

# Produção de Enzima para RT-LAMP

## Porção maior da Enzima DNA Polimerase I de *Geobacillus stearothermophilus* - Bst-LF

A sequência gênica da porção maior da Enzima DNA Polimerase I de *Geobacillus stearothermophilus* (Bst-LF) (MILLIGAN et al., 2018; BHADRA et al., 2021) foi adquirida comercialmente de repositório de plasmídeos (Addgene, Plasmid #145799) e transferida para o vetor pNic28-Bsa4 através da técnica de clonagem independente de ligação (LIC) (ASLANIDIS et al., 1990; STRAIN-DAMERELL et al., 2014). A Bst-LF foi expressa em sistema heterólogo bacteriano de acordo com protocolos amplamente utilizados para produção de proteínas recombinantes em escala média (BURGRESS-BROWN et al., 2014; TOSARINI et al., 2018), e as etapas de purificação utilizadas adaptadas de Burgree-Brown et al. (2014), Milligan et al. (2018) e Tosarini et al. (2018).

## Protocolo de Expressão

### Tampões:

- **Tampão de Ligação 2x:** HEPES 100 mM pH 7,5; NaCl 1 M; Glicerol 20%; Imidazol 20 mM.

### Dia 1

#### A. Pré-inóculo – 17 horas (overnight)

Primeiramente limpe a bancada, com solução de SDS 0.5%, seguida de álcool 70%.

1. A partir de colônias de bactérias frescas em placa de LB-Agar (+antibiótico) ou de um estoque de bactérias em glicerol armazenado a -80°C, inocule uma pequena cultura inicial em meio LB (Luria Bertani) suplementado com antibióticos apropriados (50 uL de canamicina 50 mg/mL e 50 uL de cloranfenicol 34 mg/mL).

Obs.: Cresça 50 mL de pré-inóculo para cada 1 litro e meio de cultura de expressão

2. Incube o pré-inóculo por aproximadamente 14-16 horas, sob agitação constante (140 rpm) e temperatura 37 °C.

## Dia 2

### B. Crescimento da cultura e indução da expressão – 24 horas (overnight)

1. Em um frasco limpo de volume de 4.5 a 5 L (erlenmeyer ou garrafa), adicione 1,5 L de meio TB (Terrific Broth) estéril, e suplemente com 1,5 mL de Canamicina na concentração estoque de 50mg/mL.

Obs.: É importante que o volume total de cultura não ultrapasse 1/3 do volume máximo do frasco, e que o mesmo não seja totalmente fechado, possibilitando a aeração.

2. Antes de inocular a bactéria, retire uma pequena alíquota (2 mL) deste meio já pronto para uso. Esta alíquota será utilizada posteriormente para calibrar a leitura do branco no equipamento de espectrofotometria, para monitoramento do crescimento da cultura de bactérias.
3. Em seguida, adicione o volume do pré-inóculo que ficou em crescimento ao meio no frasco de cultura.

Dica: Caso esteja utilizando colônias únicas, este é o momento no qual pode ser guardada uma pequena alíquota do pré-inóculo e realizado um estoque das bactérias em glicerol, para posterior armazenamento em ultra freezer e utilizado em expressões futuras. Para isto, colete uma pequena alíquota do pré-inóculo crescido antes de inocular no meio, adicione glicerol estéril para uma concentração final de 12% de glicerol, leve imediatamente para ultrafreezer -80 °C.

4. Coloque o meio já inoculado na incubadora com agitação constante (140 rpm) a 37 °C.
5. Após aproximadamente 2h30min de crescimento, inicie o monitoramento do crescimento da cultura bacteriana por densidade ótica (D.O.), utilizando o equipamento de espectrofotometria.
6. Dilua a alíquota de meio TB (separada na etapa 3) em água na proporção de 1:4, e utilize para calibrar o branco do equipamento.

Ex.: 200 uL do meio TB + 800 uL de água.

