UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NAIARA UTIMURA TORRES

Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase
Hot Start e suas implicações na atividade da enzima

São Carlos
2020

NAIARA UTIMURA TORRES

Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase
Hot Start e suas implicações na atividade da enzima

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael Victório
Carvalho Guido

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Torres, Naiara Utimura

Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase Hot Start e suas implicações na atividade da enzima / Naiara Utimura Torres; orientador Rafael Victório Carvalho Guido - versão corrigida -- São Carlos, 2020.

92 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Taq DNA polimerase. 2. Hot Start. 3. PCR. I. Guido, Rafael Victório Carvalho, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Esse documento científico nasceu graças aos esforços de muitas pessoas que, mesmo não tendo participação científica direta, foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Por isso, não citarei vários nomes, mas gostaria de deixar os meus agradecimentos mais sinceros a todos as pessoas que fizeram parte da minha vida durante esses anos de doutorado. Obrigada por suas ideias, por seus diferentes pontos de vista, seus conhecimentos, incentivos, olhares amigos e sorrisos sinceros.

Em especial, agradeço à Deus por me dar saúde e boas inspirações durante o desenvolvimento desse projeto. Agradeço também pela legião de anjos enviados para me ajudar durante esse processo. A alguns desses anjos, dedico as próximas linhas dessa seção.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Guido, por aceitar o desafio de me conduzir e orientar durante todos esses anos de doutorado. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, dedicação e por ser uma pessoa tão correta e íntegra!

Obrigada a todos as pessoas que fazem e fizeram parte da Cellco. Gostaria de deixar um agradecimento especial à Amanda por todas as suas inspirações científicas, o seu companheirismo e a sua doçura; ao Fábio pela sua paciência e sábios ensinamentos de vida; à Maria Amélia por ser o nosso ponto de equilíbrio e me transmitir a tranquilidade necessária nos momentos mais desesperadores; à Fernanda por me guiar e acolher carinhosamente durante todos esses anos de doutorado; e ao Fernando pela participação ativa nesse projeto e por sua enorme contribuição no meu crescimento científico e profissional.

Muito obrigada a todos os membros do laboratório pelo auxílio incondicional, discussões científicas, sorrisos, abraços e risadas. Vocês fizeram meus dias serem muito mais proveitosos e felizes!

Agradeço ao meu namorado, Ítalo, por estar sempre presente e me apoiando em todos os momentos. Obrigada por todas as discussões científicas e pelas correções de tese e qualificação! Também agradeço ao Bruno, amigo querido, que sempre esteve ao meu lado desde os primeiros anos de graduação. A vocês dois, obrigada por todos esses anos maravilhosos de convivência e por serem a minha plateia e banca favorita antes de qualquer apresentação científica.

Obrigada a todos da minha família pelo apoio emocional e por acreditarem incondicionalmente em mim e no meu trabalho. Em especial, agradeço aos meus pais, minha avó, meu irmão e minha cunhada.

Por fim, agradeço ao Instituto de Física de São Carlos por ter me acolhido desde a graduação e por oferecer as instalações para a realização desse projeto.

“Podem-se queimar os livros, mas não se queimam as ideias; as chamas das fogueiras as super-excitam em lugar de abafá-las. As ideias, aliás, estão no ar, e não há Pirenéus bastante altos para detê-las; e quando uma ideia é grande e generosa, ela encontra milhares de peitos prontos para aspirá-la.”

Allan Kardec

RESUMO

TORRES, N. U. **Investigação das metodologias de produção de Taq DNA polimerase *Hot Start* e suas implicações na atividade da enzima.** 2020. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

A reação de polimerização em cadeia (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) é um método amplamente usado em laboratórios de biologia molecular, análise forense, diagnóstico clínico e controle de qualidade em indústrias alimentícias. Taq DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq) é a enzima mais amplamente usada na PCR por sintetizar DNAs de diversos tamanho e natureza, além de manter sua atividade em diferentes meios reacionais. Apesar disso, essa enzima pode apresentar ampliações inespecíficas e formação de dímeros de oligonucleotídeos devido a sua atividade residual em temperatura ambiente, na qual a maioria das reações é preparada. Para solucionar esse problema, foram desenvolvidas Taqs que são ativadas somente após uma incubação em alta temperatura (do inglês, *Hot Start Taq DNA polymerase*). Essas enzimas são, usualmente, ligadas a biomoléculas ou grupamentos químicos que impedem a sua atividade a temperatura ambiente. Com a incubação em altas temperaturas, ou ciclo *Hot Start*, as biomoléculas e grupamentos químicos se desligam da polimerase, que recupera a sua atividade. Apesar de muito utilizada, apenas um único tipo de Taq *Hot Start* é produzida no Brasil, fazendo com que o valor e a disponibilidade dessa enzima sejam variados. Dessa forma, esse trabalho – realizado em colaboração com a empresa Cellco Biotec do Brasil LTDA – visou à produção de Taq *Hot Start* de alta qualidade por técnicas de mutagenese, ligação a anticorpo/aptâmero, reação com grupamentos químicos e precipitação de íons divalentes do meio reacional. Para isso, Taq foi produzida heterologicamente em *Escherichia coli* e teve sua purificação otimizada através de quatro etapas cromatográficas. Visando avaliar a atividade enzimática, um método de determinação de unidades enzimáticas sem radioisótopos foi desenvolvido, baseado na fluorescência de uma molécula intercalante de DNA. Para a produção das Taqs *Hot Start* por ligação a aptâmero e anticorpo, diversas concentrações dessas biomoléculas inibidoras foram misturadas à enzima nativa, que teve sua atividade a 25 °C avaliada em um termociclador de tempo real. Na versão *Hot Start* por modificação química, derivados de anidrido maleico foram ligados covalentemente à enzima, em diversas proporções molares. Já no tampão *Hot Start*, foram testados agentes tamponantes com base em íons fostato que promoveriam a precipitação do cofator enzimático Mg^{+2} . Após a otimização de cada metodologia, todas as DNA polimerases *Hot Start* foram comparadas em eficiência, sensibilidade, baixa atividade a 25 °C, amplificação de fragmentos de DNA com alta porcentagem de GC, ampliações complexas, desempenho em PCR multiplex e custo de produção. Diferente do esperado, a enzima mutante apresentou atividade residual a 25 °C. Por outro lado, as estratégias de ligação de anticorpo e modificação química foram as que apresentaram o melhor desempenho na obtenção de enzimas *Hot Start*. Dessa forma, foi iniciada a produção de Taq DNA polimerases *Hot Start* nacionais de alta qualidade por meio da ligação de anticorpos e grupos químicos que apresentaram desempenhos iguais ou superiores às enzimas importadas. Esses resultados indicam a capacidade de produção local de novos produtos biotecnológicos de alto valor agregado para o mercado nacional e internacional, posicionando o Brasil entre os países detentores dessa tecnologia.

Palavras-chave: Taq DNA polimerase. *Hot Start*. PCR.

ABSTRACT

TORRES, N. U. **Investigation of production methodologies of Taq DNA polymerase Hot Start and its implications in the enzyme activity.** 2020. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Polymerase Chain Reaction (PCR) is a common method used in molecular biology laboratories, forensic analyses, clinic diagnostics and quality control in food industries. Taq DNA polymerase from *Thermus aquaticus* is widely used in PCRs because of its unique features, including the ability to synthesize DNAs of different sizes and nature and to maintain its activity in many reaction mixes. Even though, this enzyme may unspecifically amplify DNA regions or primer dimers due to the residual activity at room temperature, in which most of reactions are prepared. To tackle this limitation, Taq DNA polymerases that are activated at high temperatures (Hot Start cycle) have been developed. These enzymes are frequently bound to biomolecules or chemical groups that prevent the activity at room temperature. After the Hot Start cycle, the biomolecules or chemical groups are released from the polymerase which recovers the activity. In Brazil, there is only one producer of Taq DNA polymerase Hot Start, because of that, prices and availability of the enzyme may vary. This work was conducted in collaboration with Cellco Biotec do Brasil LTDA and aimed at producing high quality Taq DNA polymerase Hot Start based on techniques such as mutagenesis, antibody/aptamer binding, chemical modification and precipitation of magnesium ions from reaction buffer. In this sense, Taq DNA polymerase was heterologously expressed in *Escherichia coli* and purified with four chromatographic steps. To verify the enzymatic activity, we developed a radioisotope-free methodology to determine polymerases units based on fluorescence of a DNA intercalator. To produce Taq DNA polymerase Hot Start by aptamer or antibody binding, several concentrations of those inactivator biomolecules were added into the purified enzyme, which had its activity measured at 25 °C in a real-time thermocycler. Chemically modified Hot Start were produced incubating the purified enzyme with maleic anhydride derivatives that bound covalently to the enzyme. For the Hot Start buffer, we used buffers containing phosphate ions that promote magnesium precipitation. After optimization of each methodology, DNA polymerases were compared in efficiency, sensibility, activity at 25 °C, amplification of CG-rich DNAs, complex amplification, performance in multiplex PCR and production costs. Different from expected, we did not observe a lower enzymatic activity at 25 °C on the mutant enzyme. On the other hand, the strategies based on antibodies and aptamers or chemical modification were successful in delivering Hot Start enzymes. Based on that, the production of national Taq DNA polymerases Hot Start bound to antibodies and chemically modified enzyme was started. The enzymes show similar or superior performance related to other commercial enzymes. These results indicate the capacity of the local production of new value-added biotechnological products for the national and international market, which place Brazil among the countries with this technology.

Keywords: Taq DNA polymerase. Hot Start. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema geral da PCR. O DNA molde é desnaturado em altas temperaturas e tem um oligonucleotídeo iniciador hibridizado com a diminuição de temperatura. Depois disso, a temperatura é ajustada para que a DNA polimerase estenda o DNA molde (comumente 72 °C). Após vários ciclos térmicos, o fragmento de DNA de interesse pode ser obtido em grande quantidade. Para melhores resultados, os ciclos de amplificação por PCR são iniciados por uma desnaturação longa e encerrados com a extensão final de qualquer fragmento incompleto.....	22
Figura 2 –	Estrutura do fragmento Klenow de <i>E. coli</i> (PDB: 1KFD) comparado a uma mão direita semifechada. Os subdomínios dedos, polegar e palma são mostrados em amarelo, verde e vermelho, respectivamente. O domínio exonuclease é mostrado sombreado em azul.	23
Figura 3 -	Comparação da estrutura de Taq (PDB: 1TAU) com uma mão direita semiaberta. Os subdomínios palma, dedos e polegar estão representados em vermelho, amarelo e verde, respectivamente. O domínio exonuclease 5'-3' é mostrado em azul escuro e o domínio 3'-5' exonuclease degenerado é mostrado em azul claro. A molécula de DNA ligada é mostrada em laranja.	25
Figura 4 –	Comparação entre Taq ligada ao DNA (esquerda, PDB: 1TAU) e ligada ao anticorpo TP7 representado em preto e cinza (direita, PDB: 1BGX). Em azul escuro, azul claro, amarelo, vermelho e verde estão representados, respectivamente, o domínio 5'-3' exonuclease, 3'-5' exonuclease degenerado e os subdomínios dedos, palma e polegar. A estrutura sombreada da direita é o alinhamento do domínio DNA polimerase das enzimas complexadas com DNA e TP7, mostrando que a maior mudança estrutural ocorre no domínio 5'-3' exonuclease, enquanto que o domínio polimerase sofre poucas mudanças.....	28
Figura 5 -	Modificação química reversível utilizando derivados de anidrido maleico. Em pHs básicos, o derivado de ácido maleico se liga ao grupo amino da cadeia lateral de lisinas de uma proteína e, em pHs ácidos e meio aquoso, a molécula sofre hidrólise liberando um derivado de ácido maleico e a enzima na forma ativa. As derivações da molécula de anidrido maleico ocorrem no substituinte “R”, onde R pode ser um hidrogênio (anidrido maleico), metila (anidrido citracônico), ácido etanóico (anidrido cis-aconitato), dentre outros.....	29
Figura 6 -	Sobreposição do domínio polimerase do mutante sensível a temperatura de Taq (colorido, PDB: 4N56) e sua versão nativa (sombreado, PDB: 4KTQ). Os subdomínios palma e polegar estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O domínio dedos está representado em amarelo, com destaque para a hélice O em laranja. O DNA ligado a mutante CS está representado em rosa claro, com o empilhamento não usual das adeninas representado em rosa escuro.	31
Figura 7 -	Modificação do vetor pET-28a para gerar os vetores de expressão utilizados. A CDS de Taq foi clonada no plasmídeo que não continha proteína carreadora (pET-M11) e nos plasmídeos contendo TiorredoxinaA (pET-TRX) e NusA (pET-NUS).	35
Figura 8 -	Ciclo de amplificação utilizado para a enzima <i>Phusion</i> (Thermo Scientific). Para a amplificação dos vetores, foi utilizado o mesmo ciclo de PCR com T_H de 65 °C e tempo de extensão de 2:30 min.	37
Figura 9 –	Esquema sequencial das cromatografias utilizadas na purificação de Taq DNA polimerase. A terceira cromatografia de afinidade (HisTrap) não foi utilizada no protocolo final de purificação enzimática. Dessa forma, a cromatografia de afinidade 2 era seguida pela troca iônica.	41

Figura 10 –	Ilustração das condições saturantes (5 nM) e teste (0,31 nM) de Taq DNA polimerase recomendadas para o cálculo de unidades do <i>kit</i> EvaEZ™.	42
Figura 11 –	Sequência do molde H formado pela hibridização dos <i>primers</i> 80-mer e 22-mer. Em cinza é mostrado a região hibridizada. Os “x” cinzas indicam a região 3’ do <i>primer</i> 22-mer que não será estendida. O tracejado amarelo indica a região dos 48 nucleotídeos que serão incorporados durante a extensão do molde H.	43
Figura 12 –	Amplificação da CDS de Taq para a clonagem nos vetores de expressão e PCR de colônia das células transformadas, para a confirmação da presença do inserto nos plasmídeos indicados.	51
Figura 13 –	Teste de expressão de Taq DNA polimerase fusionada a 6xHis (M11), tiorredoxina (TRX) e NusA (NUS) em seu N-terminal. Nota-se a presença das bandas de superexpressão proteica nos tamanhos preditos de 95, 107 e 149 kDa, respectivamente. Os primeiros e segundos poços de cada condição demarcada no gel representam, respectivamente, as frações insolúveis (I) e solúveis (S).	52
Figura 14 –	Cromatogramas e géis das etapas de purificação de Taq DNA polimerase gerados a partir de um clarificado sem tratamento térmico e com adição de Turbo nuclease. As setas coloridas indicam as respectivas frações dos cromatogramas analisadas por SDS-PAGE, com o pico referente a Taq mostrado em verde. (A) Primeira etapa de cromatografia de afinidade referente à eluição de Taq juntamente com um contaminante de 37 kDa. (B) A segunda etapa de cromatografia de afinidade foi capaz de separar o contaminante de 37 kDa, além de outros contaminantes presentes na fração não ligada à coluna (entre 0 e 35 mL). (C) A purificação por cromatografia de troca iônica separou contaminantes que não puderam ser detectados por SDS-PAGE, indicados pelas setas vermelhas e amarelas. (D) Cromatografia de exclusão molecular de Taq DNA polimerase revela uma proteína altamente pura e sem agregados ou contaminantes.	55
Figura 15 –	Ajuste da concentração (massa/volume) entre uma Taq comercial e as enzimas purificadas de acordo com as diferentes metodologias empregadas.	58
Figura 16 –	(A) Curvas de fluorescência da extensão do molde H usando Taqs diluídas 100x (círculos vermelhos, condição saturante) e 2000x. (B) Detalhamento das fluorescências no início do ensaio, com destaque para a linearidade das curvas entre 2 e 7 min indicada pela reta pontilhada em amarelo (em relação a curva da amostra proveniente da primeira cromatografia de afinidade).	59
Figura 17 –	(A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% da comparação de sensibilidade de Taq DNA polimerase comercial (JBS) e enzimas purificadas frente a diferentes concentrações de DNA molde (100, 10 e 1 pg DNA λ, da esquerda para direita). Todas as proteínas conseguiram amplificar o fragmento de 1000 pb a partir de, no mínimo, 1 pg DNA molde. (B) Quantificação das amplificações em relação às amplificações geradas pela enzima comercial. A média das quantificações relativas é mostrada nos gráficos cinzas, indicando as melhores eficiências nas amostras da purificação final e sem cauda de histidina.	61
Figura 18 –	(A) Comparação da amplificação de fragmentos de 1, 2, 3, 4 e 5 kbp usando uma Taq comercial (<i>Jena Bioscience</i>) e a Taq Cellco. Nota-se que as duas enzimas apresentaram o mesmo padrão e eficiência de amplificação, mostrando que a enzima purificada consegue amplificar fragmentos de DNA longos tão bem quanto uma enzima comercial. (B) Quantificação das bandas de amplificação da Taq Cellco (azul) em relação à Taq comercial (cinza), mostrando que a enzima purificada teve uma eficiência semelhante ou maior na amplificação de todos os fragmentos testados.	62
Figura 19 -	Degradação do plasmídeo pUC19 (controle) em ensaio de nuclease contendo 2 pg de Turbo nuclease (A). As amostras foram incubadas por 30 min, 1, 3, 5 e 16 horas (da esquerda para a direita). (B) Teste de nuclease nas diferentes etapas de purificação de Taq	63

- Figura 20 – (A) Amplificações das regiões 16S do DNA genômico de *E. coli*. Curvas tracejadas representam as curvas de calibração do ensaio e as curvas contínuas representam a contaminação com DNA genômico das amostras purificadas. (B) Curva padrão de quantificação das amostras testadas, mostrando que a amostra proveniente da primeira cromatografia é a mais contaminada, indicando a importância da segunda cromatografia para a purificação do DNA bacteriano contaminante.....65
- Figura 21 – Avaliação da atividade de Taq e suas versões *Hot Start* (HS) produzidas a partir da medida da fluorescência do EvaGreen® após a síntese de uma dupla fita de DNA. Em azul são mostradas as sínteses a 25 °C e, em laranja, as sínteses a 72 °C após a ativação das enzimas HS (10 min a 95 °C). As letras de A a D indicam diferentes proporções de biomoléculas para Taq. Diluições de anticorpo (A) e aptâmero (B) de DNA que inibem a atividade de Taq a 25 °C nas concentrações C e D.67
- Figura 22 - Ensaios de atividade a 25 (azul) e 72 °C (laranja, após a ativação da enzima) do mutante de Taq sensível a temperatura (mutante CS). As fluorescências obtidas para o mutante CS são muito similares às da enzima nativa, mostrando que o mutante não possui redução de atividade em baixas temperaturas e, conseqüentemente, não é *Hot Start*.68
- Figura 23 – Comparação das atividades *Hot Start* entre as enzimas controle e Taq nativa em um tampão com íons de magnésio precipitados. Em azul, é mostrada a fluorescência das sínteses a 25 °C e, em laranja, as fluorescências das sínteses a 72 °C após a ativação das enzimas (10 min a 95 °C). Apesar da atividade de Taq no tampão precipitante ser ligeiramente menor comparada à enzima nativa, a fluorescência obtida com o tampão precipitante foi muito maior do que a de uma Taq HS por ligação a anticorpo, mostrando que esse tampão não é muito eficiente para o uso de PCRs *Hot Start*.....69
- Figura 24 – Ensaio de atividade a 25 (azul) e a 72 °C (laranja, após a ativação da enzima) da melhor Taq HS química produzida. A enzima HS produzida apresentou atividade a 25 °C tão baixa quanto à enzima comercial e foi capaz de recuperar a sua atividade após o ciclo *Hot Start*.70
- Figura 25 - (A) Ensaio de atividade a 25 °C da Taq HS química produzida e estocada em pH 8 ao longo de 28 dias. A enzima produzida recupera aproximadamente 20% de sua atividade nos primeiros 7 dias, chegando a estar 80% ativa no final dos 28 dias. (B) Avaliação da atividade a 25 °C da Taq HS química estocada em pH 9 ao longo de 15 meses, mostrando que o aumento do pH no tampão de estocagem é essencial para a estabilização dessa enzima.71
- Figura 26 – Avaliação dos pHs dos tampões de reação de Taq HS química na amplificação de um fragmento de 1000 pb, usando 100, 10 e 1 pg de DNAλ molde (esquerda para a direita). A Taq nativa perde a sua atividade com a diminuição do pH, enquanto que a Taq HS química aumenta a sua atividade devido ao desligamento dos derivados de anidrido maleico. Em pHs abaixo de 8,0, não foi vista atividade para nenhuma enzima.72
- Figura 27 – (A) Teste de sensibilidade das Taq HS químicas, mostrando as amplificações de um fragmento de 1000 pb a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde (da esquerda para a direita). As enzimas foram ativadas a 95 °C por um período de 3 a 30 min, e a Taq HS química recuperou grande parte da sua atividade mesmo após 3 min. (B) Quantificação das bandas de amplificação das reações com Taq HS química. As quantificações das reações contendo diferentes concentrações de DNA molde foram calculadas em relação às suas respectivas diluições na reação com a enzima ativada por 3 min. Pode-se observar um máximo de amplificação entre 5 e 15 min e, a partir desse tempo, as amplificações diminuem possivelmente pelo início da desnaturação da enzima.73
- Figura 28 – Ensaios de atividade a baixas temperaturas (azul) e a 72 °C após a ativação enzimática (laranja) de todas as Taqs *Hot Start* (HS) produzidas e suas versões comerciais. Para analisar pequenas diferenças entre as enzimas, o ganho do termociclador de tempo real foi aumentado em 2x. As enzimas ligadas a aptâmero, anticorpo e a modificada quimicamente tiveram as suas atividades reduzidas a 25 °C.75

