

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROVÁVEL SERINO PROTEASE
EXTRACELULAR DE *Chromobacterium violaceum* EM *Escherichia coli*

Natália Pezzi Fachinelli

**Trabalho apresentado como um
dos requisitos para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas-Ênfase Molecular,
Celular e Funcional.**

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, novembro de 2006

BIO
BIO
392

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

Este trabalho foi integralmente realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela oportunidade, atenção e orientação na realização deste trabalho.

À colega e “mãe” Alessandra Morassutti, pelo auxílio e ensinamentos, principalmente nas etapas iniciais, pela amizade e por sua presença do início ao “fim” deste trabalho.

À Ana Luísa Ayub, a “AA”, pelo apoio e dicas precisas na reta final deste trabalho; pelos momentos de descontração e amizade.

Aos colegas do lab 206 e 210, funcionários do CBiot, e todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

À minha família e amigos, pela força e companheirismo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	9
1.2 PROTEASES.....	10
1.2.1 SERINO PROTEASES.....	11
1.3 OBJETIVO.....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 MANIPULAÇÃO BACTERIANA.....	14
2.1.1 LINHAGENS BACTERIANAS.....	14
2.1.2 CULTIVO BACTERIANO.....	14
2.1.3 ANTIBIÓTICOS.....	14
2.1.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	14
2.2 MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	15
2.2.1 DNA DE ORIGEM.....	15
2.2.2 AMPLIFICAÇÃO DA CDS DE cv2717.....	15
2.2.2.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	15
2.2.2.2 AMPLIFICAÇÃO.....	17
2.2.2.3 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR.....	17
2.2.2.4 REPARO DAS EXTREMIDADES.....	17
2.2.3 CLONAGEM EM VETORES PLASMIDIAIS.....	18
2.2.3.1 VETORES PLASMIDIAIS.....	18
2.2.3.2 EFICIÊNCIA DE CLIVAGEM E DESFOSFORILAÇÃO DE VETORES.....	18
2.2.3.3 LIGAÇÃO.....	19
2.2.3.4 SELEÇÃO DE RECOMBINANTES.....	19

2.2.3.5 ORIENTAÇÃO DO INSERTO NO VETOR PLASMIDIAL.....	19
2.2.4 SEQÜENCIAMENTO DO INSERTO CLONADO.....	19
2.2.5 ELETROFORESE DE DNA EM GÉIS DE AGAROSE	20
2.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	20
2.3.1 PRÉ -INÓCULO E INDUÇÃO.....	20
2.3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	20
2.3.3 ANÁLISE POR SDS-PAGE.....	21
2.3.4 WESTERN BLOT.....	21
2.3.5 TESTES PARA SOLUBILIZAÇÃO DE CV2717-GST.....	21
2.3.6 PURIFICAÇÃO DE CV2717-GST.....	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1 COMPARAÇÃO DE CV2717 DE <i>C. violaceum</i> COM A DE OUTROS ORGANISMOS.....	23
3.2 AMPLIFICAÇÃO DA CDS DE <i>cv2717</i> E CLONAGEM EM pGEX-4T-2.....	26
3.3 EXPRESSÃO DE CV2717 EM <i>E. coli</i>	27
3.4 PURIFICAÇÃO DE CV2717-GST.....	28
4. DISCUSSÃO.....	31
5. PERSPECTIVAS.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXO I.....	40
ANEXO II.....	41
ANEXO III.....	43
ANEXO IV.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDS: seqüência de DNA codificadora (do inglês, *coding DNA sequence*).
- CV2717: provável Serino Protease extracelular
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- GST: glutationa- S- transferase
- IgG: imunoglobulina de classe G
- IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
- kb: quilobase (mil pares de bases)
- kDa: quilodalton
- ORF: seqüência aberta de leitura (do inglês, *open reading frame*)
- pb: pares de bases
- PCR: reação em cadeia da DNA-polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
- pH: potencial hidrogeniônico
- SDS: dodecilsulfato de sódio
- SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

RESUMO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria gram-negativa de hábito saprófito, que vive em solos e águas de regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil é encontrada abundantemente nas águas do Rio Negro (Amazônia). Essa bactéria apresenta grande potencial para aplicações nas áreas de saúde, ecologia e indústria. Entre as potenciais aplicações encontram-se a produção de plásticos biodegradáveis, limpeza de áreas poluídas com metais pesados e acúmulo de partículas de ouro em áreas de mineração em processo livre de mercúrio. A partir do seqüenciamento completo do genoma de *C. violaceum* (GenBank AEO16825), realizado pela Rede Nacional do Projeto Genoma Brasileiro, surgiram muitas perspectivas para o entendimento deste organismo e seu potencial biotecnológico. Para a realização deste trabalho foi selecionada uma seqüência codificadora de interesse para a expressão em *Escherichia coli*: CV2717 - provável serino protease extracelular. A partir do DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472, a CDS de cv2717 foi amplificação por PCR e clonada em *blunt* no vetor de expressão pGEX-4T2. A expressão da proteína recombinante, na forma de fusão com glutathione-S-transferase (GST), se deu em condições de multiplicação celular a 37°C e de indução com 0,1 mM de IPTG por 3 h. Devido a expressão da proteína recombinante na fração insolúvel, diversas tentativas de solubilização foram testadas. A proteína recombinante foi visualizada na fração solúvel quando expressa na cepa AD494 de *E. coli*, após a utilização de detergentes sarcosil e Triton X-100. A proteína recombinante produzida será utilizada em ensaios funcionais para verificar a atividade de protease e posterior caracterização estrutural.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative bacterium with saprophytic habits, found in tropical and subtropical regions, including the water and banks of the Rio Negro (Amazonian). This bacterium reveals great potential for medical application, ecological and industrial purposes. Biodegradable plastic production, cleaning of areas polluted by heavy metals and solubilization of gold through mercury-free processes are among the possible uses of this organism. After the complete genome sequencing of *C. violaceum* (GenBank AEO16825), made by the Brazilian National Genome Project Consortium, many perspectives for the understanding of this organism and its biotechnological potential appeared. For this work, a coding sequence of interest (CV2717 – probable extracellular serine protease) was selected for expression in *Escherichia coli*. The strategy adopted for cloning was the amplification of the codifying sequence by PCR, and posterior blunt cloning in the pGEX-4T2 expression vector. The recombinant protein's expression, in the glutathione-S-transferase (GST) fusion form, happened in cell multiplying conditions at 37°C, and in induction conditions, with 0,1mM of IPTG for three hours. Due to the recombinant protein's expression in the insoluble fraction, many attempts of solubilizing were tested. This protein was seeing in the soluble fraction when expressed in the *E. coli* AD494 strain, after the employment of sarkosyl and Triton X-100 detergents. The recombinant protein may possibly be used in functional essays to verify the protease activity and for further structural characterization.

1.Introdução

1.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa descrita pela primeira vez em 1882 (BOISBAUDRAN, 1882) e hoje é classificada na classe Betaproteobacteria, na ordem Neisseriales, Família Neisseriaceae (GARRITY & HOLT, 2001). É um microorganismo de vida livre, de habito saprófito de águas e solos, encontrado em variados ecossistemas tropicais e subtropicais, como margens e águas do Rio Negro, afluente do Rio Amazonas (CALDAS, 1990). O produto mais notável produzido por este microorganismo é um pigmento violeta escuro, nomeado violaceína, isolado pela primeira vez em 1944 (STRONG, 1944), e quimicamente caracterizado poucos anos depois (BALLANTINE *et al.*, 1958). Tem sido proposta como função biológica da violaceína a proteção contra radiação visível (MARGALITH, 1992) bem como uma possível ação antioxidante (KONZEN *et al.*, 2006).

As propriedades terapêuticas deste pigmento têm sido objeto de estudos desde a década de 1970. Entre essas propriedades, destaca-se a atividade antimicrobiana contra importantes causadores de doenças como *Mycobacterium tuberculosis* (SOUZA *et al.*, 1999); *Trypanosoma cruzi* (DURÁN *et al.*, 1994) e *Leishmania sp.* (LEON *et al.*, 2001). A violaceína é também reconhecida por apresentar atividade bactericida (LICHSTEIN & VAN DE SAND, 1945; CALDAS, 1990), antiviral (RETTORI & DURÁN, 1998) e anti-tumoral (UEDA *et al.*, 1994; MELO *et al.*, 2000). Outros aspectos do potencial biotecnológico deste microorganismo têm sido explorados, como a síntese de bioplásticos, polihidroxialcanoatos de cadeia curta (PHAs) (FORSYTH *et al.*, 1958); hidrólise de filmes plásticos (GOURSON *et al.*, 1999) e extração de ouro em processos livre de mercúrio, evitando assim, a contaminação ambiental (SMITH & HUNT, 1985; CAMPBELL *et al.*, 2001).

Embora *C. violaceum* seja considerado um microorganismo saprófito, é também apontado como patógeno oportunista de animais e humanos, com a maioria dos casos de infecção acometendo recém nascidos e indivíduos imunodeprimidos (RICHARD, 1993).

O genoma de *C. violaceum* cepa ATCC 12472, isolada de águas frescas de Mentekab (Malásia), inteiramente seqüenciado pela Rede Nacional do Projeto Genoma Brasileiro,

revela genes de notável interesse biotecnológico, farmacêutico e ecológico (VASCONCELOS *et al.*, 2003). A cepa ATCC 12472 foi escolhida pela Rede por ser a cepa tipo (SNEATH, 1984) e por ter sido utilizada em vários estudos no Brasil durante as últimas três décadas (CALDAS *et al.*, 1978; DURÁN *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 1999; LEON *et al.*, 2001).

1.2 Proteases

Proteases (também denominadas peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que rompem ligações peptídicas em proteínas. Catalisam a hidrólise de proteínas (característica que as inclui na classe das hidrolases) em um processo chamado clivagem proteolítica. Essas enzimas são essenciais para a sobrevivência de todos os tipos de organismos e representam aproximadamente 2% do número total de proteínas codificadas por esses (BARRET *et al.*, 2003). São de grande relevância em processos fisiológicos, como: ativação e inativação de enzimas, tanto no que diz respeito a vias de sinalização, quanto na proteólise limitada de formas protéicas zimogênicas; coagulação sangüínea; processamento, transporte e secreção de proteínas.

As proteases integram um dos três maiores grupos de enzimas de uso industrial e representam aproximadamente 60% das enzimas vendidas mundialmente (RAO *et al.*, 1998). A grande diversidade de proteases existentes atrai o interesse biotecnológico devido às suas aplicações na indústria de alimentos, detergentes e artefatos de couro, substituindo produtos químicos de considerável toxicidade (ALLEN *et al.*, 1986).