7. Dilua também uma alíquota da cultura em crescimento na mesma proporção.

Obs.: Lembre-se de levar em conta o fator de diluição ao calcular o resultado final da D.O. e multiplique o resultado por 5.

8. Repita as leituras da D.O da cultura até atingir valores entre 1,6 e 2,0. Quando isso acontecer, a cultura vai ter chegado na densidade ideal para o prosseguimento da expressão.

9. Reduza gradualmente a temperatura da cultura, deixando as garrafas na bancada por pelo menos 30 minutos.
10. Após este período de aclimatação, adicione o indutor de expressão IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo).
  - a. Para 1,5 L de cultura, são adicionados 300  $\mu$ L de IPTG na concentração de 1M.
11. Cresça a cultura por um período de 16 a 18 horas, com agitação constante de 140 rpm e com uma temperatura de 18 °C, mais baixa que nas etapas anteriores.

### **Dia 3**

#### **B. Coleta da cultura – 2 horas**

1. Ligue a centrífuga para que inicie a refrigeração para a coleta da cultura a 4 °C. Os passos seguintes também devem ser realizados em gelo.
2. Retire os frascos da incubadora e divida a cultura em recipientes de 1 L próprios para a centrifugação. É importante que os recipientes tenham o mesmo peso, faça o balanceamento utilizando uma balança.
3. Coloque os frascos já balanceados na centrífuga e inicie a centrifugação com velocidade de 6.000 rpm por 15 min, com temperatura de 4°C.
4. Prepare ao menos 50 mL de tampão para ressuspender o pellet. Utilize o tampão de ligação 2x concentrado suplementado de 0.5 mM do agente redutor TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) e 1mM de inibidor de proteases PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil). Mantenha o tampão no gelo.
5. Após o término do tempo da centrifugação, retire os frascos com cuidado da centrífuga e coloque em uma caixa com gelo.
6. Descarte o sobrenadante em um recipiente para descarte, já com o agente descontaminante apropriado.
7. Estime o peso dos pellets, levando em consideração o peso dos frascos da centrífuga, e baseado na massa do pellet adicione volume proporcional de tampão  
Ex.: Para 30 g de pellet, adicione 30 mL do tampão previamente preparado como na etapa 12.
8. Com o auxílio de uma pipeta sorológica, ressuspenda o pellet com cuidado, evitando formação de espuma, até obter uma mistura homogênea do pellet em tampão  
Dica: Faça movimentos circulares, aspirando e dispensando o líquido repetida e lentamente.

9. Divida o pellet homogêneo em tubos cônicos de 50 mL e faça o congelamento rápido submergindo os tubos em nitrogênio líquido.
10. Assim que estiverem completamente congelados, guarde os tubos com os pellets em ultrafreezer -80 °C até serem utilizados na próxima etapa: a purificação.

## Protocolo de Purificação

### Tampões:

- **Tampão de Ligação:** HEPES 50 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; Glicerol 10%; Imidazol 10 mM; TCEP 0.5 mM, adicionado logo antes do uso.
- **Tampão de Lavagem:** HEPES 50 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; Glicerol 10%; Imidazol 30mM; TCEP 0.5 mM, adicionado logo antes do uso.
- **Tampão de Eluição:** HEPES 50 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; Glicerol 10%; Imidazol 300 mM; TCEP 0.5 mM, adicionado logo antes do uso.
- **Tampão de Diálise:** Tris-HCl 10 mM pH 7,1; KCl 200 mM; Glicerol 10%; TCEP 0,5 mM, adicionado logo antes do uso.
- **Tampão de Estoque:** Tris-HCl 10 mM pH 7,1; KCl 50 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,1%; Glicerol 50%.

### Dia 1

#### A. Descongelando a suspensão celular – 45 minutos

Primeiramente limpe a bancada, com solução de SDS 0.5%, seguida de álcool 70%.

1. Remova a suspensão celular do freezer, e anote o volume.
2. Coloque o tubo em um béquer com água à temperatura ambiente para descongelar rapidamente. Quando descongelado, transfira o tubo para o gelo.
3. Transfira o material para um béquer. Adicione o equivalente a metade do volume inicial da suspensão bacteriana de Tampão de Ligação à mistura. Misture bem até ficar totalmente homogêneo.

#### B. Lise celular por sonicação e recuperação do sobrenadante – 1 hora e 15 minutos

1. Coloque o béquer com a suspensão celular em um balde com gelo.

2. Coloque o balde com o béquer na câmara de sonicação, e ajuste a altura da sonda de modo que cerca de 1 cm dela fique submersa na suspensão.
3. Programe o sonicador para 4 min de sonicação, 5 s ON/10 s OFF, com amplitude de 35%. Serão 12 minutos de sonicação no total. Inicie a sonicação.
4. Enquanto a sonicação está ocorrendo. Garanta que a centrífuga esteja resfriada a 4 °C e coloque os tubos da centrífuga no gelo.
5. Ao final da sonicação, retire o material lisado da câmara, e limpe a sonda com álcool 70%. Guarde uma pequena alíquota dessa amostra (Lisado total) para análise futura em SDS-PAGE. Repare que a suspensão está com tonalidade mais escura.
6. Distribua o material sonicado entre os tubos refrigerados; pese os tubos e os balanceie apropriadamente.
7. Centrifugue as amostras por 45 minutos à velocidade de pelo menos 40.000 x g (25500 rpm no rotor JA25.5 da Beckman Coulter). Respeite os limites da centrífuga, dos rotores e dos tubos disponíveis em seu laboratório. Aumente o tempo de centrifugação, caso a velocidade a ser utilizada for menor que a indicada acima.
8. Após a centrifugação, remova os tubos da centrífuga e transfira o sobrenadante para um tubo ou béquer limpo.
9. Guarde uma pequena alíquota para o SDS-PAGE.

### **C. IMAC – Ligação da proteína à Ni-Sefarose, lavagem e eluição com Imidazol – 4 horas**

Essa etapa pode ser executada em equipamento automático FPLC ou manualmente em coluna por gravidade. Em ambos os casos, garanta que os tampões estejam preparados e refrigerados, e a coluna pré-equilibrada com tampão de ligação.

1. Para 1.5 L de cultura inicial, 5 mL de resina são suficientes. Para equilibrar a coluna, passe pelo menos 5 volumes de coluna (CVs) de água na resina, seguidos de 3 a 5 CVs de tampão de ligação.

Obs.: Volume de coluna, ou *column volume (CV)*, em inglês, é a unidade de medida neste processo, e corresponde ao volume de resina adicionada à coluna.

No caso, 1 CV = 5 mL.

2. Adicione todo o volume do sobrenadante da etapa de sonicação na coluna, cuidando para não movimentar a resina. Colete o material não ligado, saindo da coluna (*Flow-through*).
3. Lave a coluna com 5-10 CVs de tampão de lavagem (Tampão de ligação ajustado para 30 mM de Imidazol). No FPLC, você pode obter essa solução indicando o programa a mistura de 7% do Tampão de eluição (B) com 93 % do tampão de ligação (A).

4. Elua a proteína alvo com 2 CVs de tampão de eluição.

Dica: Para melhorar esta etapa, após passar 1 CV do tampão de eluição pela resina, feche a saída da coluna e a mantenha fechada por 5 minutos. Abra, então a saída e colete o resto do material.

5. Guarde amostras de todas as frações para o SDS-PAGE.
6. Misture as frações da eluição e meça a absorbância a 280 nm usando um Espectrofotômetro de micro volumes; Calcule a concentração através do peso molecular e coeficiente de extinção molar.