- Figura 29 – Ensaio de sensibilidade das enzimas HS produzidas e suas versões comerciais. (A) Gel de agarose mostrando as amplificações de um fragmento de DNA de 1000 pb a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde (da esquerda para a direita). (B) Quantificação das bandas de amplificação em relação às obtidas utilizando a Taq comercial. As bandas amplificadas a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde foram quantificadas em relação à banda gerada a partir de 100, 10 e 1 pg de Taq comercial (gráficos amarelos, verdes e vermelhos), respectivamente. Os valores de quantificação relativa média, mostrados em cinza, são a média desses três valores para cada enzima testada. 76
- Figura 30 – (A) Gel de agarose com amplificações de 1, 2, 3, 4 e 5 kpb (da esquerda para a direita) das diferentes enzimas produzidas. (B) Gráfico da quantificação das bandas do gel em relação às bandas produzidas pela Taq comercial, bem como a média de todas as quantificações (cinza). Observa-se que, na média, as enzimas nativas, HS por anticorpo e HS por aptâmero possuem a mesma eficiência de amplificação. Já as Taqs HS químicas possuem eficiência de amplificação bem menor do que todas as outras enzimas. 78
- Figura 31 – (A) Gel de agarose das PCRs do gene do receptor de insulina humano realizadas com diferentes DNA polimerases. O primeiro e segundo poço de cada enzima indicam as reações feitas com enzimas comerciais e produzidas nesse trabalho, respectivamente. (B) Quantificações relativas à banda de amplificação de Taq comercial, mostrando que as enzimas HS por biomoléculas são, aproximadamente, 28 vezes mais eficientes na amplificação desse gene, enquanto que Taq HS química é cerca de nove vezes mais eficiente. 80
- Figura 32 – (A) Gel de agarose da PCR de um fragmento de 820 pb do gene *blecherry* (67% GC). Os primeiros e segundos poços de cada polimerase indicada representam, respectivamente, as enzimas comerciais e as enzimas produzidas nesse trabalho. (B) Quantificações das bandas do gel em relação à banda produzida pela Taq comercial, com destaque para a alta eficiência da Taq HS anticorpo em PCRs de fragmentos contendo alto GC%. 81
- Figura 33 – (A) PCRs multiplex de seis regiões distintas do DNA genômico humano. As setas ao lado do gel indicam os tamanhos corretos dos fragmentos amplificados, sendo que a seta laranja indica dois fragmentos distintos de tamanhos próximos a 130 pb. Gel de agarose 3% das amplificações geradas pelas diferentes enzimas testadas e por uma *master mix* de PCR multiplex (Qiagen). Em cada polimerase indicada, os primeiros e segundos poços do gel indicam as reações realizadas com uma enzima comercial (C) e a versão produzida nesse trabalho (P), respectivamente. (B) Quantificação das bandas específicas de diferentes tamanhos em relação às suas respectivas bandas de amplificação geradas por Taq comercial. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para a clonagem da CDS de Taq DNA polimerase nos vetores de expressão. As siglas “Fw” e “Rv” no nome de cada <i>primer</i> indicam que os mesmos delimitam as posições 5’ e 3’ do fragmento a ser amplificado, respectivamente. Em azul estão indicadas as sequências adicionais usadas para hibridização de inserto-vetor do sistema LIC.	36
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios funcionais de Taq DNA polimerase e as respectivas temperaturas de hibridização utilizadas nos ciclos de amplificação. As siglas “Fw” e “Rv” indicam que os <i>primers</i> se hibridizam nas posições 5’ e 3’ do fragmento a ser amplificado, respectivamente.	47
Tabela 3 – Taxas de expressão de Taq DNA polimerase com as diferentes proteínas carreadoras em seu N-terminal, mostrando a maior expressão proteica com 6xHis-tag. Foram consideradas taxas de expressão baixas (+) as quantificações relativas a primeira banda do marcador de Taq até 3, taxas médias (++) as quantificações entre 3 e 5, e taxas altas (+++) as quantificações maiores que 5.	53
Tabela 4 – Taxas de expressão de Taq variando cepas de expressão, meios de cultura e temperaturas de expressão. As cinco primeiras condições da tabela tiveram as expressões avaliadas a 37 (4 h), 25 (16 h) e 18 °C (16 h). Retângulos em azul, verde e laranja indicam, respectivamente, as variações de cepas, meios de cultura e tempo de expressão. Foram consideradas taxas de expressão baixas (+) as quantificações relativas a primeira banda do marcador de Taq até 3, taxas médias (++) as quantificações entre 3 e 5, e taxas altas (+++) as quantificações maiores que 5.	54
Tabela 5 – Rendimentos das etapas de purificação de Taq e atividades específicas das amostras provenientes de cada etapa. Nota-se o aumento da atividade específica em quase todas as etapas de purificação, resultando em uma enzima tão pura quanto uma comercial.	57
Tabela 6 – Concentrações enzimáticas calculadas a partir de amostras a 0,1 mg/mL de diferentes etapas de purificação. A partir dos valores de concentração, foi possível calcular a atividade específica de cada amostra (unidades de polimerase/massa em mg, analisadas em um mesmo volume), mostrando que todas as etapas de purificação são efetivas já que aumentam a atividade específica de Taq.	60
Tabela 7 – DNA genômico bacteriano presente nas amostras provenientes das etapas de purificação de Taq quantificado por PCR em tempo real. A diminuição mais significativa da contaminação de DNA ocorre após a segunda cromatografia de afinidade, mostrando que essa etapa é essencial para a purificação de ácidos nucleicos. Após todos os processos de purificação, foi obtida uma amostra com uma contaminação quase inexistente, já que essa amostra apresentou quantidades de DNA parecida a de uma reação sem qualquer adição de DNA genômico.	65
Tabela 8 – Comparação entre as diferentes Taqs DNA polimerases avaliadas nesse trabalho. Os sinais crescentes de “+” indicam um melhor desempenho de cada enzima em relação à polimerase com menor desempenho nos ensaios indicados. Nos ensaios em que todas as enzimas apresentaram resultados comparáveis, todas receberam um único sinal de “+”. Observando a tabela, pode-se destacar o alto desempenho da <i>Hot Start</i> (HS) ligada a anticorpo em eficiência de amplificação e PCRs de DNAs contendo alta % GC, assim como o alto desempenho da HS química em especificidade e PCRs multiplex.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDS	<i>Coding sequence</i>
CS	<i>Cold sensitive</i>
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desorribonucleotídeos trifosfatados
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
GC	Guanina-citosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPV	<i>Human papiloma virus</i>
HS	<i>Hot Start</i>
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LIC	<i>Ligation-independent cloning</i>
LTDA	Limitada
NAT	<i>Nucleic acid test</i>
NUS	Proteína A de utilização de substância N
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEI	Polietilenoimina
RNA	Ribonucleic acid
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
STR	<i>Short tandem repeats</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
TRX	Tiorredoxina A
VC	Volume de coluna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	A síntese de DNA <i>in vitro</i> e suas aplicações	21
1.2	DNA polimerases	23
1.3	Taq DNA polimerase	25
1.4	Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i>	26
1.4.1	Taq DNA polimerase ligada a biomoléculas	27
1.4.2	Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> por modificações químicas	29
1.4.3	Tampão <i>Hot Start</i> por precipitação de íons de magnésio	30
1.4.4	Mutantes de Taq DNA polimerase sensíveis a baixas temperaturas	30
1.5	Produção de Taq DNA polimerase no Brasil	32
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Construção dos sistemas de expressão heteróloga	35
3.1.1	Descrição do sistema de clonagem	35
3.1.2	Amplificação de <i>taq DNA polimerase</i> e dos vetores de expressão	36
3.1.3	Clonagem independente de ligação (LIC)	37
3.2	Mutação sítio-dirigida	38
3.3	Expressão heteróloga de Taq DNA polimerase	39
3.3.1	Teste de expressão com diferentes vetores	39
3.3.2	Avaliação das condições de expressão	39
3.4	Purificação de Taq DNA polimerase	40
3.4.1	Clarificação	40
3.4.2	Purificação por cromatografia líquida	40
3.5	Determinação da concentração enzimática	41
3.6	Avaliação da presença de contaminantes na polimerase produzida	44
3.6.1	Detecção de contaminação por DNases	44
3.6.2	Detecção de contaminação por DNA bacteriano	45
3.7	Produção de Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i>	45
3.7.1	Produção de Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> por ligação a biomoléculas	45
3.7.2	Produção de Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> quimicamente modificada	46
3.7.3	Produção do tampão <i>Hot Start</i>	46
3.8	Ensaio funcionais para comparação das enzimas produzidas	47
3.8.1	Ensaio funcional de amplificação de fragmentos de DNA	47
3.8.2	Determinação da inibição de Taq DNA polimerase a baixas temperaturas	48
3.8.3	Amplificação do gene do receptor de insulina	48
3.8.4	Amplificação de DNA com alta porcentagem de guanina e citosina	49
3.8.5	PCRs multiplex	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1	Clonagem	51
4.1.1	Clonagem de Taq DNA polimerase e mutantes	51
4.2	Otimização da expressão proteica	52
4.3	Isolamento e purificação de <i>taq DNA polimerase</i>	54
4.4	Avaliação da atividade polimerásica	57
4.4.1	Ajuste da concentração enzimática por SDS-PAGE	57
4.4.2	Determinação de unidades enzimática	58
4.4.3	Ensaio de sensibilidade	60
4.4.4	Teste do tamanho de fragmento de amplificado	62
4.5	Determinação da presença de contaminantes	63

4.5.1	Detecção de contaminação por nucleases	63
4.5.2	Determinação da contaminação por DNA bacteriano	64
4.6	Produção de Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i>	66
4.6.1	Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> por ligação a biomoléculas	66
4.6.2	Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> por mutação	67
4.6.3	Tampão <i>Hot Start</i> por precipitação de íons de magnésio	69
4.6.4	Taq DNA polimerase <i>Hot Start</i> por modificação química	70
4.7	Comparação das Taq DNA polimerases <i>Hot Start</i> produzidas.....	74
4.7.1	Atividade a baixas temperaturas	74
4.7.2	Sensibilidade e eficiência das Taqs <i>Hot Start</i>	76
4.7.3	Eficiência e amplificação de fragmentos de DNA longos	77
4.7.4	Sínteses complexas de fragmentos de DNA	79
4.7.5	Amplificação de Fragmentos de DNA com alta porcentagem de GC	80
4.7.6	PCRs multiplex	82
4.7.7	Custo de produção	84
5	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SÍNTESE DE DNA *IN VITRO* E SUAS APLICAÇÕES

A síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*) é um processo essencial para a propagação do código genético durante a divisão celular e, conseqüentemente, para a propagação e manutenção da vida. O processo de síntese *in vivo* é realizado por enzimas DNA polimerases capazes de estender um pequeno fragmento de ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *RiboNucleic Acid* - oligonucleotídeo iniciador ou *primer*) hibridizado a uma fita de DNA molde.¹⁻² Durante a síntese, a incorporação de um novo nucleotídeo à cadeia crescente de DNA se dá pela formação da ligação fosfodiéster entre o grupo fosfato 5' do nucleotídeo nascente com a hidroxila 3' do último nucleotídeo da cadeia.

1-2

O processo de sintetizar DNA *in vitro* teve um grande avanço após a invenção da reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), técnica que conferiu o prêmio Nobel de química a Kary Mullis em 1993.³ Isso foi possível graças à atividade de uma enzima DNA polimerase que realiza a síntese de DNA na presença de um DNA molde, oligonucleotídeos iniciadores que se hibridizam nas extremidades do fragmento de DNA a ser sintetizado, desorribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) e íons Mg^{+2} . A síntese do DNA é comumente regida por ciclos térmicos que desnaturam o DNA molde (95 a 98 °C); hibridizam os oligonucleotídeos às extremidades do fragmento de DNA de interesse (50 a 72 °C); e favorecem a atividade da DNA polimerase na extensão da fita complementar do DNA (Figura 1).^{1, 4-5} Após vários ciclos de temperatura, obtém-se o fragmento de DNA amplificado em uma taxa exponencial.

Apesar de ter sido inventada em 1983, a PCR foi pouco utilizada por ser, inicialmente, laboriosa: a DNA polimerase I de *Escherichia coli*, empregada na época, era desnaturada com a alta temperatura da primeira etapa da reação, sendo necessárias reposições enzimáticas entre cada ciclo térmico. O verdadeiro uso e reconhecimento do método se deu após a introdução de DNA polimerases termoestáveis na reação, abolindo a necessidade da adição de enzima em cada ciclo térmico e diminuindo hibridizações inespecíficas entre os oligonucleotídeos e o DNA molde causadas pela baixa temperatura de extensão utilizada na época (37°C). A primeira enzima termoestável utilizada na PCR foi a Taq DNA polimerase isolada de

Thermus aquaticus, de onde seu nome foi derivado. ⁶ *T. aquaticus* é uma bactéria termofílica que vive em temperaturas próximas a 70 °C, podendo sobreviver entre 50 e 80 °C.

Figura 1 – Esquema geral da PCR. O DNA molde é desnaturado em altas temperaturas e tem um oligonucleotídeo iniciador hibridizado com a diminuição de temperatura. Depois disso, a temperatura é ajustada para que a DNA polimerase estenda o DNA molde (comumente 72 °C). Após vários ciclos térmicos, o fragmento de DNA de interesse pode ser obtido em grande quantidade. Para melhores resultados, os ciclos de amplificação por PCR são iniciados por uma desnaturação longa e encerrados com a extensão final de qualquer fragmento incompleto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Atualmente, a síntese de DNA *in vitro* é utilizada em diversos laboratórios do país, indo muito além das clonagens e estudos gênicos realizados em laboratórios de pesquisa. Em análises forenses, por exemplo, a PCR é utilizada para amplificar regiões pequenas e repetitivas do DNA (STRs, do inglês, *Short Tandem Repeats*) presentes em cenas do crime e de possíveis suspeitos. As STRs, algumas vezes chamadas de regiões de microssatélites, possuem cerca de 2 a 7 nucleotídeos que se repetem ao longo de uma região genômica, dando origem a alelos de tamanhos específicos para cada indivíduo. O perfil alélico de cada indivíduo gera uma espécie de “impressão digital” que é usada na comparação e identificação de criminosos. A acurácia dessa técnica é de um falso positivo em 10 bilhões, quando analisados treze STRs diferentes.⁷

Em diagnósticos clínicos, a PCR é utilizada para amplificar regiões específicas dos ácidos nucleicos dos parasitas provindos de amostras de pacientes. Nesses casos, a amplificação positiva indica a presença do parasita nas amostras do paciente, como ocorre em testes de tuberculose, varíola, vírus do papiloma humano (HPV, do inglês, *Human Papiloma*

Virus), hepatite, coronavírus entre outros.⁸ Como exemplo da importância clínica da PCR, desde fevereiro de 2014, todas as bolsas de sangue doadas nos hemocentros do Brasil passam, obrigatoriamente, pelo teste do ácido nucleico (NAT, do inglês, *Nucleic Acid Test*) para a detecção dos vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) e hepatite C no sangue do doador.⁹

1.2 DNA POLIMERASES

A grande maioria das DNA polimerases encontradas em diversos organismos são compostas por dois domínios proteicos: um domínio exonuclease e outro DNA polimerase.¹⁰ O domínio DNA polimerase possui um formato similar ao de uma mão direita semifechada, como indicado no fragmento Klenow (domínio DNA polimerase da Polimerase I de *E. coli*) da Figura 2. Nessa comparação, é possível distinguir o subdomínio referente aos dedos (amarelo) no qual os dNTPs se ligam e interagem com a simples fita de DNA. O subdomínio polegar (verde) se liga à dupla fita de DNA, enquanto o subdomínio da palma (vermelho) contém os aminoácidos catalíticos, que também irão interagir com o dNTP.¹¹⁻¹³

Figura 2 – Estrutura do fragmento Klenow de *E. coli* (PDB: 1KFD) comparado a uma mão direita semifechada. Os subdomínios dedos, polegar e palma são mostrados em amarelo, verde e vermelho, respectivamente. O domínio exonuclease é mostrado sombreado em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

O domínio exonuclease pode exercer sua função na direção 5'-3' do DNA, sendo muito utilizado na degradação de fragmentos de Okazaki das forquilhas de replicação, ou na direção 3'-5', funcionando como ferramenta reparadora quando há inserção de um nucleotídeo incorreto durante a síntese de DNA.¹ A natureza do domínio exonuclease pode nos indicar algumas características sobre as DNA polimerases nativas (sem manipulação genética). Enzimas com domínio reparador 3'-5' exonuclease geram menos mutações durante a síntese de DNA, uma vez que possuem a chance de corrigi-las. Por outro lado, a excisão de uma base incorreta gera uma interrupção do processo de polimerização, fazendo com que o tempo médio de inserção de bases seja maior. As enzimas com domínio 5'-3' exonuclease comumente são mais rápidas nas síntese de DNA, sendo muito utilizadas na síntese de grandes fragmentos de DNA (que necessitam de forquilhas de replicação), como o DNA genômico.¹⁰

Além dos domínios DNA polimerase e exonuclease, outros domínios acessórios podem ser encontrados em DNA polimerases, como domínios de ligação ao DNA dupla fita, de ligação a oligonucleotídeos e liases.¹⁴

Dentre as várias características de uma DNA polimerase, algumas serão definidas para o melhor entendimento desse trabalho:

- Termoequilíbrio: ter estrutura e função proteica estável em altas temperaturas;
- Fidelidade: precisão de uma DNA polimerase em incorporar o maior número de nucleotídeos de acordo com o pareamento de Watson e Crick.¹⁵ A fidelidade pode ser expressa em taxa de erro por nucleotídeo ou frequência de erro (mutação por nucleotídeo por ciclo) e depende tanto da enzima, quanto das condições reacionais;¹⁶
- Especificidade: capacidade de introduzir nucleotídeos em uma fita nascente de DNA a partir da hibridização perfeita entre um oligonucleotídeo iniciador e o DNA molde, sem sínteses inespecíficas geradas por hibridizações incorretas;
- Processividade: número de nucleotídeos que uma DNA polimerase incorpora em uma fita crescente de DNA durante um único evento de ligação. A processividade está, muitas vezes, relacionada com a velocidade de polimerização de cada enzima. Enzimas altamente processivas são capazes de incorporar milhares de nucleotídeos em cada evento de ligação ao DNA, enquanto que enzimas pouco processivas, que sintetizam DNA de uma forma distributiva, podem incorporar até 100 nucleotídeos.¹⁷ É possível aumentar a processividade das DNA polimerases

pouco processivas com a adição de domínios que estabilizam a ligação da polimerase ao DNA, como ocorre na enzima *Phusion* (*Thermo Fischer*);¹⁰

- Sensibilidade: habilidade de polimerizar fragmentos de DNA em uma PCR a partir de uma quantidade mínima de DNA molde. A sensibilidade é comumente definida como a menor quantidade de DNA molde necessária para a amplificação (em picogramas).

Além disso, é vantajoso que uma enzima seja pouco inibida por moléculas contaminantes que podem estar presentes na mistura reacional, comumente encontradas junto à fonte de DNA molde, como sangue, solo, parafina e meio de cultura.¹⁸ São classificadas como robustas as enzimas que possuem alto teor das várias das características acima citadas.

1.3 TAQ DNA POLIMERASE

Taq DNA polimerase (referenciada ao longo do texto como “Taq”) foi isolada em 1976 a partir de amostras de bactérias termófilas *T. aquaticus* encontradas no Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos).⁶ A primeira estrutura cristalográfica dessa enzima foi obtida em 1995, revelando uma estrutura semelhante à de muitas proteínas sintetizadoras de DNA conhecidas: possui um domínio exonuclease 5’-3’ em seu N-terminal e um domínio DNA polimerase muito conservado entre as enzimas que sintetizam ácidos nucleicos.¹¹ Seu domínio DNA polimerase também apresenta o formato de uma mão direita semifechada (Figura 3).

Figura 3 - Comparação da estrutura de Taq (PDB: 1TAU) com uma mão direita semiaberta. Os subdomínios palma, dedos e polegar estão representados em vermelho, amarelo e verde, respectivamente. O domínio exonuclease 5’-3’ é mostrado em azul escuro e o domínio 3’-5’ exonuclease degenerado é mostrado em azul claro. A molécula de DNA ligada é mostrada em laranja.