Baseado no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases são classificadas em 4 grupos principais: serino proteases, aspartato proteases, cisteíno proteases, e metaloproteases (BARRET *et al.*, 2003). Com base na seqüência de aminoácidos, proteases são classificadas em diferentes famílias (ARGOS, 1987) e também subdivididas em “clãs” que acomodam conjuntos de peptidases que divergiram a partir de um ancestral comum (RAWLINGS & BARRET, 1993). Cada família de peptidases tem sido indicada por uma letra código que denomina o tipo de catálise, i.e., S, C, A, M, ou U para serino, cisteíno, aspartato, metalo, ou tipo desconhecido (do inglês *unknown*) respectivamente.

1.2.1 Serino proteases

Serino proteases pertencem a uma classe de peptidases que se caracterizam pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo. Com base na similaridade estrutural, serino proteases têm sido agrupadas em 20 famílias, as quais são subdivididas em 6 clãs (BARRET, 1994), destes, os dois principais são: tipo (químico) tripsina (SA) e tipo subtilisina (SB), sendo que este último é composto apenas pela família S8, a qual inclui as subtilases. Estes clãs apresentam mecanismo de ação comum, o qual consiste em uma tríade catalítica de aminoácidos, serina (nucleófilo), aspartato (eletrófilo), e histidina (basófilo). Embora a orientação geométrica destes resíduos seja similar, o dobramento protéico é bastante diferente, formando um típico exemplo de evolução convergente. Outra característica interessante das serino proteases é a conservação de resíduos de glicina ao redor do resíduo catalítico de serina formando o motivo Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly (BRENNER, 1988).

O mecanismo catalítico é baseado na chamada tríade catalítica, composta pelos aminoácidos histidina (His), serina (Ser) e ácido aspártico (Asp). Dentre esses “aminoácidos-chave”, cada qual exerce um papel essencial na capacidade de clivagem da enzima (FASTREZ & FERSHT, 1973):

- A serina possui um grupo hidroxila (-OH) capaz de atuar como nucleófilo, atacando o carbono que possui a carbonila (-C =O) na ligação peptídica a ser clivada;
- A histidina, com o par de elétrons desemparelhados no átomo de nitrogênio, tem a capacidade de receber o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila da serina, enquanto coordena o ataque à ligação peptídica;
- O ácido aspártico, com seu grupo carboxila (-C-OH), forma pontes de hidrogênio com a histidina, tornando muito mais eletronegativo o par de elétrons mencionado acima.

Durante a catálise, ocorre um mecanismo ordenado no qual vários intermediários são gerados: o substrato (polipeptídeo a ser clivado) liga-se à protease; sua metade amino-terminal é liberada; outro substrato (nesse caso, uma molécula de água) liga-se à enzima; e finalmente, a metade carboxi-terminal é liberada.

A síntese de peptidases na forma de precursores é uma das maneiras de regular a atividade de hidrolítica da enzima, prevenindo assim a degradação indesejada de proteínas celulares (LAZURE, 2002). Algumas serino proteases do tipo subtilisina, são sintetizadas

intracelularmente como um precursor conhecido como pré-prosubtilisina, onde a pré-seqüência e pro - seqüência estão localizados na extremidade amino terminal da proteína madura (WELLS *et al.*, 1983). A preprosubtilisina é então translocada através da membrana celular com auxilio do pré-peptídeo (ou peptídeo sinal), ativada após remoção autocatalítica do pro-peptídeo e então secretada no meio extracelular (POWER *et al.*, 1986) (Figura 1). A pro-seqüência é essencial para a produção da enzima na forma madura e ativa, atuando no dobramento correto do domínio protéico (IKEMURA & INOUE, 1988; ZHU *et al.*,1989). A pro-seqüência funciona como uma chaperona intramolecular (ZHU *et al.*, 1989), mas não é necessária no funcionamento enzimático da proteína após seu dobramento correto (SHINDE & INOUE, 1993). Em diversos estudos sobre expressão de serino proteases do tipo subtilisinas em *E. coli*, a prosubtilisina é processada até a forma ativa de subtilisina (TERADA *et al.*, 1990; PEEK *et al.*, 1993). No entanto é conhecido enzimas do tipo subtilisina que são ativamente expressadas como proteínas recombinantes em *E. coli*, mesmo apresentando a pro- seqüência (GODDE C. *et al.*, 2005). Neste caso, a pro- seqüência não atua como uma chaperona intramolecular (KANNAN Y. *et al.*, 2001)

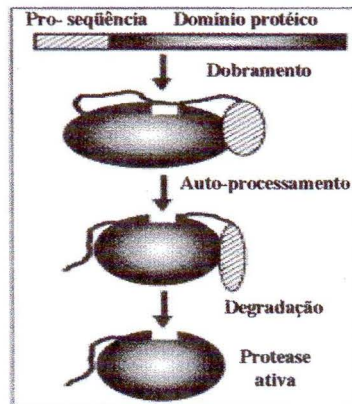


Figura1. Esquema representando as etapas de ativação de proteases que apresentam pro-seqüência: a pro-seqüência auxilia o dobramento correto do domínio protéico; ocorre a clivagem autocatalítica da pro-seqüência e esta é então degradada.

1.3 Objetivos

Os dados gerados pelo seqüenciamento indicam que a versatilidade apresentada por *C. violaceum* é dependente de um grande e complexo genoma composto de ORFs que revelam a habilidade do organismo interagir e responder ao ambiente. A análise do genoma revela ainda, o potencial biotecnológico de *C. violaceum*, como enzimas de uso industrial, farmacológico e medicinal.

A partir do conhecimento e análise da CDS de uma provável serino protease extracelular de *C. violaceum*, este trabalho se propõe a dar início a caracterização desta proteína através de sua clonagem e expressão em *E. coli*. As etapas envolvidas na realização deste propósito são:

- projeção de oligonucleotídeos com base na seqüência de cv2717 disponível a partir do seqüenciamento da cepa ATCC 12472;
- amplificação da CDS correspondente à cv2717 através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- clonagem em vetor de expressão para produção heteróloga de CV2717 em *E. coli*.

2. Matérias e Métodos:

2.1 Manipulação bacteriana

2.1.1 Linhagens bacterianas

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho estão citadas abaixo seguidas de aspectos relevantes de seus genótipos:

- *E. coli* BL21: F⁻, ompT, gal, dcm, hsd_β(r_β⁻ m_β⁻)tonA.

- *E. coli* AD494: Δara-leu7967, ΔlacX74, ΔphoAPvuII phoR ΔmalF3 F'[lac+(lacIq)pro] trxB::kan.

A linhagem *E. coli* AD494, cepa mutante para tioredoxina redutase (trxB), foi utilizada no intuito de facilitar a expressão da proteína recombinante na fração solúvel (DERMAN *et al.*, 1993).

2.1.2 Cultivo bacteriano

Para o cultivo de *E. coli* o meio de cultivo utilizado foi LB (Luria-Bertani) com pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N. Este meio é composto de triptona (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e NaCl (10g/L), sendo que para o preparo do meio sólido era adicionado 15g/L de ágar granulado. Os reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Merck.

2.1.3 Antibióticos

De acordo com as características do vetor e das cepas utilizadas, quando apropriado, foram utilizados os antibióticos ampicilina (Calbiochem) e cloranfenicol (Invitrogen) nas concentrações de 50μg/mL e 34μg/mL respectivamente.

2.1.4 Transformação bacteriana

As células eletrocompetentes para transformação foram preparadas seguindo o protocolo descrito no Anexo I, adaptado de SAMBROOK & RUSSELL (2001). Para a preparação de células competentes, além do meio LB, também foi utilizado o meio GYT, composto por glicerol 10%, extrato de levedura 0,125% e triptona 0,25%. As transformações foram feitas por eletroporação sendo empregadas células eletrocompetentes previamente preparadas. As células transformadas foram espalhadas em meio LB após uma hora de crescimento em meio rico.

2.2 Manipulação de ácidos nucleicos

2.2.1 DNA de origem

Foi utilizado o DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472 (GenBank n° de acesso AE016825) para as etapas de amplificação da CDS de cv2717.

2.2.2 Amplificação da CDS de cv2717

2.2.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Foi utilizado Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) para a projeção dos oligonucleotídeos (*primers*) de acordo com a CDS de cv2717 identificada no seqüenciamento da cepa ATCC 12472 de *C. violaceum*. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores são as que seguem:

Primer Senso: 5' atgctggcgctggcctcgct 3'

Tamanho: 20 pb Tm: 59,36°C

Primer Antisenso: 5' ctcgagtctgcgctccggtggcc 3'

Tamanho: 24 pb Tm:61,56°C

O tamanho e temperatura ótima teórica de hibridização (Tm) de cada primer estão indicados abaixo de suas seqüências e os locais de anelamento na seqüência nucleotídica estão representada na Figura 2.