#### **D. Digestão com protease TEV – 16 horas (overnight)**

A protease TEV corta especificamente na sequência (ENLYFQ\*S) que está presente na proteína recombinante entre a His-tag e a sequência da proteína alvo propriamente dita. Usando esta enzima, não apenas removemos a tag, mas também provemos uma etapa de purificação adicional: em uma nova coluna cromatográfica de afinidade por metal (IMAC), a proteína alvo, agora sem a tag, não deve ligar mais à coluna de níquel, enquanto a maioria dos contaminantes continua a se ligar.

A digestão é executada em membrana de diálise, pois permite remover o imidazol e a maioria do peptídeo digerido. Utilizamos proporção molar de 1:15 de TEV para a proteína alvo, com digestão “overnight” em bolsa de diálise, em béquer contendo 1 L de tampão de diálise a 4-7°C.

1. Corte um segmento de membrana de diálise SnakeSkin 10K MWCO (Thermo Fisher), com pelo menos 6 cm a mais do que o suficiente para incluir o volume da eluição.
2. Calcule a quantidade de TEV a ser adicionada à amostra, na proporção 1:15 para a quantidade de Bst-LF Polimerase presente, e acrescente ao tubo contendo a eluição.
3. Dobre uma das extremidades da membrana de diálise, e prenda com clipe apropriado.
4. Adicione toda a amostra de proteína contendo a TEV à bolsa de diálise, e feche a extremidade restante, como no item acima. Verifique se não existe nenhum vazamento.
5. Coloque todo o aparato dentro de um béquer com 1 litro de tampão de diálise, e uma magnética. Mantenha a diálise a 4-7°C em câmara fria ou geladeira, sob agitação baixa constante.

#### **Dia 2**

##### **E. IMAC Reverso - Religação dos contaminantes – 4 horas**

1. No dia seguinte, retire com cuidado a amostra da diálise e guarde uma pequena alíquota da solução de proteína digerida por TEV.

2. Prepare uma coluna contendo 2-3 mL de resina Ni-sefarose, e equilibre como descrito anteriormente, mas utilizando agora tampão de diálise do próprio béquer da digestão.
3. Adicione à coluna a amostra digerida com TEV e mantenha o sistema aberto, coletando o material de saída. Adicione o restante do material aos poucos até que toda a amostra tenha passado pela coluna. Colha toda a fração não ligada. Esta é a fração de interesse, que contém a maior parte da proteína de interesse digerida (*Flow-through* - FT)
4. Adicione mais 5 CVs da solução de diálise para retirar o restante da proteína digerida (FT2).
5. Lave a coluna com 5 CVs de tampão de diálise complementado com Imidazol para concentração final de 30 mM (Veja observação abaixo). Repita o processo com tampão corrigido para 60 mM de Imidazol.

Obs.: Calcule a quantidade de Imidazol residual no equilíbrio da amostra e do tampão após a diálise.

Ex.: 35 mL de amostra sendo digerida (Imidazol 300 mM), equilibrará com o 1 L de tampão de diálise (sem imidazol) para a concentração final de aproximadamente 10 mM. Complemente, então, os 5 CVs a serem utilizados para lavagem da coluna, com 20 mM de Imidazol, para ter concentração final de 30 mM, e com 50mM para ter 60 mM.

6. Elua a coluna de níquel com 2 CVs de tampão de eluição (O mesmo do primeiro IMAC, ou o tampão de diálise suplementado para Imidazol 300 mM). Esta fração irá conter os contaminantes, a TEV, e qualquer proteína alvo não digerida.
7. Meça a concentração de proteína das amostras *Flow-through*.
8. Corra um gel de SDS (SDS-PAGE) com todas as frações para acompanhar todo o processo, e decidir quais frações combinar para concentrar.
  - a. Amostras a serem submetidas à análise por SDS-PAGE:
    - i. IMAC: Lisado total (LT); Sobrenadante (S); *Flow-through* (FT); Eluição (E).
    - ii. IMAC Reverso: Eluição Digerida com TEV (E.TEV); *Flow-throughs* (FT e FT2); Lavagens (W30 e W60); Eluição (E).

#### **F. Estocagem - Concentração e ajuste de tampão – 4 horas**

1. Após verificar quais frações contém a proteína de interesse. Combine-as. A Bst-LF DNA Polimerase digerida aparece nas frações FT e FT2.
2. Adicione a mistura na câmara superior do concentrador (Pierce Concentrator 30K MWCO).

3. Centrifugue em ciclos por 10 minutos à velocidade de 3900 rpm a 4°C. Lembre-se de equilibrar a centrífuga. Ajuste a velocidade de centrifugação de acordo com as indicações do fabricante do concentrador e o modelo de centrífuga disponível.
4. Após cada ciclo de centrifugação, descarte o líquido acumulado na câmara inferior, e homogenize o material concentrado na câmara superior. Repita o processo até atingir o volume desejado de material concentrado.
5. Meça o volume e a concentração da proteína por absorbância a 280 nm.
6. Baseado nessas informações e na composição do tampão de estoque, calcule a quantidade de cada um dos componentes a ser adicionado nessa solução, para se obter estoque de proteína a 0.2 mg/mL (concentração sugerida de estoque).

Ex.: 5 mL de proteína a 2 mg/mL. Diluir 1:10 para alcançar 0.2 mg/mL, com volume final de 50 mL. Ajustes estão discriminados abaixo:

Componente	[ ] atual	[ ] após diluição	[ ] desejada	Ajuste
Tris-HCl	10 mM	1 mM	10 mM	9 mM (Adicionar 0.45 mL de estoque a 1M)
KCl	200 mM	20 mM	50 mM	30 mM (Adicionar 1.5 mL de estoque a 1M)
DTT	-	-	1 mM	1 mM (Adicionar 50 µL de estoque a 1M)
Triton X-100	-	-	0,1 %	0,1% (Adicionar 50 µL de estoque a 100%)
Glycerol	10%	1%	50%	49% (Adicionar 24,5 mL de estoque a 100%)
Água				Completar q.s.p. 50 mL

7. Após corrigir a composição do tampão, manter a solução sob agitação à 4°C, até alcançar completa homogeneidade.
8. Aliquotar como preferir, manter resfriado a -20°C até o uso.

## Referências

ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 6069-6074, 1990.



BHADRA, Sanchita; RIEDEL, Timothy E.; LAKHOTIA, Simren; TRAN, Nicholas D.; ELLINGTON, Andrew D. High-surety isothermal amplification and detection of SARS-CoV-2. **mSphere**, v. 6, n. 3, 2021.

BURGESS-BROWN, N. A.; MAHAJAN, N. P.; STRAIN-DAMERELL, C.; GILEADI, O.; S. GRÄSLUND, S. Medium-throughput production of recombinant human proteins: protein production in *E. coli*. **Methods in Molecular Biology**, p. 73-94, 2014.

TOSARINI, Thalita Ravazo; RAMOS, Priscila Zonzini; PROFETA, Gerson Souza; BARONI, Renata Moro; MASSIRER, Katlin B.; COUÑAGO, Rafael M; MONDEGO, Jorge M.C. Cloning, expression and purification of kinase domains of cacao PR-1 receptor-like kinases. **Protein Expression and Purification**, v. 146, p. 78-84, Junho, 2018.

MILLIGAN, John N.; SHROFF, Raghav; Daniel J. GARRY; ELLINGTON, Andrew D. Evolution of a thermophilic strand-displacing polymerase using high-temperature isothermal compartmentalized self-replication. **Biochemistry**, v. 57, p. 4607-4619, 2018.

STRAIN-DAMERELL, C.; MAHAJAN, P.; GILEADI, O.; BURGESS-BROWN, N. A. Medium-throughput production of recombinant human proteins: ligation-independent cloning. **Methods in Molecular Biology**, p. 55-72, 2014.