lizatul celular, alături de extractul proteic acelușar obținut prin centrifugare sunt apoi analizate prin SDS-PAGE pentru evaluarea nivelului de solubilitate a proteinei exprimate. Lipsa benzii corespunzătoare proteinei recombinat în extractul proteic acelușar indică faptul că aceasta este insolubilă.

Avantaje:

1. permite evaluarea nivelului de supraexpresie a unei proteine recombinat;
2. permite evaluarea solubilității unei proteine recombinat în condiții de cultivare date.

Limitări:

– sistemul de detecție descris în metoda prezentată nu este aplicabil pentru proteine al căror nivel de expresie este extrem de scăzut (proteina recombinată nu este vizibilă pe geluri SDS-PAGE); în acest caz se recomandă utilizarea unui alt sistem de detecție – de exemplu tehnica Western-Blot (pentru detalii consultați capitolul XI. – *Evidențierea imunologică a proteinelor – tehnica Western-Blot*, pagina 273).

Materiale necesare:

1. placă Petri conținând tulpina *E. coli* BL21 în care a fost introdus plasmidul pH6EX3 cu gena clonată;
2. mediu LB steril cu ampicilină 50 mg/ml, 2 flacoane Erlenmeyer

- de 500 ml cu câte 100 ml mediu și o eprubetă de 50 ml cu 10 ml mediu;
3. IPTG 1 M steril – se cântăresc 2,38 g IPTG și se dizolvă în 10 ml apă distilată; soluția se sterilizează prin filtrare, se împarte în volume de câte 1 ml și se păstrează la temperatura de -20°C ;
 4. soluție tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4 – pentru prepararea unui litru de soluție tampon, într-un cilindru gradat de 1L se dizolvă în 500 ml apă distilată 9,52 g HEPES și 29,2 g NaCl; se ajustează pH-ul la 7,4 după care se aduce la 1000 ml cu apă distilată; se păstrează la temperatura de 4°C termen nelimitat;
 5. hotă sterilă cu flux de aer laminar;
 6. incubator termostatat cu agitare, GFL Mini Incubator – 4010 sau echivalent;
 7. sonicator Sonics Vibra Cell V505 sau echivalent;
 8. centrifugă cu răcire;
 9. spectrofotometru și cuve de spectrofotometrie.

Mod de lucru:

1. se inoculează cei 10 ml mediu LB care conține ampicilină 50 mg/ml cu o singură colonie de *E. coli* de pe placa Petri;
2. eprubeta cu mediu inoculat se incubează peste noapte la 37°C sub agitare (190 rpm);
3. 1 ml din cultura bacteriană obținută se folosește pentru inocularea celor două flacoane Erlenmeyer cu 100 ml mediu LB suplimentat cu ampicilină 50 mg/ml; flacoanele se incubează la 37°C și 190 rpm până când densitatea optică a culturii la 600 nm atinge o valoare cuprinsă în intervalul 0,7-1; în general, această condiție este îndeplinită după 2-3 ore de cultivare;
4. se induce expresia proteinei clonate prin adăugarea în unul din flacoane a 100 μl IPTG 1 M; cantitatea de IPTG poate varia, fiind unul dintre parametrii care trebuie stabiliți pentru optimizarea expresiei; cel de-al doilea flacon rămâne neindus și reprezintă controlul procesului de expresie;

5. flacoanele se incubează timp de 1-4 ore la 35°C și 190 rpm; timpul de incubare și temperatura și viteza de agitare pot fi variate pentru îmbunătățirea expresiei proteinei;
6. celulele se separă din mediul de cultură prin centrifugare la 4400xg, timp de 10 minute, la temperatura de 4°C după care se resuspendă în câte 10 ml soluție tampon HEPES 40 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4; dacă celulele nu sunt procesate imediat, ele pot fi păstrate la temperatura de -20°C pentru o perioadă nedeterminată;
7. celulele se lizează prin sonicare, de două ori câte 2 minute, puls o secundă, pauză o secundă, putere 40%;
8. din lizatul celular obținut se păstrează 100 μl și restul se clarifică prin centrifugare la 14.000rpm, 30 min, 4°C; extractul clar obținut reprezintă extractul proteic acelular;
9. atât lizatul celular cât și extractul proteic acelular se analizează prin SDS-PAGE pentru cuantificarea nivelului de expresie și solubilității proteinei supraexprimate; pentru detalii privind SDS-PAGE și cuantificarea gelurilor consultați metodele prezentate în cadrul capitolului X. – *Separarea electroforetică a proteinelor*, pagina 241; în general, proteina supraexprimată este ușor de identificat datorită nivelului de expresie foarte mare (Figura 24); în cazul în care nu este ușor reperabilă, se vor analiza comparativ fracțiunile proteice din lizatul celular corespunzător culturii induse cu IPTG și a celei neinduse.

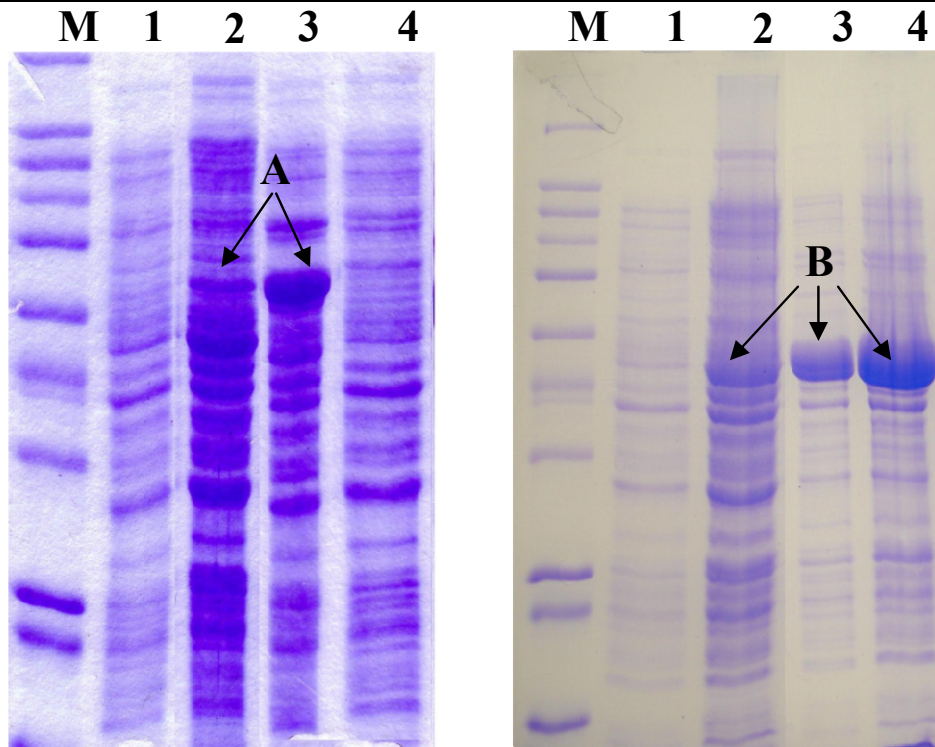


FIGURA 24. Evaluarea expresiei și solubilității unor proteine recombinat în *Escherichia coli*.

A – proteina recombinată este puternic exprimată, dar se acumulează sub formă de corpi de incluziune; **B** – proteina recombinată este puternic exprimată și este solubilă; **M** – marker de masă molară; **1** – lizat celular neindus cu IPTG; **2** – extract proteic acelușar neindus cu IPTG; **3** – lizat celular indus cu IPTG; **4** – extract proteic acelușar indus cu IPTG

VIII.3 Purificarea prin IMAC a proteinelor recombinat în condiții native

Principiul metodei

Proteinele recombinat conținând 6-8 resturi consecutive de histidină la unul din capete (C sau N terminal) sunt supra-exprimat în *Escherichia coli* și purificate folosind un suport cromatografic ce conține ioni Ni^{2+} imobilizați.