1 atgctggcgctggcctcgctggccagccatgcccggcctccgcccggatcgcagcgtc
1 MLALASLASHAAPSAPDRSV
61 ccgctgctgcccggcgaccactggccaa tcaacaatggcatctgaagaacaccggccag
21 PLLPGDPLANQQWHLKNTGQ
121 actgccttctccaagcgcggcggtcaagggcgctcgatctcaacctcgcggttaccat
41 TAFSKRGGVKGVLDLNLAFTH
181 ctgcccggcatccgcgactcggcaccacca tgcgctgatcgacgacggcctggagatc
61 LRGIRGLGTTIAVIDDLEIK
241 aagcaccctgatctggcggcaacatcgtgcccggctccaaaaacctggtggacggcagc
81 HPDLAANIVPGSKNLVDGSN
301 aatgacccgagcccctccggtgacaatggccacggcaccgctggcggcatcgcggcc
101 DPSPSGDNGHGTAVAGIAAA
361 gcggtggccttcaacggcataggcggcggcggcatcgcgcttccgcccggcctgaaaggc
121 VAFNGIGGRGIAPSAAGLKGFF
421 ttcaactggctgctgaaccaaactgctggacggctggttgcctggcccacggcaagaaccc
141 NWLLNQTLDGWLLAHGKKPN
481 aatggcggctccgctggaagccttcaccgacgcccggcttcaaccagagttacggctcc
161 GGPLEAFTDARVFNQSYGSS
541 tccaccatcacctcggttcccggcaatccggatcaggacatcgagctgaagaccgaggag
181 TITSVPANPDQDIELKTEE
601 gaaacctacgaggacatcagccgcaacagccactggggcgcgggcggtcttcgtcaaa
201 TYEDISRNSHWGRGAVFVKS
661 tccgcccggtaatgcctacaactccttccgctgaaccagaccgagctccctgctcggttat
221 AGNAYNSFRLNQTESLLGYQ
721 cagggcaataaccggctgcccatacaggactccaaacctgacttccgacaaacaactac
241 GNNGLPIQDSNLTSNNDNNY
781 tggaaactggtggtatcggcgtgaacggcggacggcgtgctcctcgactcgtcggtc
261 NVVVSALNADGVRSSSYSSVG
841 ggcgcaactgctgctcaccgcccaggcggcgaatacggcaccgactcccggccatg
281 ANVLLTAPGGGEYGTDSPAMV
901 gtcaccacggactgctcggctgcccggcgtacaacgtcaccggcaacaccggccaa
301 TTDLSGCARGYNVTGNTANG
961 ggctgcaacggcggcaccgctggaccgcaactgcgactacaacggcgtcagaaaggc
321 LHGGTALDPNCDYNGVMNGT
1021 acctgctccgcccggcgtccaaacctcggctccttccgctgctgatgctggccaaaccc
341 SSAAPSTSGSFAVVMNSANPA
1081 gccctgctccgcccggcagctgcccacatcctgatcaccaccgctcggcaggttgacgg
361 LSARDVRHILITARQVDA
1141 gcgaatccggcgtgacgctcgccttcaaggacaagaacggcggcggcgcagctaccag
381 NPGVTLAFKDKNGGAHSYQA
1201 gcatccccggctggcagaagaatgcccggcggcctgccttccaccggcttaccggctt
401 IPGWQKNAAGLPHFPFYGFG
1261 ggtctgatcaatacgcacaaagcgggtgaaaaggcttggcttacaacaagccgctgccc
421 LINIDKAVEKALFYNKPLPP
1321 ccgctgcaaaagaccgctgggaaaccgtatccgcccagaccgcaattcccagcggcat
441 LQKTRWETVSAQTAIPDADE
1381 gaaaaaggcgtggaagcgtgtacaaccagccggcagacctgacggtggaagccgctccag
461 KGVESVYNQPADLTVEAVQI
1441 atcctggtcgatgccgaacacggcccggcacaacgatctggcgggtggaactgatctccc
481 LVD AEHGRANDLA VELISPS
1501 tccggcaccgctcgggtgctgctgctcctccgcccacctccctggttggcgaacacctagg
501 GTRSVLLSPRTSLVGETYGL
1561 ctcaaccagcagcgcctgctgtccaatcagttctacggcgaacaggccaaggccagtg
521 NQQRLLSNQFYGEQAKGQWR
1621 cggctgcccgtgatcgacacaaatggcggccagttaccaatacgtgacccgcaatcgcaac
541 LRVIDTNGGQYQYVIRNRNT


```

1681 accggcgccaacaccgtctattccctgcctaaccgcggaaggtaaactgaaatcgtggtcg
561 G A N T V Y S L P N A E G K L K S W S I
1741 atccgctttcttcggccaccggagcgcagca
581 R F F G H R S A A

```

Figura 2. Seqüência nucleotídica e seqüência deduzida de aminoácidos da ORF de cv2717 de *C. violaceum* (GenBank n° de acesso AE016825). Em negrito regiões de anelamento dos *primers senso* e *antisense*, respectivamente.

2.2.2.2 Amplificação

A seqüência referente à CDS de cv2717 foi amplificada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) adaptado de SAMBROOK & RUSSEL (2001). Para as reações de amplificação foi utilizada além da enzima *Platinum® Taq* DNA-polimerase *High Fidelity* (Invitrogen) a solução PCRx *Enhancer* (Invitrogen) que facilita a eficiência de amplificação de seqüências ricas em GC. O equipamento utilizado nas reações foi o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os programas empregados estão descritos no Anexo II.

2.2.2.3 Purificação dos produtos de PCR

Para a etapa de clonagem da CDS de cv2717 no vetor plasmidial, as seqüências amplificadas por PCR foram purificadas por eletroforese e excisão de gel de agarose a 0,8%, seguida de passagem por coluna de purificação de DNA (GFX, MOBIO), de acordo com o manual do fabricante.

2.2.2.4 Reparo de extremidades

O reparo das extremidades de produtos de amplificação foi feito com uso da enzima Fragmento Klenow da DNA-polimerase I (Fermentas) para tornar as extremidades cegas, uma vez que a enzima *Platinum® Taq* DNA-polimerase *High Fidelity* adiciona um resíduo de adenina na extremidade 3'. A enzima polinucleotídeo-quinase (PNK; Fermentas) foi utilizada para que ocorresse a adição de um grupo fosfato à extremidade 5'. As condições de reação foram àquelas recomendadas pelos fabricantes.

2.2.3 Clonagem em vetor plasmidial

2.2.3.1 Vetor plasmidial

Foi utilizado o vetor pGEX-4T-2 (GE Healthcare) clivado com a enzima Sma I (Fermentas) para gerar extremidades cegas. Após a clivagem, o vetor foi tratado com SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, USB) para desfosforilação das extremidades 5' e assim evitar sua religação durante a reação de ligação. A Figura 3 ilustra o sítio múltiplo de clonagem do vetor e o sítio de restrição da enzima utilizada na clivagem.

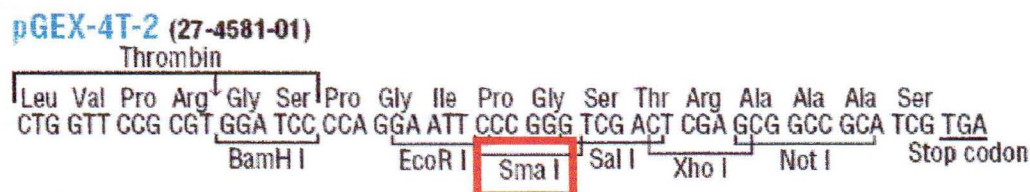


Figura 3: Sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pGEX-4T-2; retângulo vermelho indica sítio de restrição da enzima SmaI. Adaptado do manual do plasmídeo (AMERSHAM, 2003).

2.2.3.2 Eficiência da clivagem e desfosforilação do vetor

A eficiência da clivagem do vetor utilizando a enzima *SmaI*, seguido da desfosforilação da extremidade 5' com SAP, foi testada através do espalhamento em placas de LB sólido de células transformadas com plasmídeo clivado (sem inserto) e células transformadas com vetor parental. O cálculo foi feito estimando-se o número de colônias para uma mesma quantidade de vetor (clivado ou não) transformado. O valor final era dado por:

$$\left(\frac{\text{n}^\circ \text{ de col. plasmídeo parental} - \text{n}^\circ \text{ de col. plasmídeo clivado}}{\text{n}^\circ \text{ de col. plasmídeo parental}} \right)$$

onde n° de col. é número de colônias relativo gerado a partir de cada plasmídeo, sendo o resultado expresso em percentual.

2.2.3.3 Ligação

A reação de ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. A proporção molar inserto: vetor foi de 3:1, como recomendado por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

2.2.3.4 Seleção de recombinantes

A seleção de recombinantes se deu através da preparação plasmidial (*mini-prep*, ver Anexo III), clivagem com enzimas de restrição e análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

2.2.3.5 Orientação do inserto no vetor plasmidial

Para verificar a orientação do inserto no vetor plasmidial foi feito PCR utilizando *primer 5'* do vetor e *primer 5'* ou *3'* do inserto, sendo então considerada a orientação “correta” (produto amplificado numa reação contendo *primer 5'* vetor + *primer 3'* do inserto) ou “invertida” (produto amplificado numa reação contendo *primer 5'* do vetor + *primer 5'* do inserto) (Figura 4).

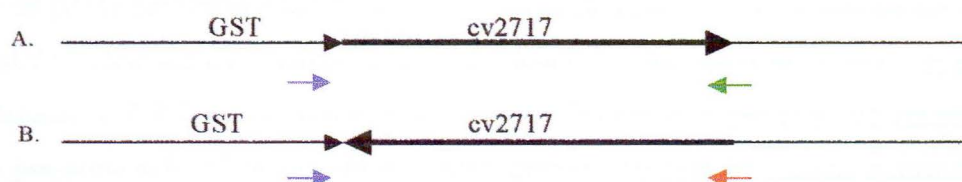


Figura 4: Esquema de parte do vetor pGEX-4T-2 contendo a ORF de cv2717 na orientação correta (A) e invertida (B); \rightarrow *primer 5'* vetor; \leftarrow *primer 3'* inserto e \leftarrow *primer 5'* inserto.

2.2.4 Seqüenciamento do inserto clonado

Foi feito seqüenciamento do fragmento ligado no vetor pGEX-4T-2, utilizando os *primers 3'* e *5'* do vetor na reação de seqüenciamento. O seqüenciamento foi conduzido no

seqüenciador MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando os reagentes e protocolos recomendados pelo fabricante.

2.2.5 Eletroforese de DNA em géis de agarose

As análises de DNA por eletroforese foram feitas em géis de agarose (Merck) na concentração de 0,8%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e conduzidas em voltagens variando de 70-100V. Foi utilizado TEB como tampão de corrida (Anexo IV).

2.3 Expressão de proteínas

2.3.1 Pré-inóculo e indução

E. coli BL21 eletrotransformadas com pGEX-4T-2::cv2717 foram inoculadas em meio LB contendo ampicilina a partir do pré -inóculo crescido *overnight* (O/N, ~16 horas) a 37° C°. Foi adicionado IPTG, para a indução da expressão da proteína recombinante, no momento em que a densidade ótica à 600 nm (OD₆₀₀) do inóculo alcançou valor entre 0,5 e 0,8 (~3 horas). Foram utilizadas diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM – 1,0 mM) nos diferentes tubos de crescimento bacteriano, deixando uma duplicata de cada um deles sem adição de IPTG (controle negativo). Como forma de controle da expressão foi utilizado *E. coli* BL21 eletrotransformadas com pGEX-4T-2. As células foram coletadas por centrifugação a 7.000 g por 10 min e ressuspensas em PBS (Anexo IV). As células foram lisadas por sonicação (5 pulsos de 40 - 60A durante 30 seg) utilizando o aparelho VIBRA CELL™ e centrifugadas a 20.000 g por 30min. Alíquotas de 1 mL foram recolhidas ao longo do período de indução para posterior análise em gel de poliacrilamida –SDS.

2.3.2 Preparação das amostras

As amostras recolhidas ao longo do tempo de indução da proteína recombinante (1mL), foram centrifugadas por 10 min a uma velocidade de 14.000 rpm e ressuspensas em 100µL tampão PBS.

2.3.3 Análise por SDS-PAGE

As amostras foram analisadas por eletroforese sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 10% e 12%, contendo SDS, sob voltagem de 70V a 100V. O extrato protéico total (12 μ L de amostra acrescido de 4 μ L de tampão de corrida 4x – Anexo IV) foi aquecido a 100°C por 5 min e então aplicado no gel com uma faixa de empacotamento de 4mm, onde a concentração de poliacrilamida era de 4%. As bandas de proteínas foram detectadas depois de coradas com *Coomassie blue* (WEBER & OSBON, 1969).

2.3.4 Western blot

Após SDS-PAGE da proteína recombinante, as amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a uma voltagem de 70V por 1 h, e a eficiência da transferência foi verificada por coloração da membrana com vermelho de *ponceau* (Anexo IV) de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001). Após a transferência a membrana foi lavada em PBS e bloqueada durante 1 h em temperatura ambiente com solução bloqueio (Anexo IV). Ao término dessa etapa a membrana foi incubada por 2 h com anticorpo primário anti-GST diluído em 1:500 em solução bloqueio (v/v). A membrana foi lavada 3 vezes com TPBS (Anexo IV) e incubada por 1 h com anti- IgG de rato conjugado com peroxidase. Após 3 lavagens com TPBS, a membrana foi incubada numa solução substrato fresca (5mg de diaminobenzidine e 150 μ L de peróxido de hidrogênio em 30 mL de PBS) por 10 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida por lavagens com água destilada.

2.3.5 Testes para solubilização de CV2717-GST

Na tentativa de solubilizar a proteína recombinante CV2717-GST expressa na fração insolúvel, foram utilizadas as seguintes estratégias listadas na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Testes para solubilização de CV2717-GST.

Estratégia	Concentração/condição	Procedimento
Solubilização <i>in vitro</i>		
Detergentes e surfactantes		
Triton X-100 (Merck)	1% e 2%	Adicionado após sonicação. Agitação em gangorra por 30min a temperatura ambiente (~20-4°C).
CHAPS (Merck)	2%	Adicionado após sonicação. Agitação em gangorra por 30min a temperatura ambiente (~20-24°C)
Sarcosil (Sigma)	1%	Após centrifugação do cultivo celular, pellet ressuspendido em PBS 1:10 de cultura (v/v). Adicionado lisosima (100µg/mL), 15' no gel. Adicionado sarcosil e 5mM DTT Sonicar células e adicionar Triton X-100 2%.
	1,5 %	Após centrifugação do cultivo celular, pellet ressuspendido em 75 µL de STE (Anexo 4) contendo 100ng/mL de lisosima para cada mL de cultura 15' no gelo. Adiciona 5mM DTT e sarcosil. Sonicar, centrifugar e adicionar 3% de Triton X-100.
Agentes Caotrópicos		
Uréia (Invitrogen)	8M	Adicionado após sonicação, junto com Triton X-100 2% e β-mercaptoetanol 1%. 1h de agitação, centrifugação a 20000g por 5min. Sobrenadante dialisado a 4°C contra tampão de diálise por 16h
Hidrocloreto de guanidina (GibcoBRL/Life Technologies)	6M	Adicionado após sonicação, junto com Triton X-100 2% e β-mercaptoetanol 1%. 1h de agitação, centrifugação a 20000g por 5min. Sobrenadante dialisado a 4°C contra tampão de diálise por 16h
Solubilização <i>in vivo</i>		
Temperatura reduzida	25°C	Expressão a 25°C; 0,1-1mM IPTG; 3-5h de indução.
Cepa <i>E.coli</i> AD494 (Novagen)	37°C	Expressão a 37 °C; 0,1mM IPTG; 3h de indução.

2.3.6 Purificação de CV2717-GST

Para purificação de CV2717-GST foi utilizada a coluna de afinidade a GST Glutathiona Sefarose 4B (Amersham Biosciences) de acordo com o manual do fabricante. Após passagem do sobrenadante, a coluna foi incubada por 15 minutos com glutathiona reduzida para posterior eluição de CV2717-GST.

3. Resultados

3.1 Comparação de CV2717 de *C. violaceum* com a de outros organismos

Foi feito o alinhamento da seqüência de aminoácidos, deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos, da CV2717 de *C. violaceum* com seqüências presentes em bancos de dados com o auxílio da BLASTP (NCBI, 2006). O resultado indicou que o grau de identidade entre a seqüência da provável serino protease extracelular de *C. violaceum* com serino proteases de outras espécies bacterianas varia de 47% (61% de similaridade), em *Shewanella sp.*, a 54% (67% de similaridade), em *Pseudoalteromonas tunicata*, ficando com valores em torno de 50% (64% de similaridade) para a grande maioria dos demais ortólogos analisados. Domínios putativos conservados foram detectados, como a domínio peptidase S8, presente em membros da família subtilase, apresentando aproximadamente 240 aminoácidos (resíduos na seqüência: de 51 a >291); e o P-domínio da proproteína convertase, apresentando aproximadamente 110 resíduos (resíduos na seqüência: de 475 a 585) localizados imediatamente *downstream* ao domínio catalítico. Utilizando o programa PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>) foi possível inferir a região conservada de cada resíduo formador da tríade catalítica de serino protease - ácido aspártico (D), histidina (H) e serina (S)- (Figura 5). A análise da localização celular da proteína indica localização citoplasmática e improvável presença de peptídeo sinal (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>).

V.alginolyticus	-----MEIRINRL	8
V.parahaemolyticus	-----METRFNRL	8
P.tunicata	-----MILRKS-L	7
Shewanella	MRMSIVALSIITAALLAGCGSDDKKAPAPVPKVNTAPTTADMTVDVVSQSIL	80
CV2717	-----MLALASLA	8
A.sobria	-----MKQTSALALAITALLSTL	17
A.hydrophila	-----MKQTSALALAITALLSTL	17
:		
V.alginolyticus	FAAMLAVG-----	16
V.parahaemolyticus	FAAMLAVG-----	16
P.tunicata	LASSIALL-----	15
Shewanella	FTGKLEASDAEGGLTYSLVDPADLKLGTFTLVNKSTGEFTYASDASEGTE	100
CV2717	SHAAPSAP-----	16
A.sobria	PSALVQANEG-----	C 28
A.hydrophila	PSALVQANEG-----	C 28

V.alginolyticus -----IAP-----AVSAFDPLYSEQWHLNNTGQTAFANPAVAG 50
V.parahaemolyticus -----LAP-----AVSAFDPLYSEQWHLNNTGQTAFANPAVAG 50
P.tunicata -----ISANAVADITNSTFALAGGDPLTPQQWHLQNTGQSGFSLNNGIAG 60
Shewanella VVRFKVSQGQLQAEANLITINIKHGDP LFTYQWHLKNTGQNAFAAHRGVAG 150
CV2717 -----DRSVPLLPDGPLANQQWHLKNTGQTAFSKRGGVKG 51
A.sobria APLTGKESGMDIGRSSTERCLPGANPLQDQWYLLNSGQDGFSAARGGIAG 78
A.hydrophila APLTGKESGMDIGRSSTERCLPGANPLQDQWYLLNSGQDGFSAARGGIAG 78
: : ** ** * * : * : *

V.alginolyticus ND LNTKLTQAMGIAGVGVKVAVIDSGVQIDHPDLAGNIVTG-SRNFVEDS 99
V.parahaemolyticus ND LNTKLTQAMGIAGVGVKVAVIDSGVQIDHPDLAGNIVTG-SRNFVEDS 99
P.tunicata ND LLDLDFAHLMGIKGRGITVAVIDSGVEISHPDLKANVAVG-SLNVDAGS 109
Shewanella EDMNVSGAMSAQAMGQDITVAVVDDGLEIAHPDLMNNTVNGGSYNLITGT 200
CV2717 VDLNLAFTHLRGI RGLGTT **I AVIDDGLE IKH**PDLAANI VPG-SKNLVDGS 100
A.sobria ND LNLWWAHR TGVLGHGVNVAVVDDGLAIAHPDLADNVRPG-SKNVVTGS 127
A.hydrophila ND LNLWWAHR TGVLGHGVNVAVVDDGLAIAHPDLAENVRPG-SKNVVTGS 127
* : : * . . : * * * * * * * * * * . . :

V.alginolyticus SFPPSYVDNTNGHGTAVAGLI SAVGNNGEGGRGVASHSSLIGFNWLAN-- 147
V.parahaemolyticus LFPPSYVDNTNGHGTAVAGLI SAVGNNGEGGRGVASRSSLVGFNWLAN-- 147
P.tunicata ----DFPTDLNNGHGT SVAGLIAAVEGNGIGGRGVAPLASLVGFNPLAN-- 153
Shewanella VDPTPFSGKS-GHGTAVGGIIAAEGWNGIGGRGVAPKAKLIGFNFLDQDP 249
CV2717 ND--PSPSGDNG**HGTAVAGIAAA**VAFNGIGGRGIAPSAGLKGFNLLN-- 146
A.sobria DDPTPTDPDT-GHGT SVSGIIAAVD-NAIGTKGIAPRAQLQGFNLLDDNS 175
A.hydrophila DDPTPTDPDS-AHGT SVSGIIAAVD-NAIGTKGIAPRAQLQGFNLLDDNS 175
. * * * * * : * * . * * * * * : * * * * * :

V.alginolyticus -----QTLEGWLI SHGMDPATR-----DVRVFNQSYGFSPINPITFD 184
V.parahaemolyticus -----QTLEGWLI SHGMDPATR-----DVRVFNQSYGFSPINPIAFD 184
P.tunicata -----QTVASWLIVSHGLSEDFRALDRFTDPRVFNQSYGSTPATPRAYD 196
Shewanella TGKVENVQTFENFAKSHGASAYS-----SARVFNQSYGYSVFPDVF 293
CV2717 -----QTLDGWLLAHGKPKNGGPLEAFTDARVFNQSYGSTITSVPAN 189
A.sobria Q-----QLQKDWLYALGDSNASR-----DNRVFNHSYRMSVVDPRSAN 213
A.hydrophila Q-----QLQKDWLYALGDSNASR-----DNRVFNQSYGMSVVDPRSAN 213
* . : : * . . * * * * * : : . :

V.alginolyticus -ESDPQLKLEMDVMKNVSNNAWGRGAVFVKSAGNGYRYFNAG-RFFVLP 232
V.parahaemolyticus -ENDPQFKLEMDVMQNVSETNAWGRGALFVKSAGNGYRYFNTG-RFFVLP 232
P.tunicata YVTNPFLELTDQVQADI SLNSHWGRGAVYVKSAGNSFGSYTTAYRGQLIQ 246
Shewanella -----EDET EYVQDIATQSF DKGSI FVKSAGNGYNYRFR-TFWLPG 335
CV2717 PDQDIELKTEEETEDI SRNSHWGRGAVFVKSAGNAYNSFRLNQTESLLG 239
A.sobria -----SLDQSLDRLFEQQTLKAQGAAYIKAAGNGFNKIAAG-GYVLNR 256
A.hydrophila -----SLDQSLDRLFEQQTLKVQGAAYIKAAGNGFNKIAAG-GYVLNG 256
: . . : * : * * * * * : :

V.alginolyticus SNFFAGG---DNQGLPMHNSAQSYDNANYFNLVLSALRADGTRASYSSVG 279
V.parahaemolyticus SDFFAGG---GNQGLPMHNSAQSYDNSSYFNLVLSALRADGTRASYSSVG 279
P.tunicata VLPYEGGQFYNNGLPFHSANISTDNNNYWNLVVSAINAEGKLSYSSVG 296
Shewanella DYFTATAGNPANHGLPFHNSNMSSDNANVYNLVVSAINAKGELSSYSSVG 385
CV2717 YQ-----GNNGLPIQDSNLTSDNNNYWNVVVSALNADGVRSSYSSVG 281
A.sobria TG-----NGPKLPFENSNLDPNSNFWNLVVSALNADGVRSSYSSVG 298
A.hydrophila TG-----NGPKLPFENSNLDPNSNFWNLVVSALNADGVRSSYSSVG 298
. * * : : . * . : * * * * * : * * * * * :

V.alginolyticus SNVWVAAPAGEYQDFPAMVTTDLMGCEEGQNTSDGLGINGLHGGT-ELD 328
V.parahaemolyticus ANVWVAAPAGEYQDFPAMVTTDLMGCEEGQNTSDGLGINGLHGGT-ELD 328
P.tunicata SSVFLSAPGGEYGTDSPAMVTIDLTGCDKGMNVAGDH-PNALHGGT-ELD 344
Shewanella SNIFVTAPGGEYGDNDPAIVTIDRMGCENGYAIAEDRPSTPFHGGNPLN 435
CV2717 ANVLLTAPGGEYGTDSPAMVTTDLSGCARGYNVTGNT-ANGLHGGT-ALD 329
A.sobria SNIFLSATGGEYGTDTFAMVTTDLPGCDMGYNRTDDPSTNRLHGN-QLD 347
A.hydrophila SNIFLSATGGEYGTDSPAMVTTDLPGCDMGYNRTDDPSTNRLHGNP-QLD 347
: . : * * * * * * * * * * * * * * : . . : * * * * * :

V. alginolyticus	PNCNYTSTMNGTSSAAPNTSGAIAAIMSTNHALSARDVRRALLAETAKVTD	378
V. parahaemolyticus	PNCNYTSTMNGTSSAAPNTSGAIAAIMSTNHALSARDIRALLAETARVTD	378
P. tunicata	PNCYDNGTMNGTSSAAPNTSGAIATIMSANHALDARTVRRHLLAQTARKTD	394
Shewanella	SNCDYTSTMNGTSSAAPNTSGAVAVIMSANPDLRDRVRYILLAKTATKVD	485
CV2717	PNCYDNGVMNGTSSAAPSTSGFAVMSANPALSARDVRRHLLITTARQVD	379
A. sobria	ASCDYNGVMNGTSSATPSTSGAMALLMSAYPDLRDLRDLARSATRV	397
A. hydrophila	ASCDYNGVMNGTSPSTPSTSGAMALLMSAYPDLRDLRDLARSATRV	397
	..*:*...*****.:*.***:*.***:* *.*:*:* *.*.*	
V. alginolyticus	KAHPGVQLEFTNHKGEQVSYEAIAPWQKNAAGVDFHTFYGFGAVDLDEAM	428
V. parahaemolyticus	AEHPGVQLEFTNNKGEVLSYEAIAPWQKNAAGVNFHTFYGFGAVDLDEAM	428
P. tunicata	PTNQGVDLTFENAQGEVVTYNAVPGWQTNAAGYNFHHFYGLGVIDVDAV	444
Shewanella	TDIAPKTVTIGEGEAAPV-YTAIPGWLQNAAGFSFHNLYGFRVLDLTEAV	534
CV2717	AANPGVTLAFKDKNGGHSYQAIIPGWQKNAAGLPFFHFFYGFGLINIDKAV	429
A. sobria	AKHQPVMSYTSSTGKVRDVKGLEGWERNAGMWFSPTYGFGLIDVKNAL	447
A. hydrophila	AKHQPVMSYTSSTGKVRDVKGLEGWERNAGMWFSPTYGFGLIDVKNAL	447
	: : *	
V. alginolyticus	QRARMTNRVLPQTQVITPWVNN---ATEVSVPDASLVGGSSSIAIADELTV	475
V. parahaemolyticus	KRARMTNNVLPQIITPWANN---ATEVSVPDASLAGSSNIAITDDITV	475
P. tunicata	YKALFTGVSPLKLIQITDWWST---QANVEIPDASLVGQSAINVEQALTV	491
Shewanella	RLAKSYAEDLDGYVVTIEWQASP---ALTKAIPDADVNGVTDQVVDLVI	582
CV2717	EKALFYNKPLPPLQKTRWETV---SAQTAI PDADEKGVESVYNQPADLTV	476
A. sobria	ELAAN-HQPLPPLVQLPWQKINVTGSAAAIADVGNSTPSTSTTRIATPLTV	496
A. hydrophila	ELAAN-HQPLPPLVQLPWQKINVTGSAAAIADVGNSTPSTSTTRIATPLTV	496
	* *	
V. alginolyticus	ESVQVTLTLDHARLPDLAIELISPSGTRSVLQTPRNLVGGQSLDS-----	520
V. parahaemolyticus	ESVQVKLTLEHSRLPDLAIELVSPSGTRSVLQTPRNLVGGQSLDP-----	520
P. tunicata	ESVQVKLNIDHSRLRDLAIELVSPSGTRSVLMSARTGFLGG-----	532
Shewanella	EAVQIELTADHLRPLDLAVELISPAQTKSVLMTYPYNGLVYQGVMDKNDPK	632
CV2717	EAVQILVDAEHGRANDLAVELISPSGTRSVLLSPRTSLVGET-----	518
A. sobria	EAVQVMVSLDHQRLPDLLELVSPAGTRSILLSPFNSLVGGQSLDQQQLGF	546
A. hydrophila	EAVQVMVSLDHQRLPDLLELVSPAGTRSILLSPFNSLVGGQSLDQQQLGF	546
	::* : : *	
V. alginolyticus	-SITGYKDQLMLSNQFYGEDAKGEWTLRAIDTNGDEVYSYIAYFN--SST	567
V. parahaemolyticus	-NITGYENQLMLSNQFYGENAKGEWTLRAIDTNGDEVFSFIAYFN--SSA	567
P. tunicata	-NDGGYTDAVMLNNHFYGEQAQGEWTLNVIDT--DKGTSYTLGFNP-ALG	578
Shewanella	DLVTGYDATPMLSNAFYGESSKGEWTKLIDVN--SGSYSFIFKFDK-GTT	679
CV2717	---YGLNQQRLLSNQFYGEQAKGQWRRLRVIDTNGGQYQYVIRNRNTGANT	565
A. sobria	VRTKGLRDMRMLSNKFYGESAQGTWRLEVTDVANGTRQVSLNRETRERT	596
A. hydrophila	VRTKGLRDMRMLSNKFYGESAQGTWRLEVTDVANGTRQVSLNRETRERT	596
	* : *	
V. alginolyticus	IYDVPMANNAQPGVIKNWSMRIFGH-----	592
V. parahaemolyticus	IYDVPMANNAKPGVIKNWSMRIFGH-----	592
P. tunicata	LIGFNSRNNEIAGVLKDWIRIFGH-----	603
Shewanella	PIAIP---NEADGKLGWSIRFHGHAAKSAS	707
CV2717	VYSLP---NAEGKLSWSIRFFGHRSA--	590
A. sobria	TLTER---NNRQPGKLSWSLRVLGHANRS-	624
A. hydrophila	TLTER---NNRQPGKLSWSLRVLGHANRS-	624
	* : *	

Figura 5: Alinhamento da seqüência de aminoácidos de CV2717 de *C. violaceum* e seis outros organismos: *Vibrio alginolyticu*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Pseudoalteromonas tunicata*; *Shewanella sp.*; *Aeromonas sobria*; *Aeromonas hydrophila*. Aminoácidos em vermelho são as regiões conservadas ao redor dos três resíduos catalíticos: ácido aspártico (D), histidina (H) e serina (S), respectivamente. Legenda: “ * ” = todos resíduos da coluna são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; “ : ” substituição conservada de resíduos é observada e “ . ” substituição semi-conservativa de resíduos é observada.

3.2 Amplificação da CDS de cv2717 e clonagem em pGEX-4T2

Para amplificação da CDS de cv2717 foram testadas diferentes concentrações da solução PCRx *Enhancer* em relação ao volume final da reação (Figura 6). Utilizando solução PCRx *Enhancer* 2x o volume final da reação, foi obtido um produto de amplificação de tamanho mais específico. Quando utilizada a solução PCRx *Enhancer* 3x o volume final da reação, nenhum produto amplificação foi visualizado, provavelmente devido a interferência desta solução na reação de amplificação. A eficiência de clivagem do vetor foi de >90%. Foi feita a ligação do vetor com o inserto e os produtos de ligação foram introduzidos em *E. coli* BL21 por eletrotransformação. Diversas colônias foram visualizadas na placa, porém na análise de 30 colônias, somente 6 eram clones recombinantes e 1 estava na orientação “correta” após análise em gel de agarose da PCR utilizando *primer* 5’ do vetor e *primer* 3’ de cv2717 (Figura 7). A clonagem na orientação “correta” da CDS de cv2717 foi confirmada por seqüenciamento.

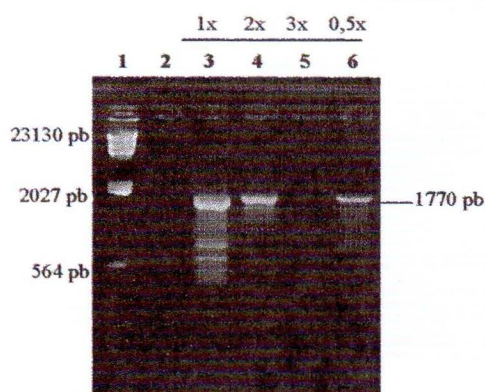


Figura 6: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do produto amplificado através da técnica de PCR: marcador de tamanho λ HindIII; (2) controle negativo(sem DNA); (3-6) amplificação de cv2717 (1770pb) utilizando diferentes concentrações da solução PCRx *Enhancer* em relação ao volume da reação.

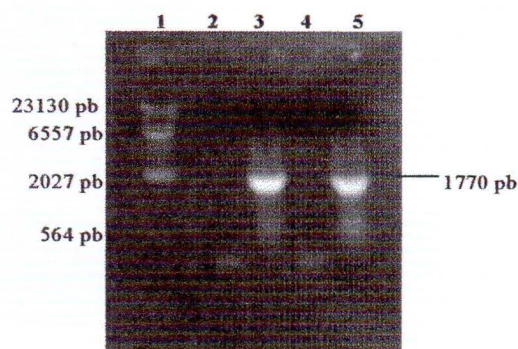


Figura 7: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR do clone recombinante de cv2717: (1) marcador de tamanho λ HindIII; (2) controle negativo (sem DNA); (3) *primers* 5’ e 3’ de cv2717; (4) *primer* 5’ vetor e *primer* 3’ cv2717; (5) *primer* 5’ vetor e *primer* 3’ cv2717.

3.3 Expressão de CV2717 em *E. coli*

E. coli cepa BL21 contendo o plasmídeo recombinante pGEX-4T-2:: CV2717 foi propagada como descrito em materiais e métodos. Das concentrações de IPTG testadas para indução da expressão da proteína recombinante 0,1mM foi a que apresentou melhor resultado, a 37°C durante 3 h. A proteína de fusão (CV2717-GST) pode ser visualizada em gel SDS-PAGE apresentando a massa molecular esperada de 89 kDa (Figura 8). Foi realizado um *western blot* com anticorpo anti-GST para se confirmar a expressão da proteína recombinante. Após a incubação da membrana de nitrocelulose na solução substrato fresca, foi visualizada uma banda intensa na altura aproximada de 89 kDa e outras bandas, de menor intensidade, em alturas inferiores, o que provavelmente indica produtos de degradação (Figura 9).

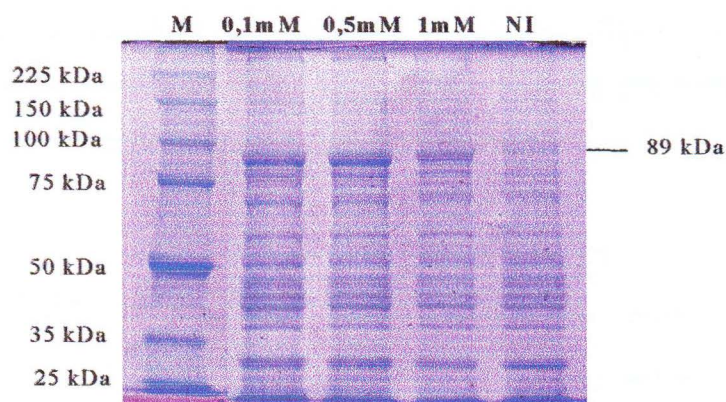


Figura 8: Análise por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue de extratos de *E. coli* BL21 portadora de pGEX-4T-2:: CV2717 (89kDa), induzidos em diferentes concentrações de IPTG (0,1mM-1mM) por 3 h a 37°C e não induzido (NI); marcador de massa molecular (M).

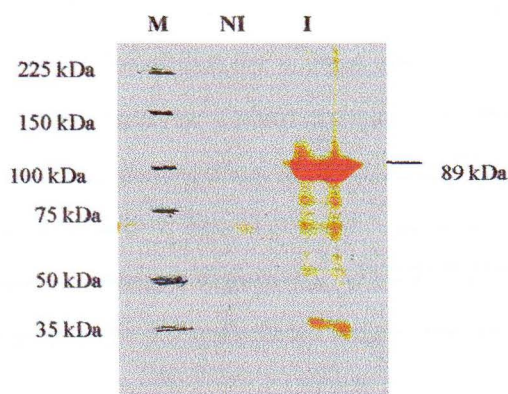


Figura 9: Western blot para detecção de CV2717-GST. Após SDS-PAGE, amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose: (M) marcador de massa molecular; (NI) pGEX-4T-2:: CV2717 não induzido; (I) pGEX-4T-2:: CV2717 induzido (89kDa).

3.4 Testes para solubilização de CV2717-GST

Elevada proporção de CV2717-GST foi detectada na fração insolúvel após lise celular por ultrassom. Testes na tentativa de solubilização de CV2717-GST foram realizados conforme descritos na Tabela 1 em Materiais e Métodos (Figura 10). Das tentativas realizadas apenas uréia 8M foi capaz de solubilizar a proteína por completo, no entanto CV2717-GST não foi capaz de se ligar na resina cromatográfica.

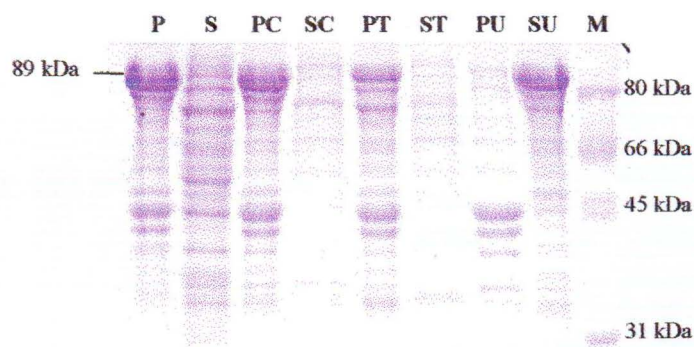


Figura 10: Análise por SDS-PAGE 12% das tentativas de solubilização da CV2717-GST (89kDa): (P) *pellet* extrato total após lise celular; (S) sobrenadante extrato total após lise celular; (PC) *pellet* após tratamento com CHAPS 2%; (SC) sobrenadante após tratamento com CHAPS 2%; (PT) *pellet* após tratamento com Triton 2%; (ST) sobrenadante após tratamento com Triton 2%; (PU) *pellet* após tratamento com uréia 8M; (SU) sobrenadante após tratamento com uréia 8M; (M) marcador de massa molecular..

Na tentativa de melhorar as condições de expressão visando à obtenção de CV2717-GST na forma solúvel, foi utilizada a cepa de *E. coli* AD494. Nessa cepa foi detectada CV2717-GST na fração solúvel, porém em quantidade reduzida (Figura 11). Com o intuito de aumentar a quantidade da proteína na forma solúvel, foram utilizados Triton X-100 e sarcosil em diferentes concentrações, seguindo os procedimentos listados na Tabela 1 (Materiais e Métodos). Como mostra a Figura 12, CV2717-GST foi detectada em maior quantidade na fração solúvel quando submetido ao tratamento com sarcosil a 1,5% e Triton X-100 a 3%.

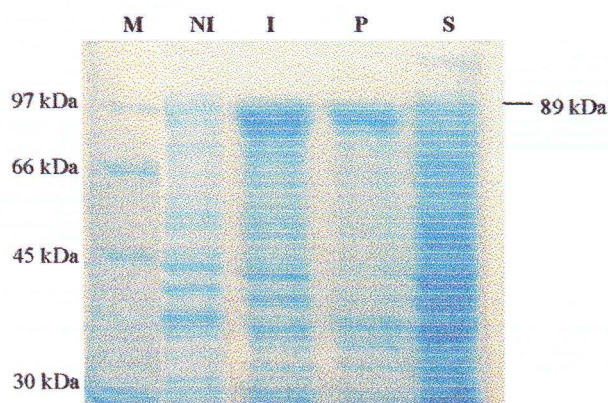


Figura 11: Análise por SDS-PAGE 12% da expressão de CV2717-GST na cepa de *E. coli* AD494 induzido por 0,1mM de IPTG durante 3h a 37°C. (M) Marcador de massa molecular; (NI) não induzido; (I) induzido; (P) *pellet* após lise celular; (S) sobrenadante após lise celular.

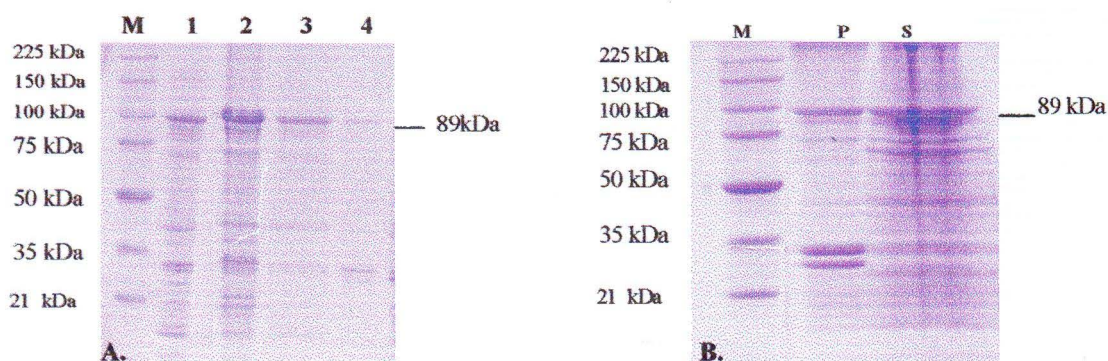


Figura 12: Análise por SDS-PAGE 10% da solubilização parcial de CV2717-GST : (M) marcador de massa molecular; A. (1) extrato total após 3h de indução a 37°C com 0,1mM de IPTG; (2) extrato total após lise celular; (3) sobrenadante após tratamento com 1,5% de sarcosil e 3% de triton X-100; (4) *pellet* após tratamento com 1,5% de sarcosil e 3% de triton X-100; B. (P) *pellet* após tratamento com 1% de sarcosil e 3% de triton X-100 a ; (S) sobrenadante após tratamento com 1% de sarcosil e 3% de triton X-100.

Após passagem da fração solúvel da proteína recombinante, tratada com 1,5% de sarcosil e 3% de Triton X-100, CV2717-GST foi eluída após incubação com glutatona reduzida por 15 minutos. A proteína recombinante, no entanto, foi visualizada numa quantidade muito reduzida após análise em SDS-PAGE (Figura 13).

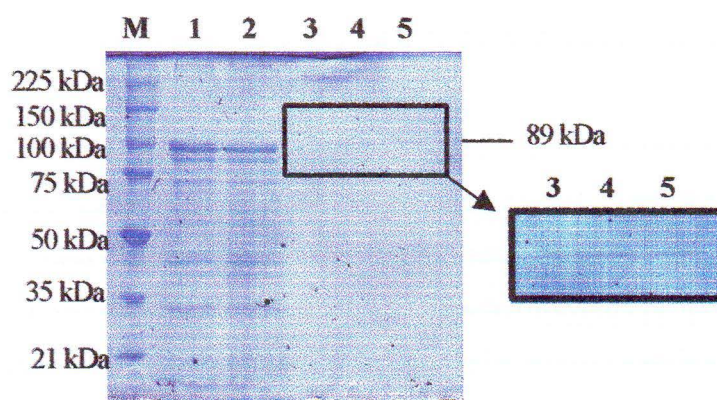


Figura 13: Análise por SDS-PAGE 10% da etapa de purificação de CV2717-GST: (M) marcador de massa molecular; (1) sobrenadante extrato total antes da passagem pela coluna; (2) sobrenadante extrato total após passagem pela coluna; (3) resina cromatográfica; (4) 1ª eluição de CV2717-GST; (5) 2ª eluição de CV2717-GST.

4. Discussão

Após seqüenciamento completo do genoma de *C. violaceum* (GenBank nº de acesso AE016825), e análise desse genoma, a CDS denominada cv2717 foi anotada como uma provável serino protease extracelular. A partir do DNA genômico desse organismo, a CDS cv2717 foi amplificada por PCR e o fragmento clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2. A orientação correta para expressão do clone pGEX-4T-2::CV2717 foi verificada por PCR e pelo seqüenciamento.

E. coli BL21 contendo o plasmídeo pGEX-4T-2::cv2717 foi propagado em meio de cultivo e a proteína recombinante analisada em gel de poliacrilamida- SDS corado com *Coomassie blue*. O fato da proteína recombinante fusionada a GST ser expressa no tamanho de 89 kDa, sugeri a não ocorrência da clivagem autocatalítica da proproteína. O domínio da proproteína em CV2717 está localizado na extremidade carboxi terminal da proteína madura, diferindo assim da maioria das subtilases que apresentam a proproteína na extremidade amino terminal da proteína madura (WELLS *et al.*, 1983). No entanto a proproteína também é encontrada na extremidade carboxi terminal da proteína madura, onde desempenha importante papel na secreção de proteínas (Lee *et al.*, 1994), uma vez que o peptídeo sinal pode não estar presente, como é o caso da provável serino protease extracelular de *C. violaceum*.

A proteína recombinante permaneceu na fração insolúvel, corroborando com o modelo proposto por Wilkinson e Harrison para um cálculo teórico da porcentagem da solubilidade de proteínas recombinantes expressas no citoplasma de *E. coli* (WILKINSON & HARRISON, 1991). Segundo o modelo de Wilkinson e Harrisonm, CV2717 apresenta 91.3% de chance de insolubilidade quando superexpressa em *E. coli*. Um *webserver* para o cálculo proposto por esse modelo é disponível em <<http://www.biotech.ou.edu>>.

A produção de proteínas heterólogas em *E. coli* para estudos bioquímicos e, principalmente, estruturais, ainda é uma tarefa bastante dificultada pela série de fatores que podem interferir na obtenção da proteína pura e ativa a partir de sistemas de expressão heterólogos (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005). Um desses fatores pode ser o acúmulo da proteína recombinante em agregados insolúveis conhecidos como “corpos de inclusão”, onde, em geral, a proteína se encontrada biologicamente inativa (VILLAVERDE &

CARRIO, 2003). A literatura descreve numerosos métodos para solubilização de proteínas a partir de corpos de inclusão e processos onde a estratégia de expressão é modificada com a finalidade de obter a proteína expressa na fração solúvel. No entanto um passo limitante neste processo de solubilização de proteínas recombinantes é as características particulares de cada proteína, e para isso cada caso deve ser trabalhado isoladamente (SØRENSEN & MORTENSEN, 2005).

Das tentativas de solubilização *in vitro* de CV2717-GST, uréia a 8M, foi a única capaz de solubilizar por completo a proteína recombinante. Entretanto, após a diálise para retirada da uréia, a proteína foi incapaz de se ligar na coluna cromatográfica, podendo indicar que nestas condições a proteína não foi capaz de se renaturar completamente e corretamente.

Diferentes temperaturas de incubação foram testadas para tentar produzir a proteína na forma solúvel. Baixas temperaturas, 25°C, poderiam possibilitar a expressão da proteína na fração solúvel, uma vez que reações de agregação estão diretamente relacionadas com temperaturas elevadas (KIEFHABER *et al.*, 1991). Entretanto, a proteína continuou sendo expressada na fração insolúvel (resultados não mostrados).

Outra tentativa de melhorar a expressão da proteína na forma solúvel foi a utilização da cepa de *E. coli* AD494 (Novagen). Esta cepa é conhecida por permitir a formação de pontes disulfeto no citoplasma de *E. coli*, e assim favorecer o dobramento correto da proteína recombinante. A solubilização de CV2717-GST expressa em AD494, foi aumentada após tratamento com sarcosil a 1,5% e Triton X-100 a 3% (FRAGIONI & NELL, 1993). A análise em gel SDS-PAGE da etapa de purificação por cromatografia de afinidade a GST mostra a ineficiência da proteína de fusão se ligar a resina cromatográfica, provavelmente devido a interferência do processo de solubilização na ligação da proteína de fusão à resina. Após a etapa de purificação e clivagem da proteína recombinante com trombina, testes funcionais com a provável serino protease extracelular de *C. violaceum* podem ser realizados dando início à etapa de caracterização estrutural e funcional da proteína.

5. Perspectivas

- purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade e posterior clivagem da fusão com trombina; e
- ensaio funcional de serino protease utilizando azocaseína como substrato (PEEK *et al.*, 1992)

6. Referências bibliográficas

1. ALLEN, C., V. K.; STROMER, F. D.; SMITH, G. H. LACY, & M. S. MOUNT. Complementation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* protease mutant with a protease encoding cosmid. *Molecular Genetics and Genomics*, 202:276–279, 1986.
2. AMERSHAM. *GST Gene Fusion System Manual* (code number 18-1157-58), disponível em <<http://www.apczech.cz/pdf/Handbook-18-1157-58-GST.pdf>>. Acessado em 13/10/2006. Texto publicado em 2003.
3. ARGOS, P. A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *Journal of Molecular Biology*, 193(2):385–396, 1987.
4. BALLANTINE, J.A.; BEER, R.J.S.; CRUTCHLEY, D.J.; DODD, G.M.& PALMER, D.R. The synthesis of violacein and related compounds. *Proceedings, Chemical Society* : 232-233, 1958.
5. BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:1–15, 1994.
6. BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. & O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. *Journal of Structural Biology*, 134, 95–102, 2001.
7. BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.D. & WOESSNER, J.F. *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd ed. Academic Press, 2003.
8. BRENNER, S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 334(6182):528–530, 1988.
9. BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 94: 562-563, 1882.
10. CALDAS, L. R. Um pigmento nas águas negras. *Ciência Hoje*, 11: 56-67, 1990.
11. CALDAS, L. R.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, S. M. & TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. International Symposium on Current Topics Radiobiology and Photobiology, Rio de Janeiro, Brasil p. 121- 132, 1978.
12. CAMPBELL, S. C.; OLSON, G. J.; CLARK, T. R. & MCFETERS, G. J. Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3): 134–139, 2001.
13. DE SOUZA, A. O.; AILY, D.C.G.; SATO, D.N. & DURÁN, N. Atividade da violaceína *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 58:59-62, 1999.

14. DERMAN, A.I.; PRINZ, W.A.; BELIN, D. & BECKWITH, J. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 262(5140): 1744-1747, 1993.
15. DURÁN, N.; ANTONIO, R.V.; HAUN, M. & PILLI, R.A. Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 686-690, 1994.
16. DURÁN, N.; CAMPOS, V.; RIVEROS, R.; JOYAS, A.; PEREIRA, M.F. & HAUN, M. Bacterial chemistry. III. Preliminary studies on the trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 61(1): 31-36, 1989.
17. FASTREZ, J. & A. R. FERSHT. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*, 12(11):2025–2034, 1973.
18. FRANGIONI J, V. & NEEL, B. G. Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione *S*-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. *Analytical Biochemistry*, 210 (1) 179-187, 1993.
19. FORSYTH, W. G. C.; HAYWARD, A. C. & ROBERTS, J. B. Occurrence of poly- β -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *Nature*, 182(4638):800-801, 1958.
20. GARRITY, G. M. & HOLT, J.G. The road map to the Manual. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ed. Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. pp. 119–166. New York: Springer, 2001.
21. GODDE, C.; SAHM, K.; BROUNS, S.J.; KLUSKENS, L.D.; VAN DER OOST, J.; DE VOS, W.M. & ANTRANIKIAN, G. Cloning and Expression of Islandisin, a New Thermostable Subtilisin from *Fervidobacterium islandicum*, in *Escherichia coli*. *Applie and Environmental Microbiology*, 71(7):3951-3953, 2005.
22. GOURSON, C.; BENHADDOU, R.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; VERNEUIL, B.; BRANLAND, P.; CHAUVELON, G.; TRIBAULT, J. F. & SAULNIER, L. J. Valorization of maize bran to obtain biodegradable plastic films. *Journal of Applied Polymer Science*, 74: 3040-3045, 1999.
23. IKEMURA, H. & INOUE, M. In vitro processing of pro-subtilisin in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(26):12959–12963, 1988.
24. JANG, H.J.; KIM, B.C.; PYUN, Y.R. & KIM, Y.S. A novel subtilisin-like serine protease from *Thermoanaerobacter yonseiensis* KB-1: its cloning, expression, and biochemical properties. *Extremophiles* 6(3):233–243, 2002.

25. KANNAN, Y.; KOGA, Y.; INOUE, Y.; HARUKI, M.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M. & KANAYA, S. Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6):2445–2452, 2001.
26. KIEFHABER, T.; RUDOLPH, R.; KOHLER, H.H. & BUCHNER, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (NY)*, 9(9):825-829, 1991.
27. KONZEN, M.; DE MARCO, D.; CORDOVA, C.A.; VIEIRA, T.O.; ANTONIO, R.V. & CRECZYNSKI-PASA, T.B. Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(24):8307-8313, 2006.
28. LAZURE, C. The Peptidase Zymogen Proregions: Nature's Way of Preventing Undesired Activation and Proteolysis. *Current Pharmaceutical Design*, 8(7):511-531, 2002.
29. LEE, Y. C.; KOIKE, H.; TAGUCHI, H.; OHTA, T. & MATSUZAWA, H. Requirement of a COOH-terminal pro-sequence for the extracellular secretion of aqualysin-i (a thermophilic subtilisin-type protease) in *Thermus-thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters*, 120 (1-2): 69-74, 1994.
30. LEON, L. L.; MIRANDA, C. C.; SOUZA, A. O. & DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 449–450, 2001.
31. LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Disease*, 76: 47-51, 1945.
32. MARGALITH, P. Z. *Pigment Microbiology*; Chapman & Hall: London, 1992.
33. MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M. & DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 36: 539-543, 2000.
34. PEEK, K.; DANIEL, R.M.; MONK, C.; PARKER, L. & COOLBEAR, T. Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp. strain Rt41A. *European Journal of Biochemistry*, 207(3):1035–1044, 1992.
35. PEEK, K.; VEITCH, D.P.; PRESCOTT, M.; DANIEL, R.M.; MACIVER, B. & BERGQUIST, P.L. Some characteristics of a proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. Expressed in *Escherichia coli*: comparison with the native enzyme and its processing in *E. coli* and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1168–1175, 1993.

36. POWER, S.D.; ADAMS, R.M. & WELLS, J.A. Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83(10):3096–3100, 1986.
37. RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. & DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635, 1998.
38. RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal*, 290:205–218, 1993.
39. RETTORI, D. & DURÁN, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14:685-688,1998.
40. RICHARD, C. *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 86: 169-173, 1993.
41. SAMBRROK, J.& RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning*.3^a ed.3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
42. SHINDE, U. & INOUE, M. Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends in biochemical sciences*, 18(11):442–446, 1993.
43. SMITH, A. D. & HUNT, R. J. J. Solubilization of gold by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 35 (18): 110–116, 1985.
44. SNEATH, P.H.A. Genus *Chromobacterium* Bergonzini 1881, 153^{AL}. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N.H. & Holt, J.G., eds.). Vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, p. 580-582, 1984.
45. STEINBUCHER, A.; DEBZI, E. M.; MARCHESSAULT, R. H. & TIMM, A. Synthesis and production of poly (3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 443–449,1993.
46. STRONG, F.M. Isolation of violacein. *Science* 100: 287,1944.
47. TERADA, I.; KWON, S.; MIYATA, Y.; MATSUZAWA, H. & OHTA, T. Unique precursor structure of an extracellular protease, aqualysin I, with NH₂- and COOH-terminal pro-sequences and its processing in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (12) :6576–6581, 1990.
48. UEDA, H.; NAKAJIMA, H.; HORI, Y.; GOTO, T. & OKUHARA, M. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium*

violaceum no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(9):1579–1583, 1994.

49. VASCONCELOS, A.T.R.; ALMEIDA, D.F.; HUNGRIA, M.; GUIMARÃES, C.T.; ANTÔNIO, R.V.; ALMEIDA, F.C.; ALMEIDA, L.G.P.; ALMEIDA, R.; ALVES-GOMES, J.A.; ANDRADE, E.M.; ARARIPE, J.; ARAÚJO, M.F.F.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, V.; BAPTISTA, A.J.; BATAUS, L.A.M.; BATISTA, J.S.; BELÓ, A.; VAN DEN BERG, C.; BOGO, M.; BONATTO, S.; BORDIGNON, J.; BRIGIDO, M.M.; BRITO, C.A.; BROCCHI, M.; BURITY, H.A.; CAMARGO, A.A.; CARDOSO, D.D.P.; CARNEIRO, N.P.; CARRARO, D.M.; CARVALHO, C.M.B.; CASCARDO, J.C.M.; CAVADA, B.S.; CHUEIRE, L.M.O.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CUNHA-JUNIOR, N.C.; FAGUNDES, N.; FALCÃO, C.L.; FANTINATTI, F.; FARIAS, I.P.; FELIPE, M.S.S.; FERRARI, L.P.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T.; FRANCO, G.R.; FREITAS, N.S.A.; FURLAN, L.R.; GAZZINELLI, R.T.; GOMES, E.A.; GONÇALVES, P.R.; GRANGEIRO, T.B.; GRATTAPAGLIA, D.; GRISARD, E.C.; HANNA, E.S.; JARDIM, S.N.; LAURINO, J.; LEOI, L.C.T.; LIMA, L.F.A.; LOUREIRO, M.F.; LYRA, M.C.C.P.; MADEIRA, H.M.F.; MANFIO, G.P.; MARANHÃO, A.Q.; MARTINS, W.S.; MAURO, S.M.Z.; MEDEIROS, S.R.B.; MEISSNER, R.V.; MOREIRA, M.A.M.; NASCIMENTO, F.F.; NICOLÁS, M.F.; OLIVEIRA, J.G.; OLIVEIRA, S.C.; PAIXÃO, R.F.C.; PARENTE, J.A.; PEDROSA, F.O.; PENA, S.D.J.; PEREIRA, J.O.; PEREIRA, M., PINTO, L.S.R.C., PINTO, L.S.P., PORTO, J.I.R., POTRICH, D.P., RAMALHONETO, C.E.; REIS, A.M.M.; RIGO, L.U.; RONDINELLI, E.; SANTOS, E.B.P.; SANTOS, F.R.; SCHNEIDER, M.P.C.; SEUANEZ, H.N.; SILVA, A.M.R.; SILVA, A.L.C.; SILVA, D.W.; SILVA, R.; SIMÕES, I.C.; SIMON, D.; SOARES, C.M.A.; SOARES, R.B.A.; SOUZA, E.M.; SOUZA, K.R.L.; SOUZA, R.C.; STEFFENS, M.B.R.; STEINDEL, M.; TEIXEIRA, S.R.; URMENYI, T.; VETTORE, A.; WASSEM, R.; ZAHA, A. & SIMPSON, A.J.G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(20): 11660-11665, 2003.
50. VILLAVERDE, A. & CARRIO, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 25(17):1385-1395, 2003.
51. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16):4406–4412, 1969.
52. WELLS, J. A.; FERRARI, E.; HENNER, D. J.; ESTELL, D. A. & CHEN, E. Y. Cloning, sequencing and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 11(22):7911–7925, 1983.
53. WILKINSON, D.L. & HARRISON, R.G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)*, 9(5):443-448, 1991.

54. ZHU, X.; OHTA, Y.; JORDAN, F. & INOUE, M. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature*, 339 (6224):483–484, 1989.

ANEXO I

Protocolo de preparação de células competentes

(adaptado de SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Primeiro dia

1. Inocular 50 mL (2X 25 mL) de LB estéril, com uma colônia de *E. coli* selecionada com palito estéril, de uma placa de meio mínimo (ou de um estoque em glicerol).
2. Crescer com agitação *overnight* (O/N), 37°C.

OBS: no caso de um estoque em glicerol, crescer o pré -inóculo a partir deste (recuperar as colônias com uma alça ou 10 µL do estoque líquido). Se as células competentes forem preparadas a partir de uma alíquota de células competentes (40µL), é necessário incubá-las em meio LB, 37°C, 16h para que as mesmas se recuperem. Após este período, deve-se espalhar essas células em placas com meio (37°C, O/N) e só depois utilizá-las para o pré -inóculo.

Segundo dia

1. Transferir 25 mL do pré -inóculo para cada frasco de 500 mL de LB líquido;
2. Crescer com agitação a 37°C até atingir uma OD₆₀₀ de 0,4 (aproximadamente por 2 horas);
3. Deixar 30 minutos no gelo;
4. Transferir a cultura para 6 tubos de GSA (200 mL em 4 dos tubos e 100 mL em dois dos tubos) e equilibrar os tubos com a balança antes de centrifugá-los;
5. Centrifugar por 15 min, 5K, 4°C.
6. Verter o sobrenadante e suspender em 200 mL (4 dos tubos) e 100mL (2 dos tubos) de água Mili-Q ;
7. Centrifugar por 15 min, 5K, 4°C;
8. Desprezar o sobrenadante e ressuspender em glicerol 10% (70mL em 4 tubos e 60 mL em 2 tubos);
9. Juntar o material em 2 tubos de GSA (200 mL) cada;
10. Centrifugar por 15 min, 5K, 4°C;

11. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 10 mL de glicerol 10%;
12. Transferir a suspensão para 2 tubos SS-34 e centrifugar por 15min, 6K, 4°C;
13. Ressuspender o *pellet* em 1 mL de meio GYT gelado

Medir a OD₆₀₀ de uma diluição de 1:1000

Diluir para uma concentração de $2-3 \times 10^{10}$ cel/mL

1 OD₆₀₀ = $2,5 \times 10^8$ cel/mL

14. Antes de aliquotar as células, eletroporar 40 µL da suspensão e, caso estourem, lavar novamente com meio GYT.

15. Aliquotar em *eppendorfs* de 500 µL.

ANEXO II

Programa de PCR utilizado

Temperatura	Tempo	
95°C	5 min	
95°C	45 s	35x
67°C	45 s	
72°C	1 min e 30 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

ANEXO III

Protocolo de preparação plasmidial (*mini-prep* de lise alcalina)

(adaptado de SAMBROK & RUSSEL, 2001).

1. Inocular uma colônia em 3 mL de LB líquido contendo ampicilina (50 μ L /mL) e incubar a 37°C *overnight* com agitação;
2. Centrifugar todo o volume a 12.000 rpm por 2 min;
3. Desprezar o sobrenadante e lavar com 200 μ L de solução de lise I (glicose 50mM, Tris-Cl (pH 8.0) 25 mM e EDTA (pH 8.0) 10mM);
4. Centrifugar a 12.000 rpm por 2 min e desprezar o sobrenadante;
5. Ressuspender em 200 μ L de solução de lise I;
6. Adicionar 200 μ L de solução de lise II (NaOH 0,2 N e SDS 1%) preparada na hora e agitar gentilmente invertendo o tubo. Manter no gelo 15 min;
7. Adicionar 200 μ L de solução de lise III (acetato de potássio 3M) e agitar gentilmente invertendo o tubo;
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 2 min;
9. Transferir o sobrenadante para outro tubo, adicionar 1 volume de isopropanol gelado
10. Centrifugar a 12.000 rpm por 12 min;
11. Desprezar o sobrenadante, lavar com etanol 70% gelado (centrifugar a 12.000rpm por 2 min);
12. Desprezar o sobrenadante e secar a 37°C.
13. Depois de seco, ressuspender em 30 μ L de água Mili-Q, adicionar 2 μ L de RNase (10mM) e incubar a 37°C por 30-45 min;
14. Analisar o plasmídeo por eletroforese em gel de agarose.

ANEXO IV

Soluções e tampões

(adaptado de SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

7. PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Água destilada	para 1 L

Esterilizado por autoclavação

8. Tampão de corrida 4x para amostras de proteínas

Tris- HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10% (m/v)	1,6 mL
Beta- mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL
Água destilada	3,8 mL

9. TBE 5x (estoque)

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8.0	20 mL
Água destilada	para 1 L

Solução de uso diluída para 1 x

10. Solução de bloqueio

Leite em pó desnatado	5 g
PBS 1x	100 ml

11. Vermelho de *ponceau* 5%

Vermelho de <i>ponceau</i>	0,5 g
Ácido acético	1 ml
Água destilada	Para 100 ml

Solução de uso dilur 1:100

6. STE

Tris-HCL, pH 8,0	10mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM

7. TPBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Tween 20	0,1%
Água destilada	para 1 L