

Comparação de diferentes meios de cultura para bactérias *Escherichia coli* para aumento de expressão do antagonista de prolactina humana delta 1-9 G129R-hPRL recombinante.

Stephanie Angelo Pomin e Miriam Fussae Suzuki
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio proteico da família das citocinas, que possui massa molecular de 23 kDa, além de 199 aminoácidos e três pontes dissulfeto entre as cisteínas 4-11, 58-114 e 191-199 [1]. É secretada pela adenohipófise e sua principal função é estimular a produção de leite nas glândulas mamárias no período gestacional [2]. Distúrbios em sua concentração sérica estão associados ao desenvolvimento de cânceres de mama e de próstata, além de artrite reumatóide, fibrose cística, entre outros. Alguns órgãos podem produzir esse hormônio localmente, e essa produção local, quando aumentada, resulta no desencadeamento de processos patológicos anteriormente citados. Resultados anteriores (período de julho/2018 a julho/2019) comprovaram que a temperatura de 35 °C favoreceu a expressão do antagonista de prolactina utilizando a cepa BL21 e o vetor pET25b(+) delta 1-9 G129R-hPRL. Porém a produtividade específica de 0,05 µg/ml/A600 pode ser melhorada alterando-se a composição do meio de cultura.

OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo comparar diferentes composições de meio de cultura para *Escherichia coli* de expressão na produção da molécula delta 1-9 G129R-hPRL.

METODOLOGIA

As bactérias *E.coli* da cepa BL21(DE), foram transformadas com o plasmídeo pET25b(+) delta 1-9 G129R-hPRL, assim como a cepa W3110 foi transformada com o plasmídeo λPL delta 1-9 G129R-hPRL, através do método de choque térmico. O inóculo das cepas transformadas foi feito em 3 meios de cultura: meio Luria Bertani (LB), LB 2X, e Terrific Broth (TB) chamado de “meio rico”, com crescimento a 30 °C overnight, e com a temperatura de expressão de 35 °C. O IPTG foi adicionado na concentração de 0,8 mM. A obtenção da proteína antagonista produzida em periplasma foi feita através do choque osmótico com solução de Tris-HCl sacarose 20% - pH de 7,5 (solução hipertônica), solução de EDTA 0,5 M – pH de 8,8 e tampão Tris-HCl - pH de 7,5 (solução hipotônica). Como métodos de caracterização da proteína, foi feito eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além da caracterização por *Western blotting* com a técnica de transferência semi-seca para a membrana de nitrocelulose. A cromatografia líquida de alto desempenho na fase reversa foi realizada com a utilização de uma coluna C4 Vydac 214TP54 (25 cm x 4,6 mm) com poros de diâmetro de 300 Å e partículas de diâmetro de 5 µm. O tampão utilizado foi Tris 0,05 M pH 7,5 e 28% N-propanol, fluxo de 0,5

ml/min, leitura em 220 nm, temperatura da coluna 45 °C.

RESULTADOS.

As amostras do fluido periplásmico em diferentes meios de cultivo obtidas por choque osmótico, foram analisadas em SDS-PAGE e *Western blotting* para identificar o antagonista (Figura 1 e 2). O meio de cultura LB 2X foi o que apresentou melhor desempenho.

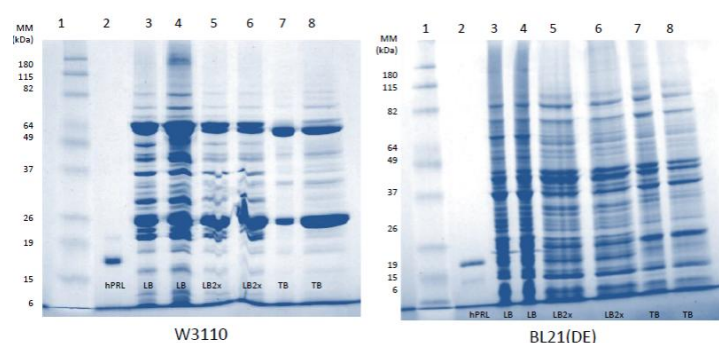


Figura 1 – SDS-PAGE com amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista $\Delta 1-9$ G129-hPRL obtidas através de diferentes meios. O SDS-PAGE da esquerda indicando a cepa utilizada (W3110) enquanto o da direita foi obtido da cepa BL21(DE)



W3110

Figura 2 - *Western Blotting* com amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista $\Delta 1-9$ G129-hPRL obtidas através de diferentes meios na cepa W3110.

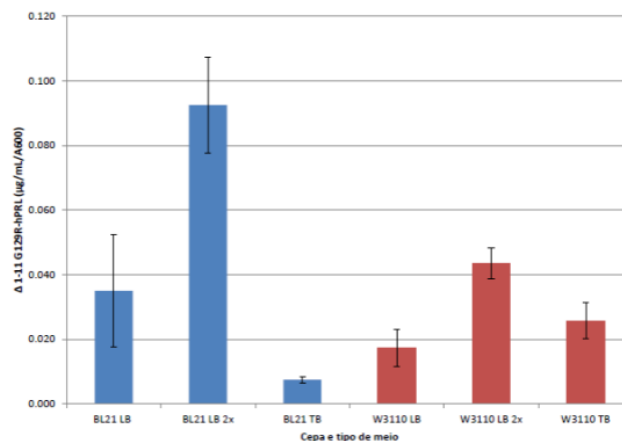


BL21(DE)

Figura 3 - *Western Blotting* com amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista $\Delta 1-9$ G129-

hPRL obtidas através de diferentes meios na cepa BL21(DE)

As amostras de fluido periplásmico foram analisadas em RP-HPLC, e quantificadas, os resultados estão apresentados no gráfico abaixo, com os respectivos meios de cultura das respectivas cepas.



CONCLUSÕES

O estudo avaliou e comparou três meios de cultura diferentes para a expressão da proteína. Em suma, o meio LB 2X, (duplamente concentrado, em relação ao LB) foi o que obteve melhores resultados para expressão da proteína antagonista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SINHA, Y. N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16, 354-69.
- [2] BERNICHTEIN, S., TOURAINE, P. & GOFFIN, V. 2010. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol*, 206, 1-11.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/ PROBIC.