Fonte: Elaborada pela autora.

A DNA polimerase de *Thermus aquaticus* não possui atividade exonuclease 3'-5', o que elimina a atividade corretora da enzima, diminuindo assim a sua fidelidade. Apesar da baixa fidelidade parecer indesejável para qualquer DNA polimerase, essa característica é explorada em metodologias de mutações randômicas e em clonagens por extremidades coesivas TA, uma vez que Taq possui atividade terminal transferase preferencial por adeninas (deixando um dAMP adicional nas extremidades 3' do DNA sintetizado).¹⁹ Além disso, Taq é uma enzima com alta processividade, gerando sínteses mais rápidas.²⁰ Como exemplo, Taq é capaz de incorporar 1000 nucleotídeos entre 30 e 60 segundos, enquanto que outras polimerases, como Pfu, de *Pyrococcus furiosus*, incorporam os mesmos 1000 nucleotídeos entre 60 e 120 segundos.²¹ Dessa forma, Taq tornou-se a enzima mais amplamente utilizada em PCR, não só por fatores históricos, mas pelo seu variado campo de aplicação e pela sua capacidade de amplificar DNA de diversas naturezas.

1.4 TAQ DNA POLIMERASE *HOT START*

A utilização de amostras complexas no uso da PCR (células, tecidos, sangue, mucosas, solo, dentre outros) pode promover a inibição da DNA polimerase e a ligação dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados em regiões não específicas do DNA, gerando amplificações inespecíficas que podem levar a interpretações errôneas.²² Em alguns casos, a variação da temperatura de hibridização dos *primers* pode solucionar esse problema, favorecendo a hibridização dos *primers* nas regiões corretas. Porém, as amplificações inespecíficas e a formação de dímeros de *primers* podem persistir devido à atividade residual que Taq possui entre 20 e 40 °C, temperatura em que se costuma preparar a mistura reacional da PCR.²³

Visando solucionar essa limitação, foram desenvolvidas metodologias de PCR que impedem a ação da DNA polimerase a temperatura ambiente. Uma das metodologias consiste em preparar as reações no gelo, o que impede a ação da Taq, e colocá-las em um termociclador previamente aquecido no ciclo de desnaturação inicial do DNA molde. Outra metodologia consiste em preparar as reações a 70 °C, evitando a hibridização inespecífica dos oligonucleotídeos iniciadores. Apesar de efetiva, o preparo reacional em altas temperaturas favorece a evaporação da água da mistura reacional, podendo alterar as concentrações dos reagentes e, conseqüentemente, prejudicar a reação.²⁴ Além disso, ambas as metodologias são

laboriosas quando executadas em larga escala, o que evidenciou a necessidade de novos métodos de PCR.

Assim surgiram as PCRs que separam seus componentes reacionais, impedindo o início da reação em baixas temperaturas. Para isso, primeiramente adiciona-se parte dos reagentes da PCR em um microtubo e, em cima desses reagentes, derrama-se cera que se solidifica a temperatura ambiente, isolando diferentes componentes reacionais. Depois disso, adiciona-se o restante dos componentes reacionais e, com o aquecimento inicial (ou ciclo *Hot Start*), a cera derrete e todos os componentes se misturam, dando início a síntese de DNA.²⁵ Essa metodologia foi denominada *Hot Start*, referenciando o aquecimento inicial (ou ciclo *Hot Start*) necessário para a reação enzimática. Outras técnicas de separação de componentes reacionais também foram criadas, como a de precipitação de íons de magnésio (Mg^{+2}) da solução, abordada nos próximos itens. Porém, essas metodologias mostraram-se antiquadas e foram substituídas por enzimas *Hot Start*.

Taq DNA polimerase *Hot Start* é uma enzima inativada em baixas temperaturas devido à ligação de biomoléculas ou grupamentos químicos termosensíveis, ou ainda por ser naturalmente sensível a baixas temperaturas.²⁶⁻³¹ Por motivos históricos e comerciais, convencionou-se chamar essas enzimas de Taq DNA polimerase *Hot Start* (denominadas ao longo do texto como “Taq HS”), mesmo que algumas delas não necessitem da ativação inicial, ou ciclo *Hot Start*.

1.4.1 TAQ DNA POLIMERASE LIGADA A BIOMOLÉCULAS

Atualmente, a maior parte das Taq HS são geradas a partir da interação de uma Taq DNA polimerase com outras biomoléculas, como anticorpos e aptâmeros de DNA. Essas biomoléculas bloqueiam estericamente a cavidade de ligação ao DNA da enzima, inibindo assim a atividade polimerásica em baixas temperaturas.^{30, 32} Em ambos os casos, o pré-aquecimento da PCR a 95 °C promove o desligamento entre a biomolécula inibidora e a enzima, deixando a polimerase livre para a síntese de DNA.^{26, 30, 32-33}

Visando purificar DNA polimerases com a ajuda de anticorpos, Scalice e colaboradores produziram nove anticorpos monoclonais contra Taq (nomeados TP 1 a 9).²⁶ Quando utilizados seis vezes em excesso molar, seis desses nove anticorpos foram capazes de inibir mais de 80% da atividade enzimática, mostrando-se aptos na produção de enzimas *Hot Start*. Até hoje, pouco se sabe sobre a interação entre esses anticorpos e Taq, além de que

cada anticorpo se liga em regiões distintas da enzima. A única estrutura cristalográfica obtida do complexo Taq-anticorpo é mostrada na Figura 4 (PDB: 1BGX), que mostra as principais mudanças ocorridas entre a enzima complexada com o DNA (esquerda) e com a região Fab do anticorpo TP7 (direita).³⁴ Nessa estrutura, TP7 é representado em preto (cadeia pesada) e cinza (cadeia leve) e encontra-se na cavidade de ligação ao DNA, mostrando que a inibição de Taq ocorre por impedimento estérico.

Figura 4 – Comparação entre Taq ligada ao DNA (esquerda, PDB: 1TAU) e ligada ao anticorpo TP7 representado em preto e cinza (direita, PDB: 1BGX). Em azul escuro, azul claro, amarelo, vermelho e verde estão representados, respectivamente, o domínio 5'-3' exonuclease, 3'-5' exonuclease degenerado e os subdomínios dedos, palma e polegar. A estrutura sombreada da direita é o alinhamento do domínio DNA polimerase das enzimas complexadas com DNA e TP7, mostrando que a maior mudança estrutural ocorre no domínio 5'-3' exonuclease, enquanto que o domínio polimerase sofre poucas mudanças.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro método de inibição de Taq é por ligação a aptâmeros de DNA. O nome aptâmero vem do latim “aptus” que significa apto/adequado, e do grego “meros”, que significa parte. Aptâmeros são oligonucleotídeos ou peptídeos que possuem afinidade por uma determinada molécula alvo, ou seja, que se ligam a uma parte (molécula) específica. O desenvolvimento de aptâmeros de DNA contra Taq teve um grande avanço na década de 1990 devido à técnica de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX, do inglês, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*).³⁵ Graças a essa técnica, Dang e Jayasena selecionaram três sequências de fita simples de DNA capazes de se ligar a Taq com alta afinidade e inibir sua atividade abaixo de 40 °C, surgindo, assim, uma enzima *Hot Start* por ligação a aptâmero de DNA.²⁷ Embora não exista estrutura disponível do complexo Taq-Aptâmero, estudos computacionais indicam que os aptâmeros selecionados no trabalho de Dang e Jaysena possuem estrutura tipo grampo de cabelo (do

inglês, *hairpin*), indicando que os oligonucleotídeos possivelmente ligam-se na mesma cavidade do DNA.^{27, 36}

1.4.2 TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* POR MODIFICAÇÕES QUÍMICAS

As modificações químicas reversíveis em proteínas são muito utilizadas no sequenciamento proteico para bloquear alguns sítios de clivagem de trispsina na molécula alvo, gerando fragmentos maiores para o sequenciamento.³⁷⁻³⁹ Uma vez que essas modificações são reversíveis, esses fragmentos podem ser analisados diretamente no sequenciamento, ou trispsinizados em pedaços menores para nova análise. Essa técnica de modificação química utiliza moléculas derivadas de anidrido maleico e possui um significativo aumento na cobertura de sequências analisadas por espectrometria de massas.⁴⁰

Visando produzir uma Taq HS por modificação química, Birch e colaboradores utilizaram essas mesmas modificações químicas reversíveis para bloquear a atividade da polimerase em baixas temperaturas, criando assim a AmpliTaq Gold™.⁴¹ Essa enzima *Hot Start* também é tratada com derivados de anidrido maleico que reagem com lisinas da polimerase em pHs básicos e se desligam da enzima em pHs ácidos (Figura 5). Já foram descritos outros reagentes e metodologias de produção de enzimas modificadas quimicamente, porém, tais metodologias utilizam reagentes menos específicos ou procedimentos agressivos à DNA polimerase.^{29, 42}

Figura 5 - Modificação química reversível utilizando derivados de anidrido maleico. Em pHs básicos, o derivado de ácido maleico se liga ao grupo amino da cadeia lateral de lisinas de uma proteína e, em pHs ácidos e meio aquoso, a molécula sofre hidrólise liberando um derivado de ácido maleico e a enzima na forma ativa. As derivações da molécula de anidrido maleico ocorrem no substituinte “R”, onde R pode ser um hidrogênio (anidrido maleico), metila (anidrido citracônico), ácido etanóico (anidrido cis-aconitato), dentre outros.

Fonte: Adaptada de BIRCH 1997⁴¹

A maior limitação de enzimas quimicamente modificadas é o meio reacional, pois faz-se necessária a utilização de uma solução tampão que mantenha o pH básico em baixas temperaturas, e torne-se levemente ácido em altas temperaturas. Por isso, em PCRs com DNA polimerases modificadas quimicamente, a solução tampão mais utilizada é composta por tris em concentrações que variam entre 10 e 20 mM e pH entre 8,0 e 8,3, já que essa solução tampão pode chegar a pH 6,5 quando aquecida a 95 °C, favorecendo assim a hidrólise do grupo modificador durante o ciclo *Hot Start*.⁴³⁻⁴⁴

1.4.3 TAMPÃO *HOT START* POR PRECIPITAÇÃO DE ÍONS DE MAGNÉSIO

Na busca de alternativas econômicas para uma PCR *Hot Start*, Barnes e Rowlyk desenvolveram em 2002 uma solução tampão *Hot Start* baseada na precipitação de íons de magnésio da solução, cofator enzimático da Taq.³¹ Essa solução tampão tem o seu pH ajustado com ácido fosfórico e não possui magnésio em sua composição. Ao misturar os íons de magnésio com o tampão da enzima, os íons fosfatos provenientes do ácido fosfórico sequestram os magnésios da solução, formando precipitados brancos visíveis a olho nu. Após a precipitação, os componentes reacionais são adicionados e a PCR é conduzida normalmente. Por causa desses precipitados que se parecem com pedras minúsculas, esse tampão foi nomeado *RockStart*.³¹ A ressolubilização dos íons de magnésio ocorre após o ciclo *Hot Start* e se mantém ao longo das temperaturas mais elevadas das etapas de hibridização e síntese do DNA.

A solução tampão *RockStart* mostrou-se eficiente na amplificação de fragmentos de DNA que são somente amplificados por enzimas *Hot Start*. Porém, a precipitação dos íons de magnésio leva, pelo menos 15 minutos, o que pode ser um inconveniente para certas aplicações.³¹

1.4.4 MUTANTES DE TAQ DNA POLIMERASE SENSÍVEIS A BAIXAS TEMPERATURAS

Em busca de alternativas para a obtenção de Taq HS, Kermekchiev e colaboradores mostraram que a substituição de alguns resíduos da cadeia polipeptídica da DNA polimerase (por exemplo, E626K, W706R, I707L e E708D) resultou em uma redução considerável da atividade enzimática a baixas temperaturas, mantendo a atividade da enzima a 72 °C.³⁰ Análises estruturais do domínio DNA polimerase mostraram que, na presença de dNTP, o

domínio adota uma conformação fechada, com as pontas do subdomínio dos dedos movendo-se para dentro (estrutura sombreada em cinza na Figura 6). Os resíduos mutados posicionam-se no subdomínio dos dedos, longe do sítio ativo, mas no cerne do subdomínio móvel. Estudos cristalográficos do mutante I707L mostraram que o resíduo Leu707 da proteína mutada adota uma conformação apontada para interior do subdomínio, movendo o resíduo Phe749 em direção à hélice O móvel. Essa mudança conformacional gera um espaço vazio nessa região que dá mais mobilidade ao subdomínio dedos e promove um rearranjo na hélice O, que se afasta do sítio ativo, deixando uma cavidade maior no mesmo (estrutura colorida, Figura 6). Com esse espaço aumentado, duas adeninas sequenciais da fita de DNA molde formam um empilhamento entre si que empurram o próximo nucleotídeo a ser copiado para fora do sítio ativo, impedindo a síntese do DNA.^{14, 45}

Figura 6 - Sobreposição do domínio polimerase do mutante sensível a temperatura de Taq (colorido, PDB: 4N56) e sua versão nativa (sombreado, PDB: 4KTQ). Os subdomínios palma e polegar estão representados em vermelho e verde, respectivamente. O domínio dedos está representado em amarelo, com destaque para a hélice O em laranja. O DNA ligado a mutante CS está representado em rosa claro, com o empilhamento não usual das adeninas representado em rosa escuro.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.5 PRODUÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE NO BRASIL

Embora a PCR utilizando Taq seja uma técnica rotineira em laboratórios de pesquisa, análises forenses e diagnósticos clínicos, o principal reagente dessa técnica, Taq HS, possui apenas um fabricante no Brasil e é produzida por ligação a anticorpo. Sabe-se que nem todos os anticorpos anti-Taq disponíveis são eficientes, sendo necessário um grande excesso molar para produzir uma enzima *Hot Start*.²⁶ O uso de aptâmeros também não inativa 100% a atividade da enzima a temperatura ambiente e pouco se sabe sobre enzimas modificadas quimicamente. Além disso, alguns tipos de enzimas *Hot Start* são mais eficientes em algumas aplicações específicas, mas isso nunca foi bem descrito. Como exemplo, Purzycka e colaboradores mostraram que AmpliTaq Gold® (*Applied Biosystems*, modificada quimicamente) foi mais sensível na detecção de STRs humanas do que *JumpStart*™ Taq (*Sigma-Aldrich*) e *Platinum*® Taq (*Invitrogen*), ambas polimerases *Hot Start* ligadas à anticorpo.⁴⁶ Por outro lado, Halley e Prezioso mostraram que a *Hot Start* química foi menos sensível do que a ligada à anticorpos na amplificação do gene humano TNF.⁴⁷

Apesar de existirem protocolos de produção de Taq recombinante já publicados, acredita-se que as empresas produtoras da enzima utilizem processos de purificação elaborados e, até o momento, sigilosos. Isso porque estudos indicam a presença de grande quantidade de DNA bacteriano contaminando as enzimas produzidas de acordo com os protocolos existentes, o que não ocorre com as Taqs comerciais. Tal fato inviabiliza o uso da DNA polimerase produzida por laboratórios não especializados em diagnósticos clínicos e torna a produção dessa enzima mais desafiadora.⁴⁸⁻⁴⁹

Dessa forma, o Brasil necessita de um desenvolvimento nacional e domínio da tecnologia de produção de Taq (nativa e *Hot Start*) para diminuir a nossa dependência de importação dessa enzima, que resulta em altos valores e longos prazos de entrega.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese de doutorado foi o desenvolvimento de uma metodologia de produção de Taq DNA polimerase de alta qualidade e suas versões *Hot Start* para a produção de uma enzima com mínima atividade a baixas temperaturas. Além disso, almeja-se comparar as Taqs *Hot Start* produzidas para o melhor entendimento de suas características e aplicações. Diante disso, os objetivos específicos, foram:

- Clonagem da sequência de DNA codificante (CDS, do inglês, *CoDing Sequence*) de Taq nos vetores de expressão pET-M11, pET-TRX e pET-NUS;
- Avaliação das condições de expressão heteróloga da enzima;
- Desenvolvimento da metodologia de purificação de Taq;
- Análise da contaminação da enzima purificada com ácidos nucleicos e nucleases;
- Desenvolvimento da metodologia de determinação de unidades de DNA polimerase;
- Produção de mutantes de Taq sensíveis a baixas temperaturas;
- Produção de Taq HS por ligação a anticorpo, aptâmero e modificação química;
- Avaliação das enzimas produzidas frente a diferentes tipos de amplificações;
- Correlacionar o melhor tipo de Taq HS para cada aplicação específica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido em parceria com a empresa Cellco Biotec do Brasil Ltda que possui interesse no desenvolvimento e comercialização das enzimas Taq DNA polimerase (Taq) e Taq DNA polimerase *Hot Start* (Taq HS). Dessa forma, por motivo de sigilo e interesses comerciais, algumas metodologias e reagentes considerados essenciais no processo de produção dessas enzimas não foram descritos explicitamente.

3.1 CONSTRUÇÃO DOS SISTEMAS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

3.1.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE CLONAGEM

A clonagem da sequência de DNA codificante de Taq foi feita diretamente em vetores de expressão bacterianos utilizando a metodologia de clonagem independente de ligação (LIC, do inglês, *Ligation Independent Cloning*).⁵⁰ Os vetores de expressão utilizados foram construídos anteriormente em nosso laboratório a partir da modificação do plasmídeo pET-28a (Novagen), como mostrado na Figura 7. Os plasmídeos utilizados expressam uma proteína contendo uma cauda de seis histidinas em seu N-terminal, seguida ou não por uma proteína carreadora (*tag*), sítio de clivagem de TEV protease e, finalmente, Taq DNA polimerase.

Figura 7 - Modificação do vetor pET-28a para gerar os vetores de expressão utilizados. A CDS de Taq foi clonada no plasmídeo que não continha proteína carreadora (pET-M11) e nos plasmídeos contendo TiorredoxinaA (pET-TRX) e NusA (pET-NUS).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a clonagem, foram utilizados três plasmídeos distintos, nomeados de acordo com a proteína carreadora localizada no N-terminal, após a cauda de histidina:

- pET-M11: contém apenas 6xHis no N-terminal da proteína expressa e não possui proteína carreadora;
- pET-TRX: possui a proteína redutora de *E. coli* Tiorredoxina A (TrxA). TrxA é uma proteína de, aproximadamente, 12 kDa e é altamente solúvel, o que ajuda na solubilização das proteínas fusionadas a ela;⁵¹⁻⁵²
- pET-NUS: contém como fusão a proteína A de utilização de substância N (do inglês, NusA). NusA (aproximadamente 54 kDa) possui elevada solubilidade e pode aumentar a solubilidade da proteína de interesse.⁵¹⁻⁵²

3.1.2 AMPLIFICAÇÃO DE *TAQ* DNA POLIMERASE E DOS VETORES DE EXPRESSÃO

A amplificação da CDS de Taq DNA polimerase foi feita por PCR a partir de um plasmídeo cedido pela empresa *Jena Bioscience*, nomeado pTaq. Tal plasmídeo possui a CDS nativa da DNA polimerase de *T. aquaticus* (código de acesso no GenBank: J04639, 121 a 2619 pb) contendo 2499 pb que codificam uma proteína de 832 aminoácidos (94 kDa). Apesar de possuir o plasmídeo contendo a CDS de Taq, a *Jena Bioscience* não produz essa enzima, mas comercializa Taq de outros fornecedores. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação foram sintetizados com sequências adicionais em suas extremidades 5' e 3' (Tabela 1). Essas sequências são necessárias no emprego da LIC, como será descrito posteriormente.⁵⁰

Tabela 1 – *Primers* utilizados para a clonagem da CDS de Taq DNA polimerase nos vetores de expressão. As siglas “Fw” e “Rv” no nome de cada *primer* indicam que os mesmos delimitam as posições 5' e 3' do fragmento a ser amplificado, respectivamente. Em azul estão indicadas as sequências adicionais usadas para hibridização de inserto-vetor do sistema LIC.

Primer	Sequência
Taq_Fw	CAGGGCGCCATGGAATTCGGGATGCTG
Taq_Rv	GACCCGACGCGGTTACTCCTTGGCGGAGAGC
pET_lic_Fw	TGGCGCCCTGAAAATAAAG
pET_lic_Rv	CCGCGTCGGGTCAC

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amplificação de *taq* DNA polimerase e dos vetores de expressão, foram usados 10 ng de plasmídeo molde e a enzima *Phusion* (*Thermo Scientific*). As condições de termociclagem empregadas na PCR estão mostradas na Figura 8, com a utilização de 65 °C na

hibridização (T_H). As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Insertos e vetores foram purificados utilizando o *kit PCR Purification* (Jena Bioscience) e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Figura 8 - Ciclo de amplificação utilizado para a enzima *Phusion* (Thermo Scientific). Para a amplificação dos vetores, foi utilizado o mesmo ciclo de PCR com T_H de 65 °C e tempo de extensão de 2:30 min.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.3 CLONAGEM INDEPENDENTE DE LIGAÇÃO (LIC)

O sistema LIC baseia-se na formação de extremidades coesivas entre os insertos e vetores a serem hibridizados.⁵⁰ Para tanto, os vetores e insertos foram tratados com T4 DNA polimerase (New England Biolabs, NEB) na presença de dTTP e dATP, respectivamente. Foram feitas reações de 20 µL utilizando o tampão 2.1 (NEB) na presença de 600 ng de vetor (ou 0,2 pmol inserto), 0,25 mM de dTTP (ou 0,25 mM de dATP para o inserto) (Jena Bioscience), 5 mM de ditiotretitol (DTT, Sigma Aldrich) e 1 U de T4 DNA polimerase. As reações ocorreram a 22 °C por 30 min e a enzima foi desnaturada a 75 °C por 20 min.

A hibridização foi feita pela incubação de 4 µL do inserto com 1 µL do vetor tratados por 10 min a 22 °C, seguido pela adição de 1 µL ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 25 mM e incubação a 22 °C por 5 min. Após a incubação com EDTA, os fragmentos foram utilizados para transformar 100 µL de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes.⁵³ As bactérias transformantes foram selecionadas em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina.

Os clones positivos foram confirmados por meio de PCR de colônia. As colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido contendo canamicina e tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos com o auxílio do *kit Fast-n-easy plasmid mini-prep* (Cellco Biotec). A integridade das construções foi confirmada por sequenciamento de Sanger no sequenciador 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.2 MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

Os mutantes de Taq DNA polimerase sensíveis a temperatura (mutantes CS) foram construídos utilizando a metodologia de desenho de *primers back-to-back* (descrita no *kit Q5 Site-Directed Mutagenesis*, NEB). Nessa metodologia, os *primers* não se sobrepõem e apenas o *primer* 5' carrega a mutação desejada. O início de cada *primer* se hibridiza em bases adjacentes do plasmídeo, deixando os *primers* “de costas” um para o outro, como sugere o nome do método.

Como DNA molde, foi utilizado o vetor pJET (*Thermo Scientific*, 2974 pb) contendo a CDS de Taq DNA polimerase. Foram planejadas duas mutações sequenciais, E626K e I707L, sendo que a amplificação dos plasmídeos mutados foi realizada a partir de 5 ng de pJET-Taq DNA polimerase, com o auxílio da polimerase de alta fidelidade *Phusion* (*Thermo Scientific*). As misturas reacionais e ciclos térmicos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, usando-se 65 °C de temperatura de hibridização. A enzima mutante é referida nesse trabalho como Taq mutante CS.

As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os DNA mutantes amplificados foram purificados com o *kit PCR purification* (*Jena Bioscience*). Para a circularização dos vetores, 50 ng dos DNAs foram tratados, simultaneamente, com 10 U de T4 PNK (NEB) e 5 U de T4 DNA ligase (*Thermo scientific*), de acordo com as instruções de uso da ligase. As reações foram utilizadas para transformar 100 µL de *E. coli* DH5α quimiocompetentes posteriormente selecionadas em LB ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. Algumas colônias foram crescidas e tiveram seus DNA plasmidiais extraídos (*Fast-n-easy plasmid mini-prep kit*, Cellco Biotec). As mutações foram confirmadas pelo sequenciamento dos plasmídeos utilizando o método de Sanger (3130 *Genetic Analyzer*, Applied Biosystems). A CDS de Taq mutante CS foi clonada no vetor de expressão pET-M11 como descrito nos itens 3.1.2 e 3.1.3.

3.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TAQ DNA POLIMERASE

3.3.1 TESTE DE EXPRESSÃO COM DIFERENTES VETORES

Células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) foram transformadas com os vetores pET-M11, pET-TRX e pET-NUS contendo a CDS de Taq clonada. As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar e selecionadas com 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/ mL de cloranfenicol. Uma colônia única de cada placa foi crescida em meio LB contendo os mesmos antibióticos por 16 h a 37 °C e 200 rpm. As culturas foram diluídas 100 vezes no mesmo meio e foram deixadas nas mesmas condições de temperatura e agitação. Após 4 h, foi adicionado 1 mM de isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG) e as expressões proteicas foram avaliadas a 37 °C (durante 4 h) e 18°C (durante 16 h).

Todas as culturas tiveram as suas densidades ópticas medidas a 600 nm (DO_{600nm}) e o equivalente a 2 mL de cultura a 1 unidade de absorbância (UA) foi centrifugada a 10.000 x g durante 1 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise, contendo 1 mM de fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF), 0,1 mg/mL de lisozima e 100 U/mL de Turbo nuclease (Cellco Biotec). As soluções foram mantidas no gelo por 30 min e a lise se deu por quatro etapas de congelamento em nitrogênio líquido. A fração solúvel foi separada por centrifugação a 10.000 x g durante 5 min e a fração insolúvel foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE 10% e a expressão proteica de Taq com suas diferentes fusões foi quantificada com auxílio do programa Image Lab (Bio-Rad).⁵⁴

3.3.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO

A otimização das condições de expressão foi feita variando-se células de expressão, meios de cultura, temperaturas e tempos de expressão. Primeiramente, foram feitos testes de expressão com as cepas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3), Rosetta pLysS (DE3) e BL21 (DE3) transformadas com pET-M11-Taq DNA polimerase. Os ensaios foram feitos como descrito no item 3.3.1, com os antibióticos adequados para cada cepa, e as expressões foram monitoradas a 37 °C, 25 °C e 18 °C.

Para a avaliação dos meios de cultura, foi usada a cepa *E. coli* Rosetta 2 (DE3) contendo o plasmídeo pET-M11-Taq DNA polimerase. Os testes de expressão foram realizados em meio LB, *Terrific Broth* (TB) e ZYM-5052 como descrito no item 3.3.1 (sem a adição de IPTG nas culturas crescidas em ZYM-5052). Por fim, as expressões de Taq em *E. coli* Rosetta 2 (DE3) crescidas em meio ZYM-5052 a 25 °C foram monitoradas durante 4 h, 16 h e 24 h. Todas as expressões foram analisadas por SDS-PAGE.

3.4 PURIFICAÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE

3.4.1 CLARIFICAÇÃO

Após o período de expressão, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 20 min a 4 °C. O meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas com 1/10 do volume inicial em tampão de lise. Suspensões equivalentes a 4 L de cultura bacteriana inicial foram estocadas separadamente a -20 °C até o dia de uso.

As culturas foram descongeladas em temperatura ambiente e, visando-se avaliar a necessidade da degradação de DNA bacteriano na etapa de purificação, 100 U/mL de benzonase foi adicionada à cultura de células que foi incubada no gelo por 5 min. O rompimento celular foi feito de forma mecânica a 4 °C em um homogeneizador APLAB-10 (Artepeças). Foram feitos quatro ciclos de homogeneização a uma pressão constante de 700 bar. As frações insolúveis do lisado foram separadas por centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4 °C.

3.4.2 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A primeira etapa de purificação proteica foi feita por cromatografia de afinidade no sistema de purificação AKTA Pure (*GE Healthcare*). O clarificado equivalente a 4 L de cultura bacteriana inicial foi carregado na coluna 1 previamente equilibradas em tampão de lise. As proteínas ligadas foram lavadas com 50 mL de tampão de lavagem, seguidos de 20 mL de tampão A1. A eluição da proteína foi feita com gradiente de 0 a 100% tampão B1 em 40 volumes de coluna (VC).

A eluição proveniente da primeira cromatografia de afinidade foi carregada na coluna 2 previamente equilibrada em tampão A2 para mais uma separação por afinidade (Figura 9). Foi feita uma lavagem com 2 VC de tampão A2 e a eluição se deu com gradiente de 0 a 100% tampão B2 em 20 VC.

Para a remoção da cauda de hexahistidina, a fração proteica da cromatografia de afinidade 2 foi incubada com Turbo TEV protease (Cellco Biotec) na proporção de 1 mg de protease: 20 mg de Taq. A solução foi suplementada com 1 mM de DTT e a clivagem ocorreu por 16 h a 4 °C. A solução de Taq, TEV protease e 6xHis-tag foi injetada em uma HisTrap de 5 mL (GE) equilibrada em tampão A. A polimerase livre da cauda de hexahistidina foi coletada na fração não ligada a coluna e na lavagem com 2 VC tampão A. A TEV protease e a cauda clivada foram eluídas com 100% tampão B com 5 VC.

Taq foi diluída em tampão A3 e carregada na coluna 3 (troca iônica) equilibrada no mesmo tampão. Foi feita a lavagem das proteínas ligadas com 2 VC tampão A3 seguida da eluição com gradiente de 0 a 100% tampão B3 em 40 VC.

Na etapa de cromatografia por exclusão molecular, empregou-se a coluna 4, previamente equilibrada com tampão GF. Foram realizadas injeções de 20 mL da fração de Taq proveniente da etapa anterior seguida de eluição isocrática no tampão de equilíbrio.

Figura 9 – Esquema sequencial das cromatografias utilizadas na purificação de Taq DNA polimerase. A terceira cromatografia de afinidade (HisTrap) não foi utilizada no protocolo final de purificação enzimática. Dessa forma, a cromatografia de afinidade 2 era seguida pela troca iônica.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A concentração enzimática de Taq foi inicialmente estimada por densitometria de bandas em gel SDS-PAGE com uma Taq comercial. Para isso, o equivalente a 10 µL de Taq

DNA polimerase a 5 U/ μL (*Jena Bioscience*) foi analisado em um gel SDS-PAGE juntamente com 10 μL de soluções contendo 0,1 e 0,2 mg/mL da polimerase purificada. De acordo com a análise densitométrica das bandas, realizada no programa Image Lab (Bio-Rad), a enzima purificada foi diluída para a mesma concentração da enzima comercial no tampão estoque (20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0,1% de Tween 20, 0,1% de Igepal e 50% de glicerol).

O cálculo de unidades enzimáticas de Taq foi baseado no *kit* EvaEZ™ (Biotium). O *kit* EvaEZ™ baseia-se no monitoramento da fluorescência do EvaGreen® em um termociclador de tempo real durante a extensão de um *primer* hibridizado à uma fita simples de DNA. Para o cálculo de unidades, foi necessário encontrar diluições da enzima teste que permita a observação da total extensão dos *primers* hibridizados (diluição de saturação, ilustrada pela curva de Taq a 5 nM) e a velocidade máxima da enzima (diluição teste, ilustrada pela curva de Taq a 0,31 nM) (Figura 10). Feito isso, é possível calcular o número de nucleotídeos incorporados na reação da diluição teste através da fórmula $(\Delta F/\Delta F_{\text{max}})*270$, onde ΔF é a fluorescência gerada pela diluição teste, ΔF_{max} é a fluorescência gerada pela diluição de saturação e 270 é a quantidade (pmoles) de nucleotídeos sintetizados em uma diluição saturante.⁵⁵⁻⁵⁶

Figura 10 – Ilustração das condições saturantes (5 nM) e teste (0,31 nM) de Taq DNA polimerase recomendadas para o cálculo de unidades do *kit* EvaEZ™.

Fonte: Adaptada de EVAEZ™ FLUOROMETRIC POLYMERASE ACTIVITY ASSAY KIT⁵⁶

Estudos do EvaGreen® mostraram que a sua fluorescência é linear para quantidades de DNA entre 0,1 e 100 ng DNA dupla fita.⁵⁷ Uma vez que 100 ng de DNA é equivalente a 308,2 pmoles de nucleotídeos, cada fita simples de DNA deveria conter, no máximo, 154,1 pmoles de nucleotídeos. Note que os 270 pmoles utilizados no *kit* EvaEZ™ extrapolam o

limite da linearidade de fluorescência requerido pelo EvaGreen®, fazendo com que o cálculo de nucleotídeos incorporados, segundo esse *kit*, seja impreciso. Por isso, decidiu-se produzir um ensaio de atividade similar ao EvaEZ™ e com menores quantidades de DNA.

A produção do DNA molde (*primers* hibridizados, referidos ao longo do texto como molde H) foi feita através da mistura de uma solução de *primer* 80-mer (10 µM) à uma solução de *primer* 22-mer (10 µM) em uma proporção 1:2 (sequência de *primers* mostrada na Figura 11). A solução foi aquecida a 95 °C por 1 min e resfriada a 4 °C com uma taxa de - 0,1 °C/s para a total hibridização dos *primers*.

Figura 11 – Sequência do molde H formado pela hibridização dos *primers* 80-mer e 22-mer. Em cinza é mostrado a região hibridizada. Os “x” cinzas indicam a região 3’ do *primer* 22-mer que não será estendida. O tracejado amarelo indica a região dos 48 nucleotídeos que serão incorporados durante a extensão do molde H.

Fonte: Elaborada pela autora.

A reação de extensão foi feita na presença do tampão de reação de Taq (20 mM de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂), 0,2 mM de dNTP mix, 1,4 µM de EvaGreen®, 50 nM de ROX, 0,66 µL de molde H e diluições de Taq (entre 1:10 a 1:10000). As reações foram conduzidas no termociclador de tempo real Stratagene Mx3005P (*Agilent Technologies*) por 30 min a 72 °C com a leitura de fluorescência a cada 30 s. Para amostras de Taq *Hot Start*, uma etapa de desnaturação inicial de 10 min a 95 °C foi realizada.

Para o cálculo de concentração, foi considerada uma reação de polimerização saturante (equivalente à curva com 5 nM Taq da Figura 10), em que cada molécula do molde H teria 48 nucleotídeos incorporados, gerando um total de 140 nucleotídeos dispostos em uma fita dupla de DNA. Portanto, considerando que a massa molecular média de cada nucleotídeo no DNA é de 325 g/mol (e 100 ng DNA possuem 308 pmoles de nucleotídeos), o número de mols de nucleotídeos estendidos será $(48 \times 308) / 140 = 105,7$ pmoles de nucleotídeos. Por analogia ao *kit* EvaEZ™, o número de nucleotídeos incorporados na reação com a diluição teste será $(\Delta F / \Delta F_{\max}) \times 105,7$. Se uma unidade de enzima incorpora 10 nmoles (ou 10.000 pmoles) de nucleotídeos em 30 min, o número de unidades enzimáticas da amostra teste (W) avaliada nesse mesmo período será:

$$W (U) = \frac{\text{Número de nucleotídeos incorporados}}{10000} =$$

$$W (U) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} \times 105,7 \times 10^{-4} \quad (\text{Equação 1})$$

Convencionando-se o uso de 5 µL das diluições enzimáticas em cada reação de 50 µL, a concentração de Taq DNA polimerase (C, U/µL) da amostra original será:

$$C (U/\mu\text{L}) = \frac{W \times \text{Diluição enzimática}}{5}$$

$$C (U/\mu\text{L}) = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} \times 2,11 \times 10^{-3} \times \text{Diluição enzimática} \quad (\text{Equação 2})$$

A equação 2 descreve um método absoluto para determinar a concentração de uma DNA polimerase de uma amostra desconhecida, sem o uso de radioisótopos ou análises comparativas. Esse método requer duas condições experimentais bem delimitadas: uma condição saturante, em que todo o molde H tenha sido estendido, e uma condição teste, em que se possa definir a linearidade entre tempo de reação e formação do produto (aumento da fluorescência). Para definir tais condições, uma Taq comercial (JBS, 5 U/µL) foi diluída de 10 a 10.000 vezes em 20 mM de Tris-HCl pH 8,0 + 50 mM de KCl e teve a fluorescência de sua reação avaliada, como descrito no início desse item.

3.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES NA POLIMERASE PRODUZIDA

3.6.1 DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR DNASES

A presença de nucleases foi avaliada pela análise eletroforética em gel de agarose do plasmídeo pUC19 incubado com a Taq produzida. Para a padronização do ensaio, 500 ng de pUC19 foram incubados na presença do tampão universal 1x (*Jena Bioscience*) e 0,2 mU de Turbo Nuclease (Cellco Biotec). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min, 1 h, 3 h, 5 h e 16 h e a inativação da reação se deu pela adição de 10 mM EDTA. O equivalente a 200 ng de DNA tratado com Turbo nuclease foi analisado eletroforéticamente em gel de agarose 1%.

A contaminação das amostras purificadas foi avaliada nas mesmas condições acima, com a substituição da Turbo nuclease por 5 U de Taq. As reações foram mantidas por 3 h a 37 °C e a inativação da reação e análise de degradação de DNA foram feitas como descrito acima.

3.6.2 DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR DNA BACTERIANO

A contaminação por DNA bacteriano nas amostras purificadas de Taq DNA polimerase foi detectada por PCR em tempo real da região 16S de *E. coli* através de reação com oligonucleotídeos específicos para essas regiões (AGGAGGTGATCCAACCGC e AACTGGAGGAAGGTGGGGAT).

Para quantificar os DNAs contaminantes de cada amostra, foi feita uma curva de calibração contendo diferentes concentrações de DNA genômico de *E. coli*. Além da reação controle (sem DNA molde), foram feitas reações contendo 100 pg, 10 pg e 1 pg de DNA genômico bacteriano (o equivalente a 20.000, 2.000 e 200 cópias desse DNA, respectivamente). Foram feitas reações de 20 µL que eram compostas por 10 µL do *qPCR master mix Sso7Fast* (Bio-Rad), 1 µL de cada *primer* 16S (10 µM) e os DNAs controles ou amostras testes (1 µL de Taq purificada a 5 U/µL).

A desnaturação inicial do DNA molde foi feita a 98 °C por 1 min e as amplificações se deram em 40 ciclos de desnaturação (98 °C por 10 s) e hibridização/extensão (60 °C por 20 s). Todas as reações foram monitoradas no termociclador de tempo real Stratagene Mx3005P (*Agilent Technologies*) e as análises quantitativas foram realizadas pelo programa MxPro (*Agilent Technologies*).

3.7 PRODUÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE *HOT START*

3.7.1 PRODUÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* POR LIGAÇÃO A BIOMOLÉCULAS

A produção de Taq HS ligada a biomoléculas se deu pela adição de anticorpos ou aptâmeros de DNA na enzima purificada. Para produzir a HS ligada a anticorpos, várias diluições do anticorpo JumpStart™ (*Sigma-Aldrich*) foram adicionadas à amostra de Taq

purificada (10 U/ μ L) e incubadas sob agitação a 4 °C por, pelo menos, 3 h. Todas as amostras testadas foram diluídas em tampão de estocagem de modo que a concentração de Taq final fosse 5 U/ μ L.

Para produzir Taq HS ligada a aptâmeros de DNA, foram utilizados sequências de aptâmeros descritos por Yakimovich e colaboradores;³⁶ Dang e Jayasena;²⁷ e Noma e Sode.⁵⁸ Os aptâmeros foram sintetizados pela empresa *Sigma-Aldrich* e foram solubilizados para a concentração final de 100 μ M no tampão de estocagem contendo 5 U/ μ L de Taq purificada. Essas soluções de aptâmeros foram diluídas, em diferentes proporções nas amostras de Taq, dando origem às Taqs HS ligadas a diferentes proporções de diferentes aptâmeros.

3.7.2 PRODUÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* QUIMICAMENTE MODIFICADA

Dois derivados de anidrido maleico foram incubados com a amostra de Taq purificada durante 3 a 16 h sob agitação moderada. Além do tempo de incubação, também foram variadas as concentrações de cada derivado de anidrido maleico e as temperaturas de reação. As reações foram interrompidas por um processo de diluição em tampão GF em coluna *HiTrap Desalting* de 5 mL (GE), retirando todos os derivados de anidrido maleico que não reagiram com a enzima. Todas as enzimas foram diluídas para a concentração de 5 U/ μ L em tampão de estocagem e foram avaliadas como descrito nas próximas seções.

3.7.3 PRODUÇÃO DO TAMPÃO *HOT START*

Em 2002, Barnes e Rowlyk decreveram um tampão *Hot Start* que se baseava na precipitação de íons de magnésio por íons fosfato, o que impediria a atividade da Taq.³¹ Em altas temperaturas, esses íons se solubilizariam e atuariam como cofatores na síntese de DNA por Taq.

O tampão descrito por Barnes e Rowlyk consistia em uma solução de 500 mM de Tris base, 160 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% de Tween 20 e 50 mM de H_3PO_4 (tampão HS 10x). Essa solução, assim como uma solução de 35 mM MgCl_2 , foi preparada e testada nos ensaios de atividade. Para formar os precipitados de magnésio, 5 μ L do tampão HS (10x) foram incubados com 5 μ L da solução de magnésio por 15 min a temperatura ambiente. Após esse

período, o restante dos componentes reacionais foram adicionados e as sínteses de DNA prosseguiram normalmente.

3.8 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA COMPARAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS

3.8.1 ENSAIO FUNCIONAL DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

O teste de sensibilidade na amplificação, a partir de pequenas concentrações de DNA molde, utilizou 100, 10 e 1 pg de DNA lambda (Promega) para amplificar um fragmento de 1 kpb, com o auxílio dos oligonucleotídeos Uni_Fw e 1000_Rv mostrados na Tabela 2. As amplificações foram avaliadas por análise eletroforética da reação em um gel de agarose 1,5%.

A amplificação de fragmentos de DNA de diversos tamanhos foi analisada pela amplificação de fragmentos de 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 pb. Foram utilizados os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 2 e os parâmetros de termociclagem usuais de Taq. O ensaio foi avaliado pela análise eletroforética das bandas de DNA amplificadas em um gel 0,8% de agarose.

Todos os testes foram realizados na presença do tampão de reação de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTP mix, 0,2 μ M de cada *primer*, diluições do DNA molde (ou 10 ng de DNA para as amplificações de até 5 kpb) e 2,5 U de Taq DNA polimerase. O ciclo térmico seguiu as recomendações de Taq e a temperatura de hibridização utilizada está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios funcionais de Taq DNA polimerase e as respectivas temperaturas de hibridização utilizadas nos ciclos de amplificação. As siglas “Fw” e “Rv” indicam que os *primers* se hibridizam nas posições 5’ e 3’ do fragmento a ser amplificado, respectivamente.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>T</i> _{hibridização} (°C)
Uni_Fw	ATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG	
500_Rv	AGGTTATCGAATCAGCCACAGCG	58
1000_Rv	CGGCGTACCTTTGTCTCACG	55
2000_Rv	ATAGCTGTCGTCATAGGACTCA	58
3000_Rv	AGCTCACCGTCGAACACTTTC	59
4000_Rv	CTTACCCCCGCCTTAACCAGTG	62
5000_Rv	CGCCAGCAGGGATTTCTCCTGTG	60
6000_Rv	CCGGGTTTCACTTTCCAGCG	59

Fonte: Elaborada pela autora.

As eficiências de amplificação de cada enzima foram estimadas com base nas quantificações relativas das bandas do gel. Para isso, todas as bandas do gel foram quantificadas pelo programa ImageLab (Bio-Rad) em relação à sua respectiva banda gerada pela enzima comercial. Como exemplo, a banda de 5 kpb da PCR com a Taq purificada foi quantificada em relação a banda de 5 kpb da enzima comercial, e assim, sucessivamente. Para os ensaios de sensibilidade, as bandas de Taq sintetizadas a partir de 100 pg de DNA molde foram quantificadas em relação à mesma banda de 100 pg de DNA molde da enzima comercial. Para gerar as quantificações relativas médias, foram calculadas as médias de todas as quantificações relativas obtidas em cada ensaio.

3.8.2 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE A BAIXAS TEMPERATURAS

A inibição da atividade residual de Taq a baixas temperaturas foi avaliada a partir do sinal de fluorescência do EvaGreen® intercalado ao fragmento de DNA, sintetizado pela enzima a 25 °C. A síntese do fragmento de DNA foi feita pela extensão de 2,25 µL do molde H (descrito no item 3.5) na presença do tampão de reação otimizado para cada Taq, 0,2 mM de dNTP mix, 1,4 µM de EvaGreen®, 50 nM de ROX e 5 U de Taq. As reações foram incubadas por 1 h a 25 °C ou 72 °C (com ciclo de desnaturação inicial de 95 °C por 10 min nas amostras deixadas a 72 °C). Para a inativação das enzimas, 50 mM de EDTA foi adicionado nas reações e a leitura das fluorescências foi conduzida no termociclador de tempo real Stratagene Mx3005P (*Agilent Technologies*) por 10 min a 72 °C, com leitura de fluorescência a cada 30 s.

3.8.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RECEPTOR DE INSULINA

A amplificação do gene humano do receptor da insulina foi feita no tampão de reação otimizado de cada Taq, suplementado com 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de oligo sense (CCATTAGCACCCAAAGCTAA), 0,3 µM de oligo anti-sense (GTAATGTGCTATGTACGGTA), 20 pg de DNA genômico humano e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Os ciclos térmicos foram precedidos da ativação das Taq HS (95 °C durante 10 min), seguidos de 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 20 s), hibridização (60 °C por 20 s) e

extensão (72 °C por 30 s). Todas as amplificações foram analisadas eletroforéticamente em gel de agarose 2%.

3.8.4 AMPLIFICAÇÃO DE DNA COM ALTA PORCENTAGEM DE GUANINA E CITOSINA

Para verificar a capacidade das polimerases produzidas de amplificar fragmentos de DNA com alta porcentagem de guanina e citosina (%GC), foi utilizado um fragmento de DNA de 820 pb do gene *blecherry*, contido no vetor pLEXSY_IE-blecherry4 (*Jena Bioscience*) que apresenta 67% GC.

Na reação de amplificação desse fragmento de DNA, foram adicionados os tampões de reação de cada enzima, 0,2 mM de dNTP mix, 0,2 µM do *primer* sense (GAGCTCCCTCCCTTTCCC), 0,2 µM do *primer* anti-sense (TTGTACAGCTCGTCCATGCC), 20 ng de pLEXSY_IE-blecherry4 e 2,5 U de enzima. As Taqs foram aquecidas por 95 °C, durante 10 min, para a ativação das enzimas HS e as amplificações seguiram por 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 30 s), hibridização (63 °C por 30 s) e extensão (72 °C por 50 s). Todas as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.8.5 PCRS MULTIPLEX

A análise do desempenho das Taqs produzidas em uma PCR multiplex foi realizada através da amplificação de seis regiões de micro satélite do DNA genômico humano (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26 e HSP-110), descritas por Campanella e colaboradores⁵⁹ e Berardinelli e colaboradores.⁶⁰ Nas reações, foram utilizados os tampões reacionais de cada Taq, 0,1 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP mix, 50 ng de DNA genômico humano, um mix de aditivos e 1 U de polimerase. As enzimas foram ativadas por 15 min a 95 °C e as amplificações ocorreram em 40 ciclos térmicos de desnaturação (95 °C por 15 s), hibridização (50 °C por 40 s) e extensão (72 °C por 30 s). As PCRs foram analisadas em gel de agarose 3% corrido a 100 V durante 1 h.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CLONAGEM

4.1.1 CLONAGEM DE TAQ DNA POLIMERASE E MUTANTES

A CDS de Taq DNA polimerase (referenciada ao longo do texto como “Taq”) foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos descritos no item 3.1.2. O DNA amplificado foi tratado com a enzima T4 DNA polimerase na presença de dATP para a formação de extremidades 5’ e 3’ coesivas aos vetores de expressão, previamente tratados com a mesma enzima. Os insertos e vetores de expressão tratados foram hibridizados e utilizados na transformação de células *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. Os clones positivos dos três vetores de expressão utilizados foram confirmados por meio de PCR de colônia (Figura 12).

Figura 12 – Amplificação da CDS de Taq para a clonagem nos vetores de expressão e PCR de colônia das células transformadas, para a confirmação da presença do inserto nos plasmídeos indicados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram feitas duas mutações sítio dirigidas na CDS de Taq presente no vetor pJET-Taq, de acordo com a metodologia de mutação descrita no kit *Q5 Site-Directed Mutagenesis* (NEB). As substituições E626K e I707L foram descritas por Kermekchiev e colaboradores como sendo as mutações mais eficazes em tornar a enzima sensível a temperatura.³⁰ Após a

confirmação das mutações por meio do sequenciamento, as CDS mutantes foram clonadas no vetor pET-M11 da mesma forma que a CDS selvagem.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

A expressão de Taq foi otimizada com base na análise quantitativa por SDS-PAGE da enzima expressa com diferentes proteínas de fusão, cepas de expressão, meios de cultura, tempo e temperatura de expressão. Para a avaliação da melhor proteína de fusão, foram utilizadas células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) transformadas com os plasmídeos pET-M11, pET-TRX e pET-NUS, contendo a CDS de Taq clonada. A Figura 13 mostra as bandas de superexpressão de Taq presente nas frações solúveis de todas as temperaturas de expressão e com todas as proteínas carreadoras. Com o auxílio do programa *Image Lab* (Bio-Rad), as bandas de expressão solúveis de Taq com suas parceiras de fusão foram detectadas. As bandas foram quantificadas em relação à primeira banda do marcador molecular utilizado (250 kDa) e seus valores estão descritos na Tabela 3. As quantificações totais foram normalizadas para retirar as porcentagens referentes a cada proteína carreadora, resultando nos valores relativos à expressão da construção de Taq DNA polimerase sem nenhuma *tag*.

Figura 13 – Teste de expressão de Taq DNA polimerase fusionada a 6xHis (M11), tiorredoxina (TRX) e NusA (NUS) em seu N-terminal. Nota-se a presença das bandas de superexpressão proteica nos tamanhos preditos de 95, 107 e 149 kDa, respectivamente. Os primeiros e segundos poços de cada condição demarcada no gel representam, respectivamente, as frações insolúveis (I) e solúveis (S).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Taxas de expressão de Taq DNA polimerase com as diferentes proteínas carreadoras em seu N-terminal, mostrando a maior expressão proteica com 6xHis-tag. Foram consideradas taxas de expressão baixas (+) as quantificações relativas a primeira banda do marcador de Taq até 3, taxas médias (++) as quantificações entre 3 e 5, e taxas altas (+++) as quantificações maiores que 5.

Vetor de expressão	Temperatura de expressão (°C)	Tag (kDa)	Taq + tag (kDa)	Quantificação relativa total	Quantificação relativa de Taq	Taxa de expressão
pET-M11	37	0,8	94,8	5,1	5,1	+++
pET-M11	18	0,8	94,8	6,0	6,0	+++
pET-TRX	37	12,9	106,9	3,9	3,5	++
pET-TRX	18	12,9	106,9	6,3	5,5	+++
pET-NUS	37	54,8	148,8	1,8	1,1	+
pET-NUS	18	54,8	148,8	5,4	3,4	++

Fonte: Elaborada pela autora.

As maiores taxas de expressão de Taq foram observadas na construção fusionada com 6xHis-tag (37 °C e 18 °C) e na construção fusionada a TRX (18 °C) (Tabela 3). Dessa forma, optou-se por utilizar a polimerase fusionada com 6xHis-tag e a temperatura de 18 °C nas próximas otimizações de condição de expressão. Tal resultado pode ser oportuno futuramente, pois muitas enzimas não alteram suas atividades na presença de uma cauda de histidina, mas podem vir a perdê-las caso a proteína carreadora possua um tamanho maior, como a tiorredoxina e a NusA, por exemplo. Assim, se for comprovado que a atividade enzimática de Taq não é afetada pela presença de 6xHis-tag, etapas de clivagem e retirada da cauda, durante a purificação proteica, não serão necessárias, o que não só diminui o processo de purificação, como também aumenta o rendimento final da purificação.

A segunda etapa de otimização da produção proteica investigada foi em relação à cepa de expressão. Os testes de expressão foram feitos com *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta 2 (DE3) e Rosetta pLysS (DE3), transformadas com pET-M11-Taq. A Tabela 4 (retângulo azul) mostra que as taxas de expressão obtidas em meio LB a 18 °C, 25 °C e 37 °C se mantêm altas para todas as cepas de expressão, exceto para BL21 (DE3) a 18 °C. Por ser resistente a mais de um antibiótico, conferindo menor risco de contaminação no crescimento de grandes culturas, optou-se por utilizar Rosetta 2 (DE3) na expressão da polimerase, que foi também avaliada em relação ao meio de cultura utilizado (LB, TB e ZYM-5052). As taxas de expressão obtidas com os meios LB e TB foram altas em todas as temperaturas testadas (Tabela 4, retângulo verde). O meio ZYM-5052 produziu uma baixa taxa de expressão a 37 °C, resultado esperado já que a ativação da expressão proteica nesse meio ocorre gradualmente, podendo não ter chegado em sua ativação total em apenas 4 h. Porém, em tempos de expressão prolongados (16 a 24 h e 25 °C), as taxas de expressão em ZYM-5052 foram altas (retângulo laranja). Por

esse meio ser mais econômico (não necessita da adição de IPTG) e produzir altas taxas de expressão, as futuras expressões de Taq foram realizadas em ZYM-5052.

Por fim, foram estudados diferentes tempos de expressão em ZYM-5052 a 25 °C que resultaram em altas taxas de expressão com 16 e 24 h. Como a DO_{600nm} entre as culturas, deixadas por 16 e 24 h, não se alterou, foi escolhido o tempo de 16 h de expressão no meio ZYM-5052 e utilizando Rosetta 2 (DE3) transformada com pET-M11-Taq para todas as expressões realizadas nesse trabalho.

Tabela 4 – Taxas de expressão de Taq variando cepas de expressão, meios de cultura e temperaturas de expressão. As cinco primeiras condições da tabela tiveram as expressões avaliadas a 37 (4 h), 25 (16 h) e 18 °C (16 h). Retângulos em azul, verde e laranja indicam, respectivamente, as variações de cepas, meios de cultura e tempo de expressão. Foram consideradas taxas de expressão baixas (+) as quantificações relativas a primeira banda do marcador de Taq até 3, taxas médias (++) as quantificações entre 3 e 5, e taxas altas (+++) as quantificações maiores que 5.

Cepa	Meio	37 °C	25 °C	18 °C
BL21 (DE3)	LB	+++	+++	++
Rosetta pLysS (DE3)	LB	+++	+++	+++
Rosetta 2 (DE3)	LB	+++	+++	+++
Rosetta 2 (DE3)	TB	+++	+++	+++
Rosetta 2 (DE3)	ZYM-5052	+	+++	+++
Rosetta 2 (DE3)	ZYM-5052, 4 h		+	
Rosetta 2 (DE3)	ZYM-5052, 16 h		+++	
Rosetta 2 (DE3)	ZYM-5052, 24 h		+++	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE

Células de *E. coli* Rosetta 2 contendo Taq DNA polimerase expressa foram separadas do meio de cultura por centrifugação, ressuspendidas em tampão de lise e lisadas por homogeneização na presença e ausência de Turbo Nuclease (Cellco Biotec) para avaliar a influência de uma DNase no processo de purificação. O uso de DNases durante a lise celular é conhecido por ajudar a diminuir a viscosidade da solução, decorrente da presença do DNA genômico, mas pode ser extremamente prejudicial na purificação de uma DNA polimerase, caso as etapas de purificação empregadas não sejam capazes de separá-las. Uma vez que Turbo Nuclease era fornecida pela Cellco Biotec, métodos clássicos de precipitação de ácidos nucleicos, como a adição de estreptomicina ou polietilenoimina (PEI) se tornariam mais caros e, por isso, não foram testados nesse trabalho.⁶¹⁻⁶²

Outra metodologia clássica empregada na purificação de DNA polimerases termoestáveis é o aquecimento do lisado até 90 °C durante 30 min para a precipitação de proteínas contaminantes.⁴⁸ Visando-se avaliar essas metodologias, foram feitas purificações distintas com o uso de Turbo nuclease e do tratamento térmico descrito.

As frações solúveis contendo Taq foram separadas por centrifugação e a enzima foi purificada por uma primeira etapa de cromatografia de afinidade (Figura 14A). A análise da fração eluída indica que essa etapa cromatográfica foi capaz de separar Taq da maioria das proteínas presentes no lisado. Contudo, nota-se a presença de um contaminante com massa molecular de, aproximadamente, 37 kDa, o qual não pôde ser separado mesmo com a variação do gradiente de eluição. Esse contaminante se mostrou presente independentemente de tratamentos térmicos e com DNases durante o processo de lise.

Figura 14 – Cromatogramas e géis das etapas de purificação de Taq DNA polimerase gerados a partir de um clarificado sem tratamento térmico e com adição de Turbo nuclease. As setas coloridas indicam as respectivas frações dos cromatogramas analisadas por SDS-PAGE, com o pico referente a Taq mostrado em verde. (A) Primeira etapa de cromatografia de afinidade referente à eluição de Taq juntamente com um contaminante de 37 kDa. (B) A segunda etapa de cromatografia de afinidade foi capaz de separar o contaminante de 37 kDa, além de outros contaminantes presentes na fração não ligada à coluna (entre 0 e 35 mL). (C) A purificação por cromatografia de troca iônica separou contaminantes que não puderam ser detectados por SDS-PAGE, indicados pelas setas vermelhas e amarelas. (D) Cromatografia de exclusão molecular de Taq DNA polimerase revela uma proteína altamente pura e sem agregados ou contaminantes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o objetivo de retirar qualquer contaminante proteico, assim como remover o material genético copurificado pela primeira cromatografia de afinidade, foi utilizada uma segunda etapa de cromatografia de afinidade. A Figura 14B mostra a separação da proteína contaminante de 37 kDa no início do gradiente de eluição (16% tampão B), seguida de um pico único de eluição de Taq (25% tampão B).

Uma característica importante a ser avaliada é a influência de 6xHis-tag na atividade de Taq. Para tal, após a separação na segunda cromatografia de afinidade, foi feita a clivagem da 6xHis-tag na presença de TEV protease em uma amostra que passou, previamente, pela incubação com Turbo Nuclease e não sofreu tratamento térmico. Após a clivagem, a cauda de histidina e TEV protease (que também possuía 6xHis-tag) foram separadas por uma terceira etapa de cromatografia de afinidade por níquel imobilizado, na qual a polimerase foi coletada na fração não ligada à coluna.

Diante da pureza enzimática verificada pelo SDS-PAGE (Figura 14B), outras etapas de purificação seriam desnecessárias. Por isso, as Taqs produzidas passaram por testes de atividade e detecção de contaminantes como nucleases e DNA bacteriano. Todas as amostras produzidas continham contaminação com nuclease, independente de terem sido clivadas ou tratadas termicamente/com DNase durante o processo de lise celular.

Na maior parte das purificações proteicas convencionais, pequenas quantidades de nucleases na amostra purificada (não visíveis por SDS-PAGE) são irrelevantes. No entanto, é essencial a remoção dessas nucleases durante a purificação de uma DNA polimerase já que essas podem degradar os DNAs molde e sintetizados pela polimerase. Em especial, contaminações por nucleases podem degradar completamente DNAs molde presentes em pequenas quantidades, impossibilitando a síntese de DNA e mimetizando uma condição de enzima inativa.

Por isso, com o intuito de separar a enzima Taq das nucleases contaminantes, foi adicionada uma etapa de cromatografia de troca iônica. A Figura 14C mostra a eluição de Taq (pico indicado pela seta verde), próxima da eluição de outros dois picos de proteínas contaminantes. Para garantir a pureza da amostra, foi selecionado apenas a fração central do pico de eluição da polimerase, descartando-se as frações das bordas, que poderiam conter os contaminantes.

Como última etapa do processo de purificação, foi feita uma cromatografia de exclusão molecular, a fim de remover qualquer outro contaminante ou agregado proteico. A Taq eluiu em um pico único simétrico (Figura 14D), sem nenhum outro pico aparente de agregado ou contaminação. Apesar de não haver retirada de contaminantes nessa etapa, a

cromatografia de exclusão molecular foi mantida para realizar a troca de tampão da enzima purificada. Caso haja a necessidade do aumento da escala de produção, essa etapa poderá ser substituída por outros métodos de troca de tampão, como a *desalting* ou diálise.

A análise relativa da quantidade de proteína no gel SDS-PAGE, feita pelo *Image Lab* (Bio-Rad), aferiu que a pureza da Taq purificada era maior que 95%, grau de pureza maior ou igual aos encontrados em DNA polimerases de empresas como Merck Millipore e Promega.⁶³⁻⁶⁴

A Tabela 5 resume os rendimentos obtidos na purificação de Taq a partir de 1 L de cultura celular contendo a proteína expressa. Após todas as etapas de purificação, obteve-se um alto rendimento de Taq (30 mg/L) com atividade específica comparável ao da maioria das enzimas comerciais.⁵³

Tabela 5 – Rendimentos das etapas de purificação de Taq e atividades específicas das amostras provenientes de cada etapa. Nota-se o aumento da atividade específica em quase todas as etapas de purificação, resultando em uma enzima tão pura quanto uma comercial.

Amostra	Rendimento (mg/L)	Atividade específica x 10 ³ (U/mg)
1ª Cromatografia de Afinidade	77	47 ± 3
2ª Cromatografia de Afinidade	47	56 ± 2
Cromatografia de Troca Iônica	33	59 ± 1
Exclusão Molecular	30	61 ± 2
Comercial (Jena Bioscience)		61 ± 2

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE POLIMERÁSICA

4.4.1 AJUSTE DA CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA POR SDS-PAGE

Visando comparar as enzimas provenientes dos diferentes métodos de purificação empregados com uma Taq comercial, foi necessário o ajuste preciso de todas as soluções enzimáticas para a mesma concentração de 5 U/μL (concentração usada comercialmente). Para a conversão aproximada de unidades para massa, 10 μL da enzima comercial foram analisados eletroforicamente por SDS-PAGE. Métodos de quantificação proteica baseados em absorbância ou fluorescência não foram utilizados por sofrerem interferência dos detergentes e glicerol presentes no tampão de estocagem das enzimas comerciais.⁶⁵⁻⁶⁶ Com o auxílio do programa *Image Lab* (Bio-Rad), as concentrações das Taq purificadas foram, primeiramente, corrigidas a partir das bandas do gel quantificadas em relação a Taq comercial

(Figura 15). Todas as amostras foram diluídas para a mesma concentração (massa/volume) em tampão de estocagem e seguiram para o cálculo de unidades, descrito no próximo item.

Figura 15 – Ajuste da concentração (massa/volume) entre uma Taq comercial (JBS) e as enzimas purificadas de acordo com as diferentes metodologias empregadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES ENZIMÁTICA

Os ensaios de atividade DNA polimerásica *in vitro* tradicionais baseiam-se na incorporação de nucleotídeos radiomarcados na fita crescente de DNA polimerizada.⁶⁷ Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para incorporar 10 nmol de deoxinucleotídeos em um período de 30 min a 72 °C.⁶⁸ Apesar dessa técnica ter sido empregada durante muitos anos, os riscos inerentes da manipulação de radioisótopos, associado à necessidade de medidas de atividade cada vez mais frequentes, demandavam alternativas mais seguras para um uso rotineiro. Assim, para a quantificação do DNA sintetizado, alguns métodos sem o uso de radioisótopos vêm sendo desenvolvidos, dentre eles, métodos baseados na fluorescência de moléculas que se ligam na dupla fita do DNA, como o *kit* baseado em flurorimetria, EvaEZ™ (Biotium), utilizado para determinação de unidades de uma amostra de DNA polimerase.

Baseado nesse *kit*, foi desenvolvido um método para o cálculo absoluto de unidades de uma DNA polimerase, descrito no item 3.5. Para esse cálculo, é preciso obter curvas de extensão do molde H (um *primer* de 80 nucleotídeos hibridizado a um *primer* de 22

nucleotídeos) para uma condição saturante, ou seja, que todo o DNA molde tenha sido estendido, e uma condição teste em que o início da produção de DNA seja linear com o tempo reacional (Figura 10). A Figura 16A mostra as condições escolhidas para o ensaio, sendo que a condição saturante (círculos vermelhos) é composta por uma diluição de 100 vezes da Taq comercial (*Jena Bioscience*) e as condições testes foram feitas com uma diluição de 2000 vezes. Analisando a curva de diluição de 100 vezes, é possível observar que a fluorescência se mantém constante a partir de 25 min, fazendo com que essa diluição seja ideal para ser usada como a condição saturante sugerida pelo kit EvaEZ.

Para o cálculo da variação da fluorescência normalizada, foram utilizados os pontos iniciais de cada curva até 7 min. A Figura 16B representa o ajuste de uma reta (amarelo) na curva de extensão obtida pela amostra proveniente da primeira cromatografia de afinidade (triângulos azuis). A extrapolação dessa reta para o período de 30 min retorna o valor de variação de fluorescência normalizada para essa amostra.

Figura 16 – (A) Curvas de fluorescência da extensão do molde H usando Taqs diluídas 100x (círculos vermelhos, condição saturante) e 2000x. (B) Detalhamento das fluorescências no início do ensaio, com destaque para a linearidade das curvas entre 2 e 7 min indicada pela reta pontilhada em amarelo (em relação a curva da amostra proveniente da primeira cromatografia de afinidade).

Fonte: Elaborada pela autora.

O cálculo da concentração das amostras provenientes de diferentes etapas de purificação foi feito de acordo com a Equação 2 e é mostrado na Tabela 6. Nota-se o aumento da concentração enzimática e atividade específica de Taq ao longo do processo de purificação. Isso indica que o processo de purificação foi efetivo, retirando impurezas que contribuíam na quantidade de massa proteica, mas não apresentavam atividade DNA

polimerásica. É possível observar ainda que, ao final da última etapa de purificação, a Taq produzida nesse trabalho estava tão pura e ativa quanto uma enzima comercial, comprovando a alta qualidade da enzima purificada.

Tabela 6 – Concentrações enzimáticas calculadas a partir de amostras a 0,1 mg/mL de diferentes etapas de purificação. A partir dos valores de concentração, foi possível calcular a atividade específica de cada amostra (unidades de polimerase/massa em mg, analisadas em um mesmo volume), mostrando que todas as etapas de purificação são efetivas já que aumentam a atividade específica de Taq.

Amostra	Concentração (U/ μ L)	Atividade específica x 10^3 (U/mg)
1ª Cromatografia de Afinidade	$4,7 \pm 0,3$	47 ± 3
2ª Cromatografia de Afinidade	$5,6 \pm 0,2$	56 ± 2
Cromatografia de Troca Iônica	$5,9 \pm 0,1$	59 ± 1
Exclusão Molecular	$6,1 \pm 0,2$	61 ± 2
Comercial (<i>Jena Bioscience</i>)	$6,1 \pm 0,2$	61 ± 2

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE

As Taq DNA polimerases comerciais são capazes de amplificar um fragmento de DNA em quantidades visíveis em um gel de agarose a partir de, pelo menos, 1 pg de DNA λ molde. Quanto menor a quantidade de DNA molde for necessário para uma DNA polimerase gerar amplificações, mais sensível será a enzima. Assim, um fragmento de 1000 pb foi amplificado a partir de diluições seriadas de DNA λ para a investigação da sensibilidade das enzimas provenientes das diferentes metodologias de purificação. A Figura 17A mostra que o fragmento de 1000 pb foi amplificado em todas as concentrações de DNA molde utilizados, com um rendimento de amplificação proporcional à quantidade de DNA molde utilizado. Esse padrão de amplificação se manteve idêntico na amostra de Taq controle (*Jena Bioscience*, JBS) e de todas as enzimas purificadas, mostrando que a enzima purificada é tão sensível quanto a enzima comercial, independente da metodologia de purificação utilizada. Além disso, é importante ressaltar que a enzima com a cauda 6xHis-tag apresentou a mesma sensibilidade da enzima sem a cauda.

Visando-se avaliar a eficiência das enzimas produzidas, foram feitas quantificações relativas das amplificações da Figura 17A. Os resultados estão mostrados na Figura 17B em que se pode notar a perda de eficiência da amostra que passou por tratamento térmico durante a lise das células, indicando que esse tratamento é prejudicial para reações com escassez de DNA molde. Todas as outras amostras apresentaram eficiência de amplificação maiores do

que a enzima comercial, com destaque para as amostras que continham Turbo Nuclease em seu processo de purificação. As amostras que apresentaram maiores eficiências de amplificação foram com a enzima sem cauda de histidina e a chamada “purificação final”, uma polimerase com cauda de histidina, que não passou por tratamento térmico e que Turbo nuclease foi utilizada em seu processo de purificação. Visto que o processo de clivagem da cauda de hexa histidina requer dois processos cromatográficos adicionais e, conseqüentemente, diminuem o rendimento da purificação, esse resultado se mostra extremamente importante se considerarmos grandes lotes de purificação visando a comercialização dessa enzima. Dessa forma, optou-se por manter a cauda de histidina na DNA polimerase e utilizar o processo de purificação final descrito acima, dando origem a enzima nomeada “Taq Cellco”.

Figura 17 – (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% da comparação de sensibilidade de Taq DNA polimerase comercial (JBS) e enzimas purificadas frente a diferentes concentrações de DNA molde (100, 10 e 1 pg DNA λ , da esquerda para direita). Todas as proteínas conseguiram amplificar o fragmento de 1000 pb a partir de, no mínimo, 1 pg DNA molde. (B) Quantificação das amplificações em relação às amplificações geradas pela enzima comercial. A média das quantificações relativas é mostrada nos gráficos cinzas, indicando as melhores eficiências nas amostras da purificação final e sem cauda de histidina.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.4 TESTE DO TAMANHO DE FRAGMENTO DE AMPLIFICADO

A amplificação de DNA longos é dependente do tipo de DNA polimerase utilizada. No caso da Taq, é possível amplificar fragmentos de DNA de até 5 kpb, a partir do qual a enzima perde sua eficiência proporcionalmente ao aumento do tamanho do fragmento de DNA amplificado devido aos erros introduzidos no processo de polimerização.

Para validar a eficiência da enzima purificada, foram amplificados fragmentos de 1 a 5 kpb a partir de 10 ng de DNA λ . As PCRs foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, (Figura 18A). Assim como a enzima controle (JBS), Taq Cellco foi capaz de amplificar fragmentos até 5 kpb. A quantificação das amplificações em relação à enzima comercial indica eficiência muito semelhante entre as duas enzimas na amplificação dos fragmentos de 2 e 3 kpb (Figura 18B). Já para os fragmentos de 1, 4 e 5 kpb, a enzima Taq Cellco se mostrou mais eficiente que a comercial.

Figura 18 – (A) Comparação da amplificação de fragmentos de 1, 2, 3, 4 e 5 kbp usando uma Taq comercial (*Jena Bioscience*) e a Taq Cellco. Nota-se que as duas enzimas apresentaram o mesmo padrão e eficiência de amplificação, mostrando que a enzima purificada consegue amplificar fragmentos de DNA longos tão bem quanto uma enzima comercial. (B) Quantificação das bandas de amplificação da Taq Cellco (azul) em relação à Taq comercial (cinza), mostrando que a enzima purificada teve uma eficiência semelhante ou maior na amplificação de todos os fragmentos testados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez que a atividade da Taq é estritamente dependente de seu grau de pureza e contaminação com DNA e nucleases, os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade e eficiência não indicam apenas que a polimerase purificada possui uma mesma atividade que a comercial, mas indicam também uma similaridade na pureza das amostras.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES

4.5.1 DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR NUCLEASES

Os kits de detecção de nucleases atuais são capazes de detectar contaminações de até 2 pg de DNase (*DNase detection kit*, Jena Bioscience; *DNaseI ELISA kit*, LS Bio; *DNase Alert*, Thermo Scientific). Para observar uma contaminação de DNase por eletroforese em gel de agarose com a mesma sensibilidade, 200 ng vetor pUC19 foi incubado com 2, 20 e 200 pg de Turbo nuclease (Cellco Biotec) em intervalos entre 30 min e 16 h. As amostras foram analisadas eletroforéticamente em gel de agarose 1% (Figura 19A). Todas as amostras contendo 20 e 200 pg de Turbo nuclease foram completamente degradadas, independentemente do tempo de incubação. Já as amostras contendo 2 pg da nuclease tiveram sua degradação total a partir de 3 h de incubação. Dessa forma, esse período de incubação foi escolhido para avaliar a presença de nuclease nas etapas de purificação proteica.

Figura 19 - Degradação do plasmídeo pUC19 (controle) em ensaio de nuclease contendo 2 pg de Turbo nuclease (A). As amostras foram incubadas por 30 min, 1, 3, 5 e 16 horas (da esquerda para a direita). (B) Teste de nuclease nas diferentes etapas de purificação de Taq.

Fonte: Elaborada pela autora.

O teste de nuclease foi repetido com 5 U das amostras de Taq eluídas de cada etapa de purificação (Figura 19B). A análise do gel indicou a presença de nucleases nas amostras eluídas das etapas cromatográficas de purificação por afinidade. Por isso, optou-se por empregar as cromatografias de troca iônica e exclusão molecular, mesmo não havendo uma melhora aparente em relação à pureza da enzima avaliada por eletroforese em gel. Esse padrão de contaminação por nucleases nas duas primeiras etapas de purificação se repetiu em todas as purificações realizadas, sendo indiferente à adição de Turbo nuclease, a presença da cauda de histidina ou tratamento térmico da amostra. Dessa forma, optou-se por utilizar a enzima Turbo nuclease durante o processo de clarificação, uma vez que essa enzima diminui, drasticamente, a viscosidade do lisado e consegue ser separada nas etapas de purificação, não interferindo no resultado final de amostras de Taq purificada.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR DNA BACTERIANO

A quantificação de DNA bacteriano presente nas amostras de cada etapa de purificação de Taq foi feita pela amplificação das regiões 16S bacterianas em uma PCR de tempo real. Para isso, foram feitas curvas de calibração contendo diluições de DNA genômico bacteriano (100, 10 e 1 pg de DNA em cada reação) que deram origem às curvas de calibração mostradas na Figura 20A. Nos ensaios de contaminação, as amostras de Taq purificadas foram usadas como molde para amplificação da mesma região 16S do possível contaminante de DNA genômico bacteriano, proveniente das preparações. Baseado nos valores de *cycle threshold* (C_t), ciclo no qual a fluorescência gerada na PCR ultrapassa a linha de base da reação sem DNA molde, foi traçada a curva padrão para quantificação das amostras purificadas (Figura 20B) que correlaciona os C_t s com o número de cópias de DNA molde de cada reação. A partir dos pontos de diluições de DNA molde, foi ajustada a curva padrão $C_t = -3,427 \log(\text{número de cópias}) + 36,770$ que apresentou grande concordância com os valores experimentais obtidos (coeficiente de determinação, $R^2 = 0,999$). A eficiência de amplificação calculada foi de 95,8%, indicando que a região 16S foi duplicada adequadamente nos ciclos iniciais da PCR e que os C_t s utilizados para a curva padrão estão em uma região confiável para a análise. A curva padrão e os valores de C_t das amostras de Taq também possibilitaram o cálculo dos números de cópias e as massas dos DNAs contaminantes de cada amostra (Tabela 7). Nota-se que a amostra proveniente da primeira

cromatografia de afinidade foi a que apresentou a maior contaminação com DNA bacteriano (68 fg), sendo que as demais amostras apresentaram valores muito próximos entre si (50 fg) e quando comparadas a uma DNA polimerase comercial ou uma reação sem nenhuma adição de DNA molde. Dessa forma, conclui-se que a purificação da segunda cromatografia de afinidade foi essencial para a remoção da contaminação de DNA bacteriano, já que todas as amostras a partir dessa purificação apresentaram valores mínimos de contaminação.

Figura 20 – (A) Amplificações das regiões 16S do DNA genômico de *E. coli*. Curvas tracejadas representam as curvas de calibração do ensaio e as curvas contínuas representam a contaminação com DNA genômico das amostras purificadas. (B) Curva padrão de quantificação das amostras testadas, mostrando que a amostra proveniente da primeira cromatografia é a mais contaminada, indicando a importância da segunda cromatografia para a purificação do DNA bacteriano contaminante.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 – DNA genômico bacteriano presente nas amostras provenientes das etapas de purificação de Taq quantificado por PCR em tempo real. A diminuição mais significativa da contaminação de DNA ocorre após a segunda cromatografia de afinidade, mostrando que essa etapa é essencial para a purificação de ácidos nucleicos. Após todos os processos de purificação, foi obtida uma amostra com uma contaminação quase inexistente, já que essa amostra apresentou quantidades de DNA parecida a de uma reação sem qualquer adição de DNA genômico.

Amostra	Controle (sem DNA)	Comercial	1ª Afinidade	2ª Afinidade	Troca Iônica	Exclusão Molecular
Quantidade DNA (fg)	45 ± 3	46 ± 4	68 ± 1	53 ± 2	53 ± 4	50 ± 3

Fonte: Elaborada pela autora

4.6 PRODUÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE *HOT START*

4.6.1 TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* POR LIGAÇÃO A BIOMOLÉCULAS

A produção de Taq DNA polimerase *Hot Start* por ligação a biomoléculas foi feita pela diluição de diferentes proporções molares de anticorpos ou aptâmeros de DNA na enzima purificada, a fim de verificar a mínima concentração de anticorpos e aptâmeros capazes de inativar a Taq. A inibição da atividade residual de Taq a baixas temperaturas foi medida pela fluorescência do EvaGreen® intercalado ao fragmento de DNA sintetizado pela enzima a 25 °C (Figura 21, barras azuis). Nesses ensaios, a quantidade de biomoléculas foi aumentada de acordo com as letras indicadas de A a D, sendo as inibições por anticorpos mostradas na Figura 21A e às por aptâmeros na Figura 21B. As diluições C e D apresentaram valores de fluorescência mínimos que são comparáveis aos valores de fluorescência das enzimas HS comerciais (*Platinum Taq* da *Thermo Scientific* e *Hot Start Taq* da JBS). Uma vez que as diluições nomeadas por C utilizavam menos biomoléculas e ainda assim apresentaram baixos valores de fluorescência, essas diluições foram escolhidas para a produção das enzimas HS por ligação a anticorpos e aptâmeros de DNA.

Os mesmos ensaios de fluorescência foram realizados a 72 °C após a ativação das enzimas HS com a incubação a 95 °C por 10 min (Figura 21, barras laranja). Todas as enzimas apresentaram valores de fluorescência próximos a 6000, mesma fluorescência da Taq nativa. Dessa forma, conclui-se que, apesar das Taqs HS produzidas serem inibidas pelas biomoléculas a 25 °C, o ciclo HS de ativação é eficiente em recuperar a atividade dessas enzimas.

Figura 21 – Avaliação da atividade de Taq e suas versões *Hot Start* (HS) produzidas a partir da medida da fluorescência do EvaGreen® após a síntese de uma dupla fita de DNA. Em azul são mostradas as sínteses a 25 °C e, em laranja, as sínteses a 72 °C após a ativação das enzimas HS (10 min a 95 °C). As letras de A a D indicam diferentes proporções de biomoléculas para Taq. Diluições de anticorpo (A) e aptâmero (B) de DNA que inibem a atividade de Taq a 25 °C nas concentrações C e D.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.2 TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* POR MUTAÇÃO

A CDS do mutante de Taq sensível a temperatura descrito por Kermekchiev e colaboradores (E626K + I707L, denominada mutante CS) foi produzida através das mutações sítio dirigidas e clonada no vetor pET-M11. A purificação proteica foi feita segundo o mesmo protocolo da enzima nativa e os ensaios de atividade da mutante CS estão mostrados na Figura 22. Nessa figura, observa-se que Taq nativa e o mutante CS apresentaram, aproximadamente, a mesma atividade de síntese de DNA dupla fita a 25 e 72 °C (gráficos em

azul e laranja, respectivamente), indicando que o mutante não possui atividade reduzida em baixas temperaturas.

Figura 22 - Ensaio de atividade a 25 (azul) e 72 °C (laranja, após a ativação da enzima) do mutante de Taq sensível a temperatura (mutante CS). As fluorescências obtidas para o mutante CS são muito similares às da enzima nativa, mostrando que o mutante não possui redução de atividade em baixas temperaturas e, consequentemente, não é *Hot Start*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando a sequência do DNA molde utilizado nesse ensaio de atividade (Figura 11, *primer* 80-mer), é possível notar que o DNA molde possui duas adeninas subsequentes. Como descrito no item 1.4.4, o sítio ativo do mutante CS possui maior mobilidade em relação ao da Taq nativa. Essa mobilidade permite o empilhamento das duas adeninas no sítio ativo do mutante CS, inibindo a enzima.^{45, 69} Porém, foi observada atividade de polimerização no mutante CS. Segundo estudos de dinâmica molecular feitos por Modeste e colaboradores, a mobilidade do sítio ativo permite o mutante CS transitar entre o seu estado inibido (na maior parte do tempo, onde as adeninas encontram-se empilhadas) e o seu estado ativo, em que a síntese de DNA ocorre normalmente.⁴⁵ O resultado desse equilíbrio dinâmico é um mutante que possui baixa atividade em temperatura ambiente, já que a sua velocidade média de síntese é menor em relação à Taq nativa.^{14, 45}

No ensaio de atividade a 25 °C, o DNA molde H foi incubado com o mutante CS por 1 h antes da inativação reacional e leitura da fluorescência. Dessa forma, é provável que o tempo de incubação utilizado seja grande o suficiente para o mutante CS sintetizar grande parte do DNA molde H, mesmo com uma velocidade menor do que a Taq. Uma vez que o

objetivo desse trabalho é encontrar enzimas inativas a temperatura ambiente, e não com menor atividade, optou-se por não prosseguir os estudos com o mutante CS.

4.6.3 TAMPÃO *HOT START* POR PRECIPITAÇÃO DE ÍONS DE MAGNÉSIO

Utilizando a enzima nativa e o tampão *Hot Start* descrito por Barnes e Rowlyk,³¹ foram feitos ensaios de atividade mostrados na Figura 23. Os ensaios em baixa temperatura (barras em azul) mostram que o tampão com íons de magnésio precipitados (HS precipitação) resultou em menor síntese de DNA, uma vez que a fluorescência dessa reação foi um pouco menor que a fluorescência da reação com o tampão convencional e que o magnésio é um cofator essencial para a atividade da Taq. Contudo, quando comparada a uma enzima *Hot Start*, a síntese de DNA no tampão com íons precipitado foi muito maior, sugerindo que não ocorre a precipitação total de magnésio desse tampão. Assim, conclui-se que esse tampão não foi eficiente o suficiente para ser empregado em PCRs *Hot Start*.

Figura 23 – Comparação das atividades *Hot Start* entre as enzimas controle e Taq nativa em um tampão com íons de magnésio precipitados. Em azul, é mostrada a fluorescência das sínteses a 25 °C e, em laranja, as fluorescências das sínteses a 72 °C após a ativação das enzimas (10 min a 95 °C). Apesar da atividade de Taq no tampão precipitante ser ligeiramente menor comparada à enzima nativa, a fluorescência obtida com o tampão precipitante foi muito maior do que a da Taq HS por ligação a anticorpo (*Platinum Taq*, Thermo Scientific), mostrando que esse tampão não é muito eficiente para o uso de PCRs *Hot Start*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.4 TAQ DNA POLIMERASE *HOT START* POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA

A Taq *Hot Start* por modificação química (Taq HS química) foi produzida pela adição de derivados de anidridos maleicos a resíduos de lisina de Taq (Figura 5). Com o objetivo de otimizar a produção da enzima HS química, foram utilizados diferentes derivados de anidrido maleico, proporções molares entre Taq e derivados de anidrido maleico, meio reacional, tempo e temperatura de reação. A Figura 24 mostra o teste de atividade da melhor enzima HS química obtida após a otimização de todos os parâmetros reacionais. As barras em azul indicam que a enzima obtida possui baixa atividade a 25 °C, o que a qualifica como uma enzima *Hot Start*, e recupera a sua atividade a 95 °C após a sua ativação (barras em laranja). Além disso, nota-se que Taq HS química produzida possui atividade a 25 °C tão baixa quanto a enzima comercial (*AmpliTaq Gold, Thermo Scientific*), indicando que a polimerase produzida é tão *Hot Start* quanto a sua versão comercial.

Figura 24 – Ensaio de atividade a 25 (azul) e a 72 °C (laranja, após a ativação da enzima) da melhor Taq HS química produzida. A enzima HS produzida apresentou atividade a 25 °C tão baixa quanto à enzima comercial e foi capaz de recuperar a sua atividade após o ciclo *Hot Start*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao repetir o mesmo ensaio de atividade mostrado na Figura 24, 28 dias após a reação com o derivado de anidrido maleico, a Taq HS química obtida apresentou cerca de 80% da atividade da enzima nativa a 25 °C, comparada com a inatividade obtida no primeiro dia (Figura 25A). Utilizando um novo lote de purificação de Taq, mais uma reação com o

derivado de anidrido maleico foi feita e a atividade da enzima HS química foi avaliada semanalmente. Os resultados da atividade de Taq HS química durante os 28 dias estão mostrados na Figura 25A, que indica o aumento da atividade polimerase a 25 °C em função do tempo, ou seja, a enzima modificada sofria hidrólise liberando o derivado de anidrido maleico gradualmente em solução ao longo do tempo. Uma vez que as reações de ligação ou hidrólise do derivado de anidrido maleico são regidas pelo pH, decidiu-se aumentar o pH do tampão de estocagem da Taq HS química de 8 para 9, o que manteve a característica *Hot Start* da enzima (baixa atividade a 25 °C) por , no mínimo, 15 meses (última medida em dezembro de 2019, Figura 25B).

Figura 25 - (A) Ensaio de atividade a 25 °C da Taq HS química produzida e estocada em pH 8 ao longo de 28 dias. A enzima produzida recupera aproximadamente 20% de sua atividade nos primeiros 7 dias, chegando a estar 80% ativa no final dos 28 dias. (B) Avaliação da atividade a 25 °C da Taq HS química estocada em pH 9 ao longo de 15 meses, mostrando que o aumento do pH no tampão de estocagem é essencial para a estabilização dessa enzima.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra otimização importante em relação a uma DNA polimerase HS química é o tampão reacional. Sabe-se que o pH do tampão reacional de Taq HS química precisa ser neutro ou levemente ácido para a ativação dessa enzima (hidrólise do derivado de anidrido maleico). Porém, a grande maioria das DNAs polimerases, incluindo a Taq, são ativas em pHs alcalinos, possuindo pouca ou nenhuma atividade em tampões ácidos. Para contornar essa limitação, foi utilizado o agente tamponante Tris nas reações enzimáticas, já que esse agente tamponante possui a característica de diminuir o seu pH conforme a temperatura da solução é aumentada, como ocorre no ciclo *Hot Start*.⁴⁴ Assim, foram feitos ensaios de sensibilidade utilizando o agente tamponante Tris e variando-se o pH reacional de 9 a 7. Os melhores resultados obtidos (pHs 8,5 a 8,0) estão mostrados na Figura 26, que indica a diminuição da atividade da enzima nativa quando o pH é diminuído. Já a Taq HS química não possui atividade em pH 8,5, mostrou pouca atividade em pH 8,3 e apresentou a melhor atividade em pH 8,0. Em pHs abaixo de 8,0, nenhuma polimerase exibiu atividade. Esses dados corroboram com a ativação teórica da enzima, uma vez que um tampão tris com pH 8 a 25 °C pode atingir o pH 6,5 a 95 °C, temperatura do ciclo *Hot Start*.⁴⁴ Dessa forma, o pH 8 foi escolhido para ser utilizado no tampão reacional de Taq HS química.

Figura 26 – Avaliação dos pHs dos tampões de reação de Taq HS química na amplificação de um fragmento de 1000 pb, usando 100, 10 e 1 pg de DNA λ molde (esquerda para a direita). A Taq nativa perde a sua atividade com a diminuição do pH, enquanto que a Taq HS química aumenta a sua atividade devido ao desligamento dos derivados de anidrido maleico. Em pHs abaixo de 8,0, não foi vista atividade para nenhuma enzima.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foi avaliado o tempo de ativação de Taq HS química. Convencionalmente, enzimas HS químicas são ativadas a 95 °C por 10 min. Para estudar a importância desse tempo, foram feitos ensaios de sensibilidade com Taq HS química ativadas a 95 °C por 3, 5, 10, 15, 20 e 30 min (Figura 27). Todas as enzimas foram capazes de amplificar o fragmento

de 1000 pb a partir de, no mínimo, 1 pg de DNA molde. A quantificação das bandas do gel em relação às bandas amplificadas pela enzima ativada por 3 min revela que todas as amplificações foram mais eficientes com maiores tempos de ativação, exceto para a amplificação a partir de 100 pg de DNA molde no tempo de 30 min, como pode ser observado na Figura 27B. As maiores amplificações ocorreram entre os tempos de ativação de 5 a 15 min, sendo que a amplificação a partir de 1 pg de DNA molde foi mais eficiente após 10 min de ativação enzimática. Dessa forma, o tempo de ativação de 10 min foi escolhido como sendo o mais indicado para Taq HS química e será utilizado em todos os ensaios futuros.

Figura 27 – (A) Teste de sensibilidade das Taq HS químicas, mostrando as amplificações de um fragmento de 1000 pb a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde (da esquerda para a direita). As enzimas foram ativadas a 95 °C por um período de 3 a 30 min, e a Taq HS química recuperou grande parte da sua atividade mesmo após 3 min. (B) Quantificação das bandas de amplificação das reações com Taq HS química. As quantificações das reações contendo diferentes concentrações de DNA molde foram calculadas em relação às suas respectivas diluições na reação com a enzima ativada por 3 min. Pode-se observar um máximo de amplificação entre 5 e 15 min e, a partir desse tempo, as amplificações diminuem possivelmente pelo início da desnaturação da enzima.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante notar que, a partir de 10 min de ativação, as quantificações relativas começam a decrescer, o que parece não fazer sentido já que, quanto maior o tempo de ativação, mais ativa e maior a quantificação relativa deveria ser. Assim, seria esperado um gráfico com aparência sigmoideal, em que a quantificação relativa deveria aumentar nas temperaturas de ativação ideais e se manter elevada para maiores tempos. Porém, a diminuição das quantificações relativas com o aumento do tempo de ativação pode ser um indicativo de que a enzima esteja começando a desnaturar devido à longa exposição a altas temperaturas. Estudos anteriores mostraram que o tempo de meia vida da Taq nativa a 95 °C é de 40 min, o que corrobora com a hipótese de desnaturação e os resultados observados na Figura 27.²⁰ Uma vez que Taq desnatura lentamente com longas incubações a altas temperaturas, é importante ressaltar que a enzima HS química produzida pode ser ativada por menos tempo, especialmente quando o tamanho do fragmento de DNA amplificado é grande. Isso porque, para a síntese de fragmentos grandes, é necessária uma longa exposição da enzima a 72 °C (fase de extensão do DNA) que causa a ativação total da enzima ao longo dos primeiros ciclos. Dessa forma, a Taq HS química continuaria sendo ativada e a exposição da enzima a 95 °C seria reduzida, aumentando o tempo de meia vida da mesma durante a reação.

4.7 COMPARAÇÃO DAS TAQ DNA POLIMERASES *HOT START* PRODUZIDAS

A Seção 4.6 (Produção de Taq DNA polimerase *Hot Start*) apresentou e discutiu a produção e otimização das diferentes Taqs HS produzidas nesse trabalho e fez comparações com as suas respectivas versões comerciais. Os próximos itens são dedicados ao estudo das diferentes enzimas HS produzidas frente a diversos testes que visaram determinar as características de cada Taq HS, como ensaios de atividade a baixas temperaturas, amplificação de fragmentos com alta porcentagem de GC e PCRs multiplex. Nesses testes, o desempenho das polimerases HS nos permitiu mapear as características de cada Taq HS, indicando a melhor tecnologia *Hot Start* para cada aplicação específica.

4.7.1 ATIVIDADE A BAIXAS TEMPERATURAS

Com o objetivo de comparar as atividades das Taqs HS produzidas em baixas temperaturas, ou seja, comparar o grau de *Hot Start* de cada enzima, as atividades enzimáticas

foram mensuradas com base na fluorescência do EvaGreen® intercalado ao fragmento de DNA sintetizado pelas enzimas HS a 25 °C (Figura 28, barras em azul). Como visto anteriormente, as enzimas HS por mutação ou precipitação de íons de magnésio apresentaram fluorescência próxima à da Taq nativa, indicando que a atividade enzimática em ambas as condições de ensaio (25 °C e 95 °C) foram aproximadamente iguais, ou seja, as enzimas mudadas ou ativadas por precipitação por íons não possuíam característica *Hot Start*. Por outro lado, as Taqs HS produzidas por meio da ligação a aptâmeros, a anticorpos ou a grupamentos químicos apresentaram baixa atividade enzimática a 25°C e foram capazes de recuperar suas atividades após a ativação a 95 °C, mostrando-se aptas a sintetizar DNAs como a enzima nativa.

Visando-se avaliar qual estratégia foi mais eficaz em aliar atividade enzimática com a característica *Hot Start*, comparou-se as atividades enzimáticas das três Taqs HS. A Figura 28 revela um perfil de síntese desigual entre essas polimerases: as Taqs HS anticorpo e química apresentaram um sinal tão baixo quanto o controle (sem DNA polimerase, indicando que não houve síntese de DNA) a 25 °C, enquanto que a enzima HS aptâmero apresentou cerca de 8% de síntese em relação às enzimas nativas nesta mesma temperatura. É possível notar que esse perfil é característico tanto na enzima produzida neste trabalho, quanto nas suas respectivas versões comerciais. Sendo assim, concluiu-se que as Taqs HS por anticorpo e química apresentam menor atividade polimerase a 25 °C (mais *Hot Start* – comparável ao controle) que Taq HS por aptâmero (menos *Hot Start*).

Figura 28 – Ensaio de atividade a baixas temperaturas (azul) e a 72 °C após a ativação enzimática (laranja) de todas as Taqs *Hot Start* (HS) produzidas e suas versões comerciais. Para analisar pequenas diferenças entre as enzimas, o ganho do termociclador de tempo real foi aumentado em 2x. As enzimas ligadas a aptâmero, anticorpo e a modificada quimicamente tiveram as suas atividades reduzidas a 25 °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.2 SENSIBILIDADE E EFICIÊNCIA DAS TAQS *HOT START*

A fim de comparar a atividade das Taqs HS produzidas a partir de quantidades mínimas de DNA molde, foram realizados ensaios de sensibilidade que tiveram como desafio amplificar um fragmento de 1 kpb a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA λ molde. A Figura 29A representa o gel de agarose das amostras amplificadas no qual nota-se que todas as enzimas foram capazes de amplificar o fragmento de DNA mesmo na condição com menor quantidade de DNA molde. No entanto, ocorreu a variação da eficiência com que cada polimerase amplificou o fragmento de 1000 pb. Para comparar a eficiência de cada Taq HS, foi feita a quantificação das bandas geradas por cada enzima em relação às bandas geradas por Taq comercial (Figura 29B).

Figura 29 – Ensaio de sensibilidade das enzimas HS produzidas e suas versões comerciais. (A) Gel de agarose mostrando as amplificações de um fragmento de DNA de 1000 pb a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde (da esquerda para a direita). (B) Quantificação das bandas de amplificação em relação às obtidas utilizando a Taq comercial (JBS). As bandas amplificadas a partir de 100, 10 e 1 pg de DNA molde foram quantificadas em relação à banda gerada a partir de 100, 10 e 1 pg de Taq comercial (gráficos amarelos, verdes e vermelhos), respectivamente. Os valores de quantificação relativa média, mostrados em cinza, são a média desses três valores para cada enzima testada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Primeiramente, observa-se que a Taq Cellco chega a ser 50% mais eficiente na amplificação do fragmento de 1000 pb, indicando que os processos de purificação empregados foram mais efetivos quando comparados aos de Taq comercial (JBS), o que resultou no aumento da atividade da enzima. As enzimas HS apresentaram sempre menor eficiência na amplificação a partir de 1 pg de DNA molde, quando comparada às suas amplificações a partir de 100 e 10 pg, diferentemente da enzima nativa. As HS ligadas a biomoléculas tiveram um comportamento similar entre si e quando comparadas com as enzimas comerciais (*Platinum Taq* da *Thermo Scientific* e *Hot Start Taq* da JBS), uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as medidas realizadas. Já a Taq HS química se mostrou 40% menos eficiente em relação à enzima nativa, mas ainda assim foi sensível em amplificar o fragmento de 1 kpb a partir de 1 pg de DNA molde. Considerando que as polimerases HS foram produzidas a partir da Taq e biomoléculas ou reagentes químicos com alto grau de pureza, a variação de eficiência encontrada entre as Taq HS ligadas à biomoléculas e a modificada quimicamente não são geradas pela pureza das amostras, mas podem ser geradas por propriedades intrínsecas que cada enzima adquiriu ao tornar-se *Hot Start* ou por pequenas diferenças em seus tampões reacionais. Além disso, as eficiências das PCRs feitas com as enzimas comerciais e as suas versões HS produzidas são muito similares, indicando que essa variação de eficiência independe do processo de produção da enzima HS, mas sim do tipo de tecnologia empregada na produção de cada Taq HS (anticorpo, aptâmero ou moléculas químicas).

Para averiguar se as eficiências obtidas no ensaio de sensibilidade não foram específicas para a PCR de 1000 pb, esse mesmo método de análise de eficiência também será usado na próxima seção.

4.7.3 EFICIÊNCIA E AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA LONGOS

As amplificações de fragmentos de DNA de vários tamanhos foram feitas utilizando as polimerases produzidas com o objetivo de averiguar suas capacidades de amplificação de DNAs longos (até 5 kpb, Figura 30A). Todas as Taqs testadas foram capazes de amplificar DNAs com até 5 kpb mas, novamente, verificou-se uma grande diferença na eficiência de amplificação produzida com cada tipo de Taq HS. A Figura 30B mostra as quantificações de cada banda de amplificação do gel em relação às respectivas bandas amplificadas por Taq nativa comercial (JBS). Na média (gráficos cinza), observa-se a similaridade na eficiência de

amplificação entre as Taqs nativas e as Taq HS ligadas à biomoléculas. Porém, nota-se que as HS ligadas à anticorpo, assim como a HS aptâmero produzida, foram muito eficientes na amplificação do maior fragmento sintetizado (5 kpb). A Taq HS modificada quimicamente perdeu 65% de sua eficiência quando comparada à Taq Cellco, corroborando com os dados obtidos ensaio de sensibilidade do item anterior. Mais uma vez, enzimas HS comerciais e suas respectivas versões produzidas mostraram concordância nas eficiências de amplificação, indicando que a variação na eficiência de amplificação está relacionada com a tecnologia empregada em cada tipo de Taq HS.

Figura 30 – (A) Gel de agarose com amplificações de 1, 2, 3, 4 e 5 kpb (da esquerda para a direita) das diferentes enzimas produzidas. (B) Gráfico da quantificação das bandas do gel em relação às bandas produzidas pela Taq comercial, bem como a média de todas as quantificações (cinza). Observa-se que, na média, as enzimas nativas, HS por anticorpo e HS por aptâmero possuem a mesma eficiência de amplificação. Já as Taqs HS químicas possuem eficiência de amplificação bem menor do que todas as outras enzimas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Até aqui foram analisados apenas PCRs rotineiras e sem maiores complexidades. Nas próximas seções, serão avaliadas as eficiências das Taqs HS em amplificações a partir de DNA genômico humano de fragmentos de DNA que não são comumente amplificados por Taq nativa, mas sim por Taqs HS.

4.7.4 SÍNTESES COMPLEXAS DE FRAGMENTOS DE DNA

Alguns fragmentos de DNA são conhecidos por serem amplificados apenas por Taqs HS, sendo aqui denominados de “sínteses complexas”. Apesar não existir uma explicação conclusiva para esse fenômeno, acredita-se que ele seja causado pela hibridização incorreta dos *primers* (seja em regiões inespecíficas do DNA molde ou na formação de dímeros de *primers*), seguida da extensão desses *primers* pela Taq nativa.^{10, 70} Dessa forma, novos *primers* estendidos não são capazes de se hibridizar na região correta do DNA molde, resultando na amplificação de regiões incorretas ou formação de dímeros de *primers*. Um exemplo de síntese complexa é a amplificação do gene humano do receptor de insulina que, usualmente, é sintetizado em quantidades mínimas por Taq nativa, mas é eficientemente amplificado por enzimas HS.

Com o objetivo de comparar as Taqs HS em capacidade e eficiência de amplificação do gene do receptor de insulina, foram feitas PCRs desse gene com as Taqs HS produzidas. O gel da Figura 31A mostra que as Taqs nativas amplificaram quantidades tão pequenas de DNA que as bandas de amplificação do gel são quase imperceptíveis. Por outro lado, as amplificações geradas pelas enzimas HS apresentaram bandas bem visíveis no gel, o que também pode ser observado pela quantificação relativa em relação a Taq nativa comercial (JBS) exibida nos gráficos da Figura 31B. As quantificações relativas das Taq HS anticorpo e, consequentemente, suas eficiências em amplificação, foram, em média, 28 vezes maiores que as de Taq nativa. Já as eficiências das enzimas por aptâmero foram, aproximadamente, 25 vezes maiores, enquanto que as HS químicas foram cerca de nove vezes mais eficientes.

Esses resultados apontam, novamente, uma concordância significativa no comportamento das enzimas HS por ligação a biomoléculas, sendo elas as mais eficientes em todos os ensaios realizados até o momento. Além disso, em amplificações complexas, a eficiência da Taq HS química passou a ser nove vezes maior do que a da enzima nativa, contrastando com sua queda de eficiência (50-65%) em PCRs comuns. Esse aumento de eficiência da enzima HS química revela a importância da tecnologia *Hot Start* em

amplificações complexas que, muitas vezes, pode definir a amplificação ou não de um DNA. Assim, uma polimerase com baixa eficiência em PCRs comuns passa a ser nove vezes mais eficiente em uma PCR mais complexa unicamente pelo fato de ser *Hot Start*.

Figura 31 – (A) Gel de agarose das PCRs do gene do receptor de insulina humano realizadas com diferentes DNA polimerases. O primeiro e segundo poço de cada enzima indicam as reações feitas com enzimas comerciais e produzidas nesse trabalho, respectivamente. (B) Quantificações relativas à banda de amplificação de Taq comercial, mostrando que as enzimas HS por biomoléculas são, aproximadamente, 28 vezes mais eficientes na amplificação desse gene, enquanto que Taq HS química é cerca de nove vezes mais eficiente.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.5 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA COM ALTA PORCENTAGEM DE GC

Uma característica importante a ser comparada é a capacidade de amplificação de fragmentos de DNA que possuem alta porcentagem de guanina e citosina (% GC) em sua composição, já que as PCRs desses fragmentos demandam altas temperaturas de hibridização entre *primers* e DNA molde e favorecem a formação de estruturas secundárias do DNA molde e dos *primers*. Até agora, os estudos sobre amplificações de fragmentos com alta % GC avaliam as composições de tampões reacionais, e não a diferença entre os diferentes tipos de enzima *Hot Start*.⁷¹⁻⁷²

Por investigar essas diferenças, foi realizada a PCR de um fragmento do gene *blecherry* (presente no vetor pLEXSY_IE-blecherry4, JBS) que contém 67% de GC. A Figura 32A mostra o gel de agarose com as amplificações geradas por todas as Taqs testadas. Com o intuito de comparar as eficiências de amplificação de cada enzima com a Taq nativa, foram feitas quantificações das bandas do gel de cada enzima em relação à Taq nativa comercial (Figura 32B). A eficiência de Taq Cellco foi, aproximadamente, 10% maior a da enzima

comercial, convergindo com todos os dados anteriores. Taqs HS anticorpo apresentaram a maior eficiência entre todas as enzimas testadas, tendo a sua quantificação relativa dobrada em relação à Taq comercial. A polimerase HS aptâmero foi a segunda enzima mais eficiente na amplificação do fragmento com alta % GC, apresentando um aumento de 40% na quantificação relativa das bandas. A enzima menos eficiente foi a Taq HS química, que apresentou diminuição das quantificações de, aproximadamente, 20% em relação à Taq comercial.

Figura 32 – (A) Gel de agarose da PCR de um fragmento de 820 pb do gene *ble cherry* (67% GC). Os primeiros e segundos poços de cada polimerase indicada representam, respectivamente, as enzimas comerciais e as enzimas produzidas nesse trabalho. (B) Quantificações das bandas do gel em relação à banda produzida pela Taq comercial, com destaque para a alta eficiência da Taq HS anticorpo em PCRs de fragmentos contendo alto GC%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, os resultados da amplificação de fragmentos de DNA com alta % GC indicam a mesma classificação de eficiência encontrada nas PCRs convencionais: Taq HS por anticorpo é a mais eficiente, seguida da HS aptâmero, Taq nativa e HS química. No entanto, é notável o aumento da eficiência da HS anticorpo (aumento de aproximadamente 100%) que superou muito o aumento de eficiência da enzima HS aptâmero (aumento de, aproximadamente, 40%) que, até então, sempre apresentou desempenhos muito similares à HS anticorpo. Assim, foi possível delinear uma diferença na aplicação entre essas duas Taqs HS com base na síntese de DNAs com alta % GC.

4.7.6 PCRS MULTIPLEX

A última comparação experimental entre as enzimas produzidas se deu pela PCR multiplex de seis regiões do DNA genômico humano mostradas no gel da Figura 33A. Nesse gel, as setas coloridas da direita indicam os tamanhos corretos dos DNAs amplificados. Apesar de existirem apenas cinco setas indicando os DNAs amplificados, a segunda seta (laranja, próxima a 130 pb) representa dois fragmentos de DNA de tamanhos muito próximos que não conseguiram ser separados pelo gel. Além das enzimas previamente testadas ao longo de toda seção 4.7, foi adicionada uma reação com o *Multiplex PCR Kit* (Qiagen), uma *master mix* de PCR específica para alto desempenho em PCRs multiplex.

Observando-se a quantificação das bandas do gel em relação à Taq nativa comercial (Figura 33B), é possível observar a alta eficiência de amplificação da master mix comercial (média de 3 vezes maior), confirmando que sua composição é otimizada para PCRs multiplex. Além disso, as amplificações das Taqs nativas (produzida nesse trabalho e a comercial) novamente foram muito semelhantes, reforçando o desempenho da enzima produzida, sempre comparável ao de uma enzima comercial.

As enzimas HS ligadas a biomoléculas apresentaram perfis e eficiências de amplificação muito similares: quase todas as bandas do gel foram amplificadas com eficiência superiores às bandas amplificadas por Taq nativa comercial, sendo que suas eficiências médias foram, aproximadamente, 50% maiores quando comparadas à enzima controle. O gel das amostras geradas pelas enzimas HS anticorpo indica grande quantidade de amplificações inespecíficas (bandas acima de 200 pb) na PCR com a enzima comercial (*Platinum Taq*, *Thermo Scientific*), o que ocorre com menor intensidade na HS anticorpo produzida. Essa diferença pode estar relacionada com o maior grau de pureza da enzima produzida ou a ligeira diferença de atividade a 25 °C, já que a enzima produzida apresentou menor atividade a baixas temperaturas, sendo assim mais *Hot Start*.

As Taqs HS químicas apresentaram um aumento de eficiência cerca de 350% maior ao da Taq nativa comercial. Essas eficiências foram as maiores encontradas nesse ensaio, igualando-se às da *master mix* comercial que também possui uma enzima HS modificada quimicamente (*HotStarTaq*, Qiagen) e indicando a alta pureza e ótimo desempenho da HS química produzida. Assim, a elevada eficiência apresentada pelas Taq HS químicas revela que essas enzimas são as mais indicadas para amplificações de PCRs multiplex.

Figura 33 – (A) PCRs multiplex de seis regiões distintas do DNA genômico humano. As setas ao lado do gel indicam os tamanhos corretos dos fragmentos amplificados, sendo que a seta laranja indica dois fragmentos distintos de tamanhos próximos a 130 pb. Gel de agarose 3% das amplificações geradas pelas diferentes enzimas testadas e por uma *master mix* de PCR multiplex (Qiagen). Em cada polimerase indicada, os primeiros e segundos poços do gel indicam as reações realizadas com uma enzima comercial (C) e a versão produzida nesse trabalho (P), respectivamente. (B) Quantificação das bandas específicas de diferentes tamanhos em relação as suas respectivas bandas de amplificação geradas por Taq comercial.

Fonte: Elaborada pela autora.

Examinando ainda o gel da Figura 33A, notam-se muitas amplificações inespecíficas acima de 200 pb. Esse tipo de padrão é comum em PCRs multiplex já que a presença de

vários *primers* na reação (nesse caso, 12 *primers* diferentes) favorece hibridizações e amplificações inespecíficas. A quantidade de amplificações inespecíficas parece ser menor nas reações feitas por HS químicas. Apesar dos esforços empregados, não foi possível realizar a quantificação relativa média das amplificações inespecíficas já que nem todas as polimerases apresentaram as mesmas bandas de amplificação. Uma vez que a quantificação relativa das poucas bandas em comum poderia ser enviesada e injusta, optou-se por fazer apenas essa análise qualitativa baseada no padrão observado no gel.

4.7.7 CUSTO DE PRODUÇÃO

Por esse trabalho almejar a comercialização das Taqs *Hot Start* produzidas é importante comparar o custo de produção de cada enzima, assim como as suas aplicações, para não ocorrer uma redundância e competição entre produtos com o mesmo custo e a mesma finalidade.

Dessa forma, foram somados os custos de todos os reagentes utilizados na fabricação e considerado também o tempo de produção de cada enzima, desde o processo de expressão proteica até a obtenção de polimerases purificadas. Para as HS ligadas a biomoléculas, o custo proporcional as biomoléculas utilizadas foi calculado e adicionado ao custo de produção da enzima nativa. Uma vez que anticorpos e aptâmeros de DNA possuem um elevado valor comercial, as Taq HS ligadas a biomoléculas foram as que apresentaram maior custo de produção, com valores muito próximos uma da outra. Entretanto, se os anticorpos fossem purificados a partir de um hibridoma comercialmente adquirido, o valor de produção dessa enzima poderia ser reduzido pela metade. Dentre as Taqs HS, a enzima modificada quimicamente foi a mais rentável de ser produzida, já que não foi necessário a aquisição de reagentes com alto valor agregado.

Ao longo de toda a seção 4.7, as diferentes enzimas *Hot Start* foram comparadas frente as suas atividades, eficiências e custo de produção. Analisando as Taqs HS ligadas a biomoléculas, foi observada uma grande convergência de desempenho em todos os ensaios realizados, com o destaque da enzima ligada a anticorpo nas amplificações de DNAs com alta % GC.

5 CONCLUSÕES

O uso frequente de Taq DNA polimerase e suas versões *Hot Start* em laboratórios clínicos, de pesquisa e de diagnósticos faz com que o Brasil seja dependente da aquisição de enzimas importadas com altos custos e longos prazos de entrega. Para suprir a falta de produtores dessas enzimas e criar um mercado interno mais competitivo, esse trabalho se propôs a produzir Taq DNA polimerase e suas versões *Hot Start* nacionalmente e com qualidade igual às das enzimas produzidas por empresas internacionais.

A produção de Taq nativa foi otimizada em um sistema de expressão heteróloga em *E. coli* e a enzima foi purificada a partir de uma combinação de métodos cromatográficos que resultou em uma enzima com alta pureza (> 95%) e livre da contaminação de nucleases e DNA genômico bacteriano. Em todos os ensaios realizados a enzima Taq produzida apresentou atividade e eficiência de amplificação comparáveis às de enzimas comerciais.

A partir de Taq purificada, foram desenvolvidas Taqs HS por ligação a anticorpos, aptâmeros de DNA e grupamentos químicos. As polimerases HS ligadas a biomoléculas foram produzidas a partir de diluições dessas biomoléculas na DNA polimerase. As melhores diluições resultaram em Taqs HS com desempenhos iguais aos das enzimas comerciais. Para a produção da Taq HS química, um derivado de anidrido maleico foi covalentemente ligado a resíduos de lisina de Taq, tornando a enzima tão *Hot Start* quanto as suas versões comerciais. Além disso, um tampão *Hot Start* baseado na precipitação de íons de magnésio da solução foi testado frente à atividade de Taq em baixas temperaturas. O tampão *Hot Start*, assim como o mutante sensível a temperatura, produzidos nesse trabalho, não foram capazes de diminuir a atividade de Taq em baixas temperaturas, sendo então pouco eficientes em PCRs *Hot Start*.

Foram realizados diversos ensaios comparativos entre as Taq HS produzidas a fim de compreender as características de cada enzima. Observou-se que as enzimas HS mantiveram a mesma sensibilidade e capacidade de amplificação de longos fragmentos de DNA, assim como Taq nativa. Porém, as eficiências de amplificação das HS ligadas a biomoléculas foram cerca de 20% maior, enquanto que a HS química foi 50% menor do que a enzima nativa. Quando analisadas as sínteses complexas de fragmentos de DNA, Taqs HS ligadas a biomoléculas eram, aproximadamente, 25 vezes mais eficientes que a Taq nativa, enquanto que Taq HS química passava a ser nove vezes mais eficiente. A maior diferença observada entre as enzimas HS aptâmero e anticorpo se deu na PCR de DNA com alta porcentagem de

GC, na qual Taq HS anticorpo apresentou eficiência de amplificação muito superior a todas as outras enzimas, seguida da HS aptâmero, Taq nativa e Taq HS química. Dessa forma, as Taqs HS ligadas a biomoléculas foram, no geral, mais eficientes que Taq HS química, com exceção do ensaio de PCR multiplex. Nessa PCR, as polimerases quimicamente modificadas se mostraram duas vezes mais eficientes do que as Taqs HS ligadas a biomoléculas, além de produzirem menos amplificações inespecíficas, provando-se então ideais em aplicações de PCRs multiplex.

As comparações entre as Taqs HS produzidas estão resumidas na Tabela 8, que mostra os desempenhos de cada enzima em relação aos diferentes ensaios realizados. De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, as Taqs HS com menor atividade a baixas temperaturas são as ligadas a anticorpos e grupamentos químicos, seguidas da Taq HS aptâmero, que ainda apresentou atividade a 25°C. Taqs HS ligadas a biomoléculas são ideais em aplicações que como objetivo grandes quantidades de DNA amplificado. Mais especificamente, Taq HS ligada a anticorpos é a mais indicada na síntese de DNAs contendo alta porcentagem de guanina e citosina. Já nas PCRs multiplex que exigem uma enzima extremamente *Hot Start* e com alta especificidade, Taq HS química foi a enzima que apresentou o melhor desempenho.

Tabela 8 - Comparação entre as diferentes Taqs DNA polimerases avaliadas nesse trabalho. Os sinais crescentes de “+” indicam um melhor desempenho de cada enzima em relação à polimerase com menor desempenho nos ensaios indicados. Nos ensaios em que todas as enzimas apresentaram resultados comparáveis, todas receberam um único sinal de “+”. Observando a tabela, pode-se destacar o alto desempenho da *Hot Start* (HS) ligada a anticorpo em eficiência de amplificação e PCRs de DNAs contendo alta % GC, assim como o alto desempenho da HS química em especificidade e PCRs multiplex.

Enzima	Sensibilidade	PCR de DNAs longos	Eficiência de amplificação	PCR de DNA com alta % GC	Especificidade	PCR Multiplex
Taq	+	+	++	++	+	+
HS anticorpo	+	+	++++	++++	+	++
HS aptâmero	+	+	+++	+++	+	++
HS química	+	+	+	+	++	+++

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, foi possível produzir nacionalmente Taq DNA polimerase e três versões *Hot Start* (por ligação a anticorpo, aptâmero de DNA e grupamento químico), o que representa um grande avanço tecnológico e de inovação em nosso país. Assim, o Brasil agora possui um fabricante nacional de três diferentes Taqs *Hot Start*, o que criará um mercado mais competitivo dessas enzimas, agregando qualidade, preços mais justos e tempos de entrega muito menores. Além disso, o estudo inédito e detalhado das vantagens de cada enzima poderá direcionar os usuários das Taqs HS na compra correta da enzima otimizada para cada aplicação específica, economizando trabalho, recursos e tempo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- 1 NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 2 ISHINO, S.; ISHINO, Y. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 465, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00465.
- 3 THE NOBEL prize in chemistry 1993. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/uncategorized/the-nobel-prize-in-chemistry-1993-1993/>. Acesso em: 19 ago. 2018.
- 4 PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Rotterdam: Springer, 2008.
- 5 MULLIS, K. B. The unusual origins of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.
- 6 CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1550–1557, 1976.
- 7 REECE, J. B. *et al.* **Forensic evidence and genetic profiles**. 10th. ed. São Francisco, CA: Pearson, 2011.
- 8 VALONES, M. A. A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.
- 9 BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 1353, DE 13 DE JUNHO DE 2011**. Aprova o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: https://www.bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt1353_13_06_2011.html/. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 10 ŠPIBIDA, M. *et al.* Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 1, p. 133–142, 2017.
- 11 KIM, Y. *et al.* Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 612–616, 1995.
- 12 ROTHWELL, P. J.; WAKSMAN, G. Structure and mechanism of DNA polymerases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 401–440, 2005.
- 13 ASCHENBRENNER, J.; MARX, A. DNA polymerases and biotechnological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 187–195, 2017. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.04.005.
- 14 WU, E. Y. *et al.* A conservative isoleucine to leucine mutation causes major rearrangements and cold sensitivity in KlenTaq1 DNA polymerase. **Biochemistry**, v. 54, n. 3, p. 881–889, 2015.
- 15 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.
- 16 ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. **PCR Methods and Applications**, v. 1, n. 1, p. 17–24, 1991.
- 17 BLOOM, L. B.; GOODMAN, M. F. Polymerase processivity: measurement and mechanisms. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–6, 2001. DOI: 10.1038/npg.els.0001052.
- 18 ZHANG, Z.; KERMEKCHIEV, M. B.; BARNES, W. M. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n.

2, p. 152–161, 2010.

19 HOLTON, T. A.; GRAHAM, M. W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 5, p. 1156, 1991.

20 LAWYER, F. C. *et al.* High-level expression, purification, and *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. **Genome Research**, v. 2, n. 4, p. 275–287, 1993.

21 EELES, R. A.; WARREN, W.; STAMPS, A. The PCR revolution. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 1, p. 293–295, 1992.

22 KERMEKCHIEV, M. B. *et al.* Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 5, p. e40, 2009.

23 SAIKI, R. K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.

24 D'AQUILA, R. T. *et al.* Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 13, p. 3749, 1991.

25 BLOCH, W.; RAYMOND, J.; READ, A. R. **Use of grease or wax in the polymerase chain reaction.** Depositante: Roche Molecular Systems Inc. US5411876. Depósito: May 27, 1992. Concessão: May 2, 1995.

26 SCALICE, E. R.; SHARKEY, D. J.; DAISS, J. L. Monoclonal antibodies prepared against the DNA polymerase from *Thermus aquaticus* are potent inhibitors of enzyme activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 172, n. 2, p. 147–163, 1994.

27 DANG, C.; JAYASENA, S. D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, n. 2, p. 268–278, 1996.

28 JAYASENA, S. D. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1628–1650, 1999.

29 LOUWRIER, A.; VAN DER VALK, A. Thermally reversible inactivation of Taq polymerase in an organic solvent for application in hot start PCR. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 7, p. 947–952, 2005.

30 KERMEKCHIEV, M. B.; TZEKOV, A.; BARNES, W. M. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 21, p. 6139–6147, 2003.

31 BARNES, W. M.; ROWLYK, K. R. Magnesium precipitate hot start method for PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 3, p. 167–171, 2002.

32 LEBEDEV, A. V. *et al.* Hot start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 20, p. e131, 2008.

33 SHARKEY, D. J. *et al.* Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. **Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 506–509, 1994.

34 MURALI, R. *et al.* Crystal structure of Taq DNA polymerase in complex with an inhibitory Fab: The Fab is directed against an intermediate in the helix-coil dynamics of the enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 21, p. 12562–12567, 1998.

35 TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, v. 249, n. 4968, p. 505–510, 1990.

36 YAKIMOVICH, O. Y. *et al.* Influence of DNA aptamer structure on the specificity of binding to Taq DNA polymerase. **Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 274–282, 2003.

37 BUTLER, P. J. *et al.* Reversible blocking of peptide amino groups by maleic anhydride. **Biochemical Journal**, v. 103, n. 3, p. 78–79, 1967.

- 38 - BUTLER, P. J. *et al.* The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains. **The Biochemical Journal**, v. 112, n. 5, p. 679–689, 1969.
- 39 DIXON, H. B. F.; PERHAM, R. N. Reversible blocking of amino groups with citraconic anhydride. **Biochemical Journal**, v. 109, n. 2, p. 312–314, 1968.
- 40 KADLČÍK, V.; STROHALM, M.; KODÍČEK, M. Citraconylation - a simple method for high protein sequence coverage in MALDI-TOF mass spectrometry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 4, p. 1091–1093, 2003.
- 41 BIRCH, D. E. *et al.* **Nucleic acid amplification using a reversibly inactivated thermostable enzyme.** Depositante: Roche Molecular Systems Inc. US5773258. Depósito: July 11, 1996. Concessão: June 30, 1998.
- 42 IVANOV, I. *et al.* **Method for reversible modification of thermostable enzymes.** Depositante: Qiagen GmbH. US6183998. Depósito: October 31, 1998. Concessão: February 6, 2001.
- 43 MORETTI, T.; KOONS, B.; BUDOWLE, B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq gold(TM) DNA polymerase. **Biotechniques**, v. 25, n. 4, p. 716–722, 1998.
- 44 REINEKE, K.; MATHYS, A.; KNORR, D. Shift of pH-value during thermal treatments in buffer solutions and selected foods. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 4, p. 870–881, 2011.
- 45 MODESTE, E. *et al.* A Molecular dynamics investigation of the thermostability of cold-sensitive I707L KlenTaq1 DNA polymerase and its wild-type counterpart. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 5, p. 2423–2431, 2019.
- 46 PURZYCKA, J. K. *et al.* Efficiency comparison of seven different Taq polymerases used in hemogenetics. **International Congress Series**, v. 1288, p. 719–721, 2006. DOI: 10.1016/j.ics.2005.09.073.
- 47 HALLEY, G.; PREZIOSO, V. Eppendorf HotMaster - An innovative hot start/cold stop technology for better PCR results. **Eppendorff Tech Notes**, p. 76–79, 2003.
- 48 FARAZMANDFAR, T. *et al.* A simplified protocol for producing Taq DNA polymerase in biology laboratory. **Research in Molecular Medicine**, v. 1, n. 2, p. 23–26, 2013.
- 49 SPANGLER, R.; GODDARD, N. L.; THALER, D. S. Optimizing Taq polymerase concentration for improved signal-to-noise in the broad range detection of low abundance bacteria. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 4–6, 2009.
- 50 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. nusnu of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.
- 51 TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523–533, 2003.
- 52 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- 53 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**. 3th. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- 54 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- 55 EVAGREEN® Dye, 20X in water - Product Information. Hayward, 2019. Disponível em: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-31000.pdf> . Acesso em: 05 jun. 2019.
- 56 EVAEZ™ Fluorometric Polymerase Activity Assay Kit - Product Information. Hayward, 2014. Disponível em: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-29051.pdf> . Acesso em: 05 jun. 2019.

- 57 WANG, W.; CHEN, K.; XU, C. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. **Analytical Biochemistry**, v. 356, n. 2, p. 303–305, 2006.
- 58 NOMA, T.; SODE, K.; IKEBUKURO, K. Characterization and application of aptamers for Taq DNA polymerase selected using an evolution-mimicking algorithm. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 23, p. 1939–1944, 2006.
- 59 CAMPANELLA, N. C. *et al.* Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: Correlation with ancestry markers. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 7, p. 875–880, 2014.
- 60 BERARDINELLI, G. N. *et al.* Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients. **Oncotarget**, v. 9, n. 47, p. 28691–28701, 2018.
- 61 CORDES, R. M.; SIMS, W. B.; GLATZ, C. E. Precipitation of nucleic acids with poly (ethyleneimine). **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 4, p. 283–285, 1990.
- 62 LIANG, J. *et al.* Effective elimination of nucleic acids from bacterial protein samples for optimized blue native polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 30, n. 14, p. 2454–2459, 2009.
- 63 PCR Protocols and Guides-Simplify your gene discovery. Billerica, 2012. Disponível em: http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/laboratory_and_safety/information_and_protocols_B2CI/PCR_protