



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Conceitos Básicos da Genética

Atena
Editora
Ano 2019

Benedito Rodrigues da Silva Neto

(Organizador)

Conceitos Básicos da Genética

Atena Editora

2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Geraldo Alves
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)
<p>C744 Conceitos básicos da genética [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos do sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de Acesso: World Wide Web Inclui bibliografia. ISBN 978-85-7247-421-4 DOI 10.22533/at.ed.214192106</p> <p>1. Genética – Estudo e ensino. 2. Genética e melhoramento. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.</p> <p style="text-align: right;">CDD 576</p>
<p style="text-align: center;">Elaborado por Maurício Amormino Júnior CRB6/2422</p>

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Há exatos dezanove anos, mais precisamente na data de 21 de junho de 2000, um dos anúncios mais esperados nos últimos tempos pela comunidade científica era feito: simultaneamente nos Estados Unidos e em Londres o presidente Bill Clinton e o primeiro ministro Tony Blair divulgaram, o que segundo eles seria uma nova era para a humanidade, o sequenciamento do genoma humano. O “rascunho da vida” como denominaram traria novas expectativas quanto à doenças incuráveis, desafios éticos, novas propostas tecnológicas para a pesquisa, mas principalmente uma acessibilidade muito maior ao conceito de genética para a população.

Desde então uma revolução molecular pôde ser observada, novos conceitos adentraram às salas de aula, novos equipamentos evoluíram os laboratórios de pesquisa, novos e milhares de artigos passaram a publicar quase que “em tempo real” as descobertas no campo ambiental, microbiológico, industrial e da saúde. Podemos dizer também que a genética chegou como nunca às mesas das famílias, deixando de ser um assunto apenas dos cientistas.

Portanto a literatura aqui apresentada e intitulada “Conceitos básicos da genética” torna-se relevante não apenas por abordar assuntos relativos à comunidade acadêmica, mas principalmente por demonstrar a diversidade de áreas que hoje utilizam das ferramentas genéticas e moleculares em seus estudos que estão diretamente relacionados ao dia-a-dia da população.

Cada vez mais, o acelerado mundo das descobertas científicas caminha a passos largos e rápidos no sentido de transformar a pesquisa básica em aplicada, portanto é relevante destacar que investimentos e esforços nessa área contribuem grandemente com o desenvolvimento de uma nação. A genética como sabemos possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e tecnológicos.

Esperamos que seja apenas o primeiro de muitos outros livros na área, já que a cada dia novas tecnologias genéticas tornam-se acessíveis e novas descobertas são possíveis. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
FERRAMENTAS GENÔMICAS E GEOGRÁFICAS PARA AVALIAR A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES SUÍNAS	
<i>Elizabete Cristina da Silva</i>	
<i>Samuel Rezende Paiva</i>	
<i>Concepta Margaret McManus Pimentel</i>	
<i>Victor Huço de Vasconcelos Calado</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921061	
CAPÍTULO 2	12
A ABORDAGEM DE GENÉTICA SOB O OLHAR DOS DISCENTES DE ENFERMAGEM DE UMA INSTITUIÇÃO DE ENSINO SEMIPRESENCIAL NO MUNICÍPIO DE ANANINDEUA, ESTADO DO PARÁ	
<i>Letícia Gomes de Oliveira</i>	
<i>Maria Josilene Castro de Freitas</i>	
<i>Brena Yasmim Barata Nascimento</i>	
<i>Shirlene de Nazaré Costa da Silva</i>	
<i>Leandro Neves da Silva Costa</i>	
<i>Dolanno Ferreira Alves</i>	
<i>Adan Rodrigues de Oliveira</i>	
<i>Joycianne Rodrigues Parente</i>	
<i>Karina Guedes Lima</i>	
<i>Abigail das Mercês do Vale Batista</i>	
<i>Dayara de Nazaré Rosa de Carvalho</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921062	
CAPÍTULO 3	17
A GENÉTICA TOXICOLÓGICA E O BIOENSAIO <i>Allium cepa</i>	
<i>Schirley Costalonga</i>	
<i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921063	
CAPÍTULO 4	25
ANÁLISES GENÉTICAS NÃO INVASIVAS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DE FELINOS BRASILEIROS	
<i>Andiara Silos Moraes de Castro Souza</i>	
<i>Bruno Henrique Saranholi</i>	
<i>Pedro Manoel Galetti Jr</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921064	
CAPÍTULO 5	40
AVALIAÇÃO DA DISCIPLINA DE GENÉTICA HUMANA FRENTE ÀS DIRETRIZES CURRICULARES NACIONAIS PARA O CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA	
<i>Sulyanne Saraiva de Almeida</i>	
<i>Alcivan Batista de Moraes Filho</i>	
<i>João Paulo da Silva Liberalino</i>	
<i>Sandy Albuquerque Silveira</i>	
<i>Bruna Prado de Oliveira</i>	
<i>Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes</i>	
DOI 10.22533/at.ed.2141921065	

CAPÍTULO 6 54

CITOGENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO SULFATO DE COBRE EM DIFERENTES VARIEDADES DE *allium cepa* LINN

Júlio Brando Messias
Rosanne Lopes de Brito
Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão
Inalda Maria de Oliveira Messias
Mônica Simões Florêncio
Betty Rose de Araújo Luz
Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha
Mércia Cristina de Magalhães Caraciolo
João Ferreira da Silva Filho

DOI 10.22533/at.ed.2141921066

CAPÍTULO 7 65

COMO SURGEM NOVAS ENZIMAS? EVOLUÇÃO MOLECULAR DE NOVAS CÓPIAS GÊNICAS NA SUPERFAMÍLIA DAS RODANASES EM DIPTERA

Luana Sousa Soares
Iderval da Silva Júnior Sobrinho

DOI 10.22533/at.ed.2141921067

CAPÍTULO 8 83

DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) REVELA DIFERENTES LINHAGENS EM BACIAS MARANHENSES

Walna Micaelle de Moraes Pires
Maria Claudene Barros
Elmary da Costa Fraga

DOI 10.22533/at.ed.2141921068

CAPÍTULO 9 98

DNA BARCODING CONFIRMA A OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS NA ICTIOFAUNA DO RIO TURIQUÊ, MARANHÃO/BRASIL

Bruno Rafael da Silva Teixeira
Maria Claudene Barros
Elmary da Costa Fraga

DOI 10.22533/at.ed.2141921069

CAPÍTULO 10 111

EVALUATION OF HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MGSO₄ AND IPTG IN ESCHERICHIA COLI W110

Yago Queiroz dos Santos
Gabriella Silva Campos Carelli
Bruno Oliveira de Veras
Joelton Igor Oliveira da Cruz
Geovanna Maria Medeiros Moura
Antônio Moreira Marques Neto
Anderson Felipe Jácome de França

DOI 10.22533/at.ed.21419210610

CAPÍTULO 11 119

ANÁLISE DA IMPORTANCIA DE ESTUDOS DO GENE MDR1 E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE MULTIRESTENCIA A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE

Lucas Lopes Lima

Benedito R. Da Silva Neto

DOI 10.22533/at.ed.21419210611

CAPÍTULO 12 128

EVALUATION OF PLASMA MIRNAS FOR EARLY DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

Alexis Germán Murillo Carrasco

Stefano Giannoni Luza

Oscar Acosta Conchucos

José Manuel Cotrina Concha

Alfredo Aguilar Cartagena

Lia Pamela Rebaza Vásquez

Ricardo Miguel Fujita Alarcón

José Luis Buleje Sono

DOI 10.22533/at.ed.21419210612

CAPÍTULO 13 139

POLIMORFISMO DO GENE GOLA-DRB.2 EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS

Luciana Florêncio Vilaça Lopes

Elizabete Cristina da Silva

Elizabete Rodrigues da Silva

Severino Benone Paes Barbosa

Ângela Maria Vieira Batista

Kleber Régis Santoro

DOI 10.22533/at.ed.21419210613

CAPÍTULO 14 151

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PEIXES DA APA DO INHAMUM, LESTE MARANHENSE, BRASIL

Renato Corrêa Lima;

Marcelo Silva de Almeida;

Maria Claudene Barros;

Elmary da Costa Fraga;

DOI 10.22533/at.ed.21419210614

CAPÍTULO 15 169

MIRNAS: UMA CLASSE DE PEQUENOS RNAs REGULATÓRIOS

Juliana Santana de Curcio

Kleber Santiago Freitas e Silva

Lívia do Carmo Silva

Amanda Alves de Oliveira

Thaynara Gonzaga Santos

Lucas Weba Soares

DOI 10.22533/at.ed.21419210615

CAPÍTULO 16	179
O CICLO CELULAR E SEUS MECANISMOS DE CONTROLE: UMA REVISÃO	
<i>Schirley Costalonga</i>	
<i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210616	
CAPÍTULO 17	191
OSTEOSSARCOMA PEDIÁTRICO	
<i>Natália Paiva do Nascimento</i>	
<i>Thauanna Alves Meira</i>	
<i>Mariana Camargo Maschietto</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210617	
CAPÍTULO 18	202
PHYLOGENETIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF A CELLULASE PRODUCING BACILLUS SP. STRAIN BY 16S RRNA SEQUENCING	
<i>Yago Queiroz dos Santos</i>	
<i>Anderson Felipe Jácome de França</i>	
<i>Bruno Oliveira de Veras</i>	
<i>Gabriella Silva Campos Carelli</i>	
<i>Geovanna Maria Medeiros Moura</i>	
<i>Joelton Igor Oliveira da Cruz</i>	
<i>Fernanda Granja da Silva Oliveira</i>	
<i>João Ricardhis Saturnino de Oliveira</i>	
<i>Luciclaudio Cassimiro de Amorim</i>	
<i>Elizeu Antunes dos Santos</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210618	
CAPÍTULO 19	210
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DOENÇAS HUMANAS NA ERA DA BIOINFORMÁTICA	
<i>Kleber Santiago Freitas e Silva</i>	
<i>Juliana Santana de Curcio</i>	
<i>Lucas Weba Soares</i>	
<i>Lívia do Carmo Silva</i>	
<i>Amanda Alves de Oliveira</i>	
<i>Thaynara Gonzaga Santos</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210619	
CAPÍTULO 20	226
QUIMIOPROTEÔMICA: DESCOBRINDO MOLÉCULAS BIOATIVAS E SEUS ALVOS	
<i>Lívia do Carmo Silva</i>	
<i>Kleber Santiago Freitas e Silva</i>	
<i>Juliana Santana De Curcio</i>	
<i>Lucas Weba Soares</i>	
DOI 10.22533/at.ed.21419210620	
SOBRE O ORGANIZADOR	240

EVALUATION OF HETEROLOGOUS PROTEIN EXPRESSION AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MGSO₄ AND IPTG IN ESCHERICHIA COLI W110

Yago Queiroz dos Santos

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Gabriella Silva Campos Carelli

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Bruno Oliveira de Veras

Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Joelton Igor Oliveira da Cruz

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Geovanna Maria Medeiros Moura

Institute of Tropical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Antônio Moreira Marques Neto

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Anderson Felipe Jácome de França

Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Norte,

Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Multicampi School of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil.

ABSTRACT: Since the improvement of gene sequencing techniques, the expression of heterologous proteins is gaining increasing relevance given the possibility of large-scale production when compared to the isolation of these same molecules in their original sources. However, heterologous expression systems continue to require for a suitable induction relevant amounts of synthetic molecules like IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) which have toxicity and cost limitation when used in large scale. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of bivalent salts such as MgSO₄ in association with IPTG on heterologous expression system pDMI.1 for a possible better cost-benefit proposal in the current heterologous protein expression protocol. Magnesium Sulfate contributes to an increase in bacterial physiology as a whole, inducing a higher protein expression acting as an indirect and alternative inducer in these conditions, with the advantages of presenting low cost and low cellular toxicity. Based on these obtained data, we propose the usage of low MgSO₄ molar concentrations in current heterologous protein expression protocols

performed in our group for the pDMI.1 vector. Additional studies are still needed in order to evaluate the effects of this salt on different expression systems at wide range of microorganisms.

KEYWORDS: Escherichia coli, Heterologous protein, H-ras.

INTRODUCTION

Escherichia coli is the first host microorganism widely used for the production of recombinant proteins (SWARTZ, 2001). Many of the proteins made by *E. coli* are expressed through complicated processes of production, which increases costs and makes productivity unfeasible (VILLAVERDE & CARRIO, 2003).

Several studies on cell culture systems have been published, showing the best compositions of culture media, factors such as pH, temperature, amount of oxygen and inducers of gene expression, which affect mRNA translation, and the levels of proteins production (BIRD, et al, 2004; CORISDEO; WANG, 2004).

The expression of recombinant proteins results from rapid responses of changes in the metabolism of microorganisms (DONG, et al, 1995; RINAS, 1996).

Currently, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) is one of the most widely used inductors in many high-end systems. Despite its effectiveness as a catalyst in various expression systems, one of the major drawbacks to using it is that it is toxic to most cells which limits its use in large-scale protein production systems (HUMBERTO and SILVA, 2006). Therefore, the discovery of new fewer toxic inductors than IPTG is of great use for the production of proteins (HUMBERTO, SILVA, 2006).

Minerals are involved in the functioning of the organisms as key components in cellular metabolism, from the lowest level of functioning of organisms to the most complex (BURGER, M.M, 2008). Magnesium is the second most abundant intracellular that serves as a cofactor for over 300 different enzymatic reactions, including carbohydrates, fat, electrolyte metabolism, nerve conduction, muscle contractility, protein synthesis and integrity (BURGER, 2008). It is considered as a group of mineral micronutrients classified as "major mineral" (essential mineral for life) and the fourth most abundant element in the intracellular grinding organ, but it is second only to potassium, which makes it a nutrient which has some important implications for essential metabolic functions (NIELSEN, 2006; LAI RES, 1991).

The H-ras protein has 188 amino acids and can be found in all tissues, whether they are adult or fetal. It is estimated that there are approximately 3×10^5 molecules per cell and that tumor cells can express up to six times as much H-ras protein (LOWY; WILLUMSEN, 1993). Based on the difficulties of producing proteins using IPTG as an inducer, the present study aims to evaluate the expression of total proteins from the wild-type and mutated H-ras group in *E. coli* W110 strains in different concentrations of magnesium sulfate ($MgSO_4$) compared to IPTG.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Cultures were carried out in Luria-Bertani Agar (LB) strains with *E. coli* W110 strains containing the 5262 base pair pDMI.1 plasmid and 3740 base pairs with a gene encoding the wild-type H-ras protein. Another culture was made using recombinant *E. coli* W110 carrying the pDMI.1 plasmid encoding the mutated H-ras protein, with a cysteine substituting a glycine at position 12, and the plasmid pDMI.1, according to Santos (1999).

Colonies were selected and submitted to culture in 5 mL of LB medium in the presence of antibiotics, in order to promote the selection of colonies of resistant bacteria. Cultures were incubated under stirring at 160 RPM (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) for 24 hours at 37 ° C.

Induction test

Colonies of both wild and muted condition were selected and submitted to liquid culture in 5 ml of LB broth in the presence of antibiotics (ampicillin and kanamycin) in order to select resistant colonies (i.e. having successfully internalized functional plasmids) being incubated overnight under stirring at 160 RPM and 37 °C.

After incubation period, 10 µl of the cultures were transferred to individual tubes containing 10 ml of LB with IPTG and MgSO₄ at concentrations of 0.05 M, 0.16 M, 0.25 M or 0.5 M. The bacterial cells were kept under stirring for 8 hours at 37° C and then centrifuged, lysed by ultrasonication and its protein content quantified according to Bradford method and analyzed by SDS-PAGE 12,5% according to Laemmli.

EXTRACTION, QUALIFICATION AND QUANTIFICATION OF TOTAL PROTEINS

For the extraction, previously weighed microtubes were separated, where Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, Lysozyme 1 mg / mL, pH 7.0) was added in a 0.2 g / mL ratio, where a same cell mass, 50mg, for all experiments. Initially, the microtubes containing the cells were immersed in ice and then in lysis buffer. Subsequently, the biomasses were submitted to ultrasonic lysis (HD2070, Bandelin Sonoplus) in six cycles of 12 seconds, with a maximum power of 40%.

This mixture was centrifuged for 10 minutes at 4 ° C and 12.000 RPM, and the supernatants were transferred to new microtubes for analysis. To qualify the total proteins, electrophoresis was performed with 100 µl of the supernatants, which were separated and precipitated overnight with acetone and then centrifuged at 15.000 RPM at 40 ° C for 15 minutes. The precipitate was loaded into 12.5% SDS-PAGE.

The protein quantification was made from the initial supernatant according to the Bradford methodology in A595 (BRADFORD, 1976). The results were analyzed applying the values of the readings are given in the equation $y = 0.0087x + 0.0025$ and

$R^2 = 0.9954$. The experiments were carried out in triplicates and the mean values were adopted for protein quantification.

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that cultures of *E. coli* carrying the mutated H-ras gene in pDMI.1 plasmid (Figure 1) showed a higher growth in the concentrations of 0.05 to 0.25 M of magnesium sulfate ($MgSO_4$) compared to the other concentrations and negative control as well as when compared with the absence of such ion in the presence of IPTG.

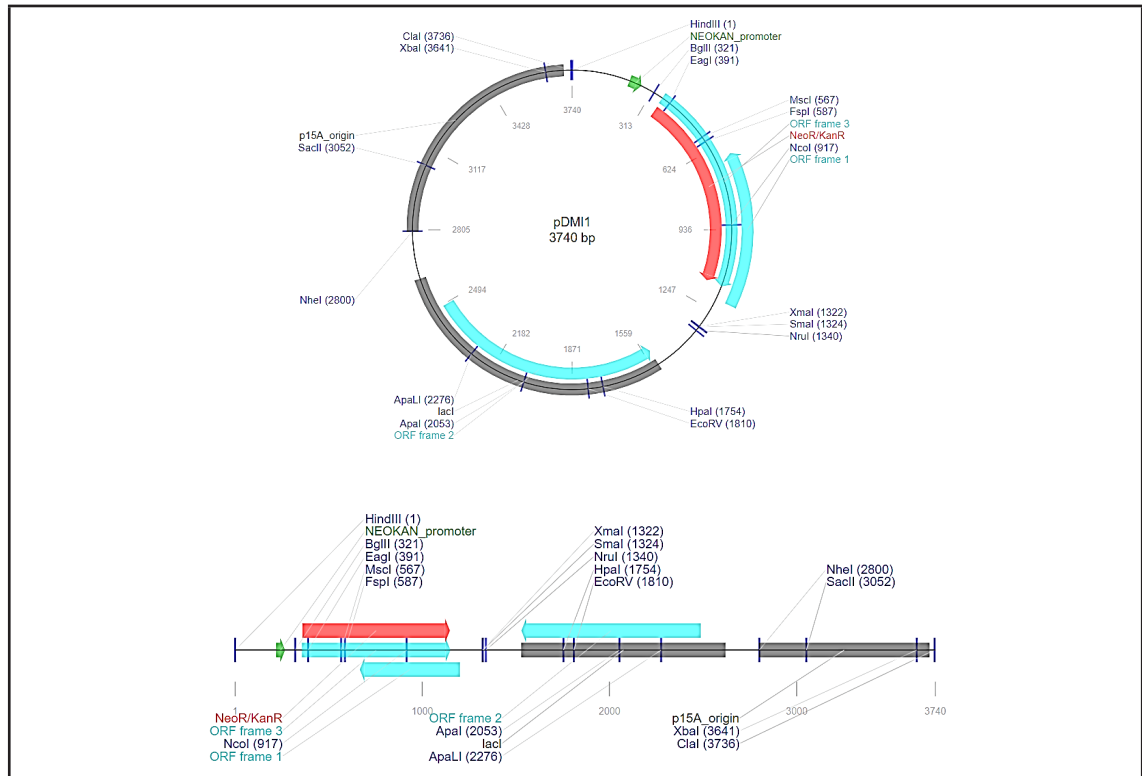


Figure 1. Circular and linear maps of pDMI1 plasmid.

At concentrations of 0.16 to 0.5M $MgSO_4$, protein expression was better in relation to the IPTG-induced cultures and the other $MgSO_4$ concentrations, data confirmed in electrophoresis (Figure 2), and protein quantification by the Bradford (Figure 3).

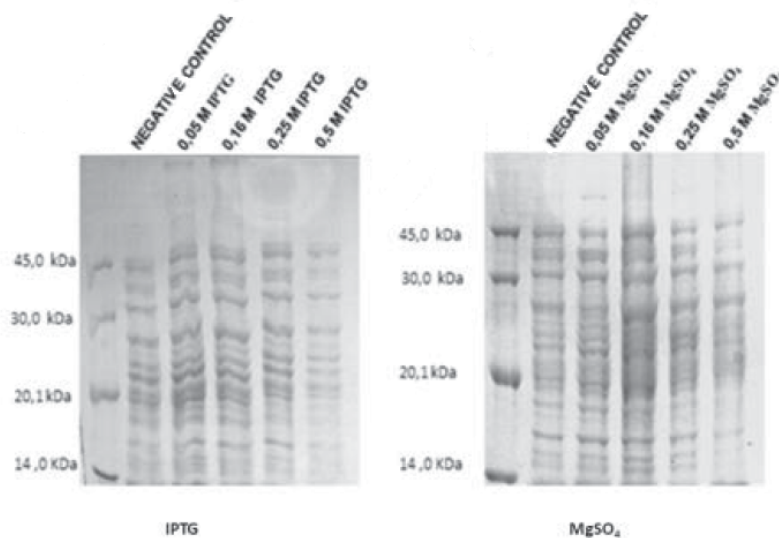


Figure 2. SDS-PAGE of *E. coli* carrying the mutated H-ras gene in different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

At the concentration of 0.16 M $MgSO_4$, the cultures showed a better protein concentration in relation to the others, in the presence of $MgSO_4$, and in relation to those in the presence of IPTG, data visualized in electrophoresis and by total protein dosage (Figure 2 and Figure 3).

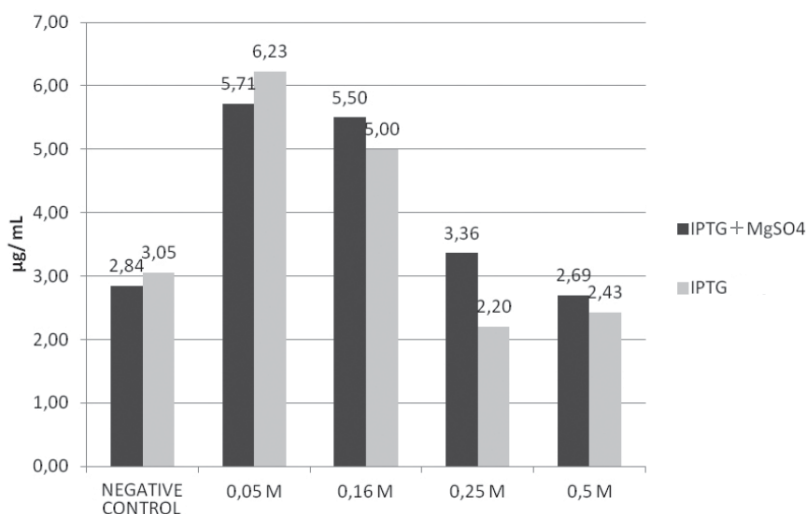


Figure 3. Total proteins ($\mu\text{g/ml}$) quantification of *E. coli* transporting the mutated H-ras gene at different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

The results suggest that, at these concentrations, $MgSO_4$ may act as a promoter of growth and expression of mutated and total H-Ras protein. As most of the proteins are accumulated in the intracellular portion of recombinant *E. coli*, the productivity is proportional to the final cell density (BA-BAEIPOUR et al., 2007).

To deviate from this variable, all experiments were standardized on the same amount of cellular biomass.

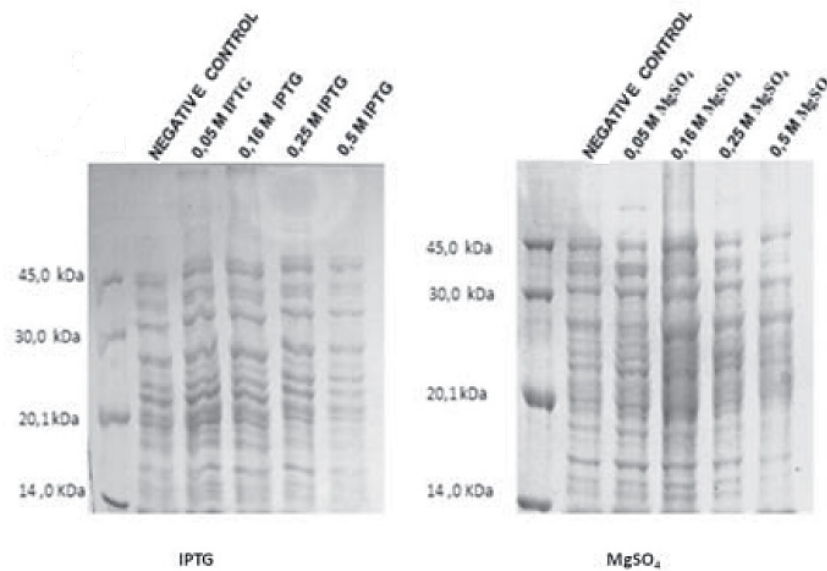


Figure 4. SDS-PAGE of *E. coli* carrying the wild H-ras gene in different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

The use of magnesium sulphate in the composition of the culture medium plays an important role in cell metabolism. The Mg^{2+} and Cu^{2+} ions present an important role for the living being (BURGER, 2008; PROHASKA, 2004). The Magnesium is incorporated as a source of magnesium ion, which is required in a variety of enzymatic reactions, including DNA replication (BIOSYSTEMS, 2009; EXPRESSION TECHNOLOGIES INC., 2003), which interferes, directly and quantitatively, in the protein expression of the cell culture.

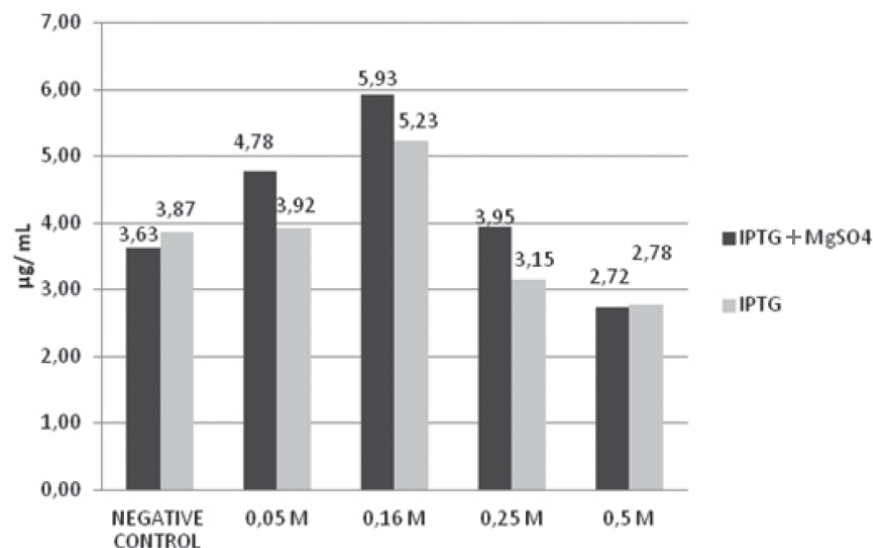


Figure 5. Total proteins ($\mu\text{g}/\text{mL}$) quantification of *E. coli* transporting the wild H-ras gene at different concentrations of IPTG and $MgSO_4$.

In cultures carrying the wild-type H-ras gene, the behavior is not very distant from that of the mutated H-ras gene. In the cultures carrying the wild-type gene, good protein expression was observed at concentrations between 0.05 and 0.5 M ($MgSO_4$), while

in the cultures of the mutated gene, a better expression was observed at 0.25 to 0.5 M (MgSO_4), relative to the IPTG-induced cultures. These results can be visualized in electrophoresis and total protein dosage of the bacterial and recombinant proteins from wild-type (Figure 4). In cultures carrying the mutated gene, the protein quantification differences were quite proportional to observed at wild-type (Figure 3 and Figure 5).

CONCLUSIONS

Magnesium sulphate was the best inducer of the expression of the mutated protein in comparison with IPTG at concentrations of 0.16, 0.25 and 0.5M MgSO_4 , and in the expression of the wild-type protein in concentrations 0.05, 0.16 and 0.25M compared to expression with IPTG in strains of *E. coli*.

MgSO_4 is suggested as an alternative inducer under these conditions, because it presents low cost, low cellular toxicity and excellent protein expression. The difference in protein quantification may be from bacterial proteins, but also from expressed recombinant protein, as shown in the results. The difference in the scale of the induction power of the expression between the mutated and the wild-type protein may be related to the structure of the inserted gene.

Based on these obtained data, we propose the usage of low MgSO_4 molar concentrations in current heterologous protein expression protocols performed in our group for the pDMI.1 vector. Additional studies are still needed in order to evaluate the effects of this salt on different expression systems at wide range of microorganisms.

REFERENCES

- ADAM, E.T. **Advances in Protein Chemistry**, 1991, v.42, CRC Press, 145.
- BIRD, P.I.; PAK, S.C.L.; WORRALL, D.M. & BOTTOMLEY, S.P. **Production of recombinant serpins in Escherichia coli**. *Methods*. 32: 169-176, 2004.
- BOS, J.L. **Ras oncogenes in human cancer: a review**. *Cancer Research*, v. 49, p. 4682-4689, 1989.
- BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.
- BURGER, M.M. **Comportamento do íon magnésio em prova triathlon meio-ironman**. *Brazilian Journal of Biomotricity*, 2007.
- CORISDEO, S.; WANG, B. B. **Functional expression and display of an antibody Fab fragment in Escherichia coli: study of vector designs and culture conditions**. *Protein Expression and Purification*. 34 : 270-279, 2004.
- DONG, H.; NILSSON, L. & KURLAND, C. G. **Gratuitous overexpression of genes in Escherichia coli leads to growth inhibition and ribosome destruction**. *J. Bacteriology*. 177:1497-1504, 1995.
- FONSECA, G. G.; ANTONIO, R. V. **Plasmid stability in PHA-producing recombinant Escherichia coli strains**. *Journal of Biological Sciences*. v. 6, n. 5, p. 893-898, 2006.

FOSSUM, B.; GEDDE-DAHL, T.; ERIKSEN, J.A.; THORSBY, E.; GAUDERNACK, G. **Overlapping epitopes encompassing a point mutation (12Gly Arg) in p21 ras can be recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells.** European Journal Immunology. v. 23, p. 2687-2691, 1993.

HUMBERTO, J. L.; SILVA, T. H. A. **Síntese de derivados de Tio-β- alactopiranosídeos como indutor em sistemas de expressão de proteínas que utilizam o “lac- operon”.** 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006.

JOHNSON, WT and Thomas, AC (1999) **Cu deprivation potentiates oxidative stress in HL-60 cell mitochondria.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 221, 147.

KHOO, T. K.; SANTHAM, A.; NOORDIN, R.; ARIFIN, N. **Production of Brugia malayi BmSXP recombinant protein expressed in Escherichia coli.** Malaysian Journal of Microbiology. v. 6, n. 2, p. 115-122, 2010.

LACAL, J.C.; SANTOS, E.; NOTARIO, V.; BARBACID, M.; YAMAZAKI, S.; KUNG, H.; SEAMANS, C.; MCANDEW, S.; CROWL, R. **Expression of normal and transforming H-Ras genes in Escherichia coli and purification of their encoded p21 proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 81, p 5305-5309, 1984.

LAIRES, M.J.; ALVES, F. **Changes in plasma, erythrocyte, and urinary magnesium with prolonged swimming exercise.** Magnesium research. 1991 Jun;4(2):119-22.

MIDLEY, R.S.; KERR, D.J. **Ras as a target in cancer therapy.** Critical Reviews in Oncology/Hematology. v. 44, p. 109-120, 2002.

NIELSEN, F.H.; LUKASKI, H.C. **Update on the relationship between magnesium and exercise.** Magnesium research. 2006; 19(3):180-9.

OLIVEIRA, W. A. **Efeito das fases do extrato de Aloe vera (L.) na resposta imunológica in vitro junto à proteína H-Ras.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. João Pessoa, Paraíba. 2008.

PROHASKA, JR and Gybina, AA (2004) **intracellular Cu transport in mammals.** J. Nutr. 134, 1003.

RINAS, U. **Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant Escherichia coli.** Biotechnol Prog. 12:196–200, 1996.

SANTOS, C. F. **Identification et Caractérisation des epitopes des Proteines p21-Ras et Etude de Interactions Peptides-Molécules HLA-DR.** Soutenu le 1er octobre 1999. Doctorat de l'Université Paul Sabatier-Toulouse III/INSERM U.395 Purpan, BP 3028-F-31024 Toulouse Cedex 3.

SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M.R.; WIESMULER, L.; LAUTWEIN, A.; SCHMITZ, F.; WITTINGHOFER, A. **The Ras-Gap complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants.** Science, v. 277, p. 333-338, 1997.

SWARTZ, J.R. **Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins.** Current Opinion in Biotechnology. 12 : 195-201, 2001.

VILLAVERDE, A. & CARRIÓ, M.M. **Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies.** Biotechnology Letters. 25:1385-1395, 2003.

SOBRE O ORGANIZADOR

Benedito Rodrigues da Silva Neto - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia. Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Também possui seu segundo Pós doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com Análise Global da Genômica Funcional e aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Palestrante internacional nas áreas de inovações em saúde com experiência nas áreas de Microbiologia, Micologia Médica, Biotecnologia aplicada a Genômica, Engenharia Genética e Proteômica, Bioinformática Funcional, Biologia Molecular, Genética de microrganismos. É Sócio fundador da “Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde” (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Como pesquisador, ligado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. arroz, milho, sorgo, plantas de cobertura e integração lavoura pecuária. E-mail para contato: alan_zuffo@hotmail.com

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-421-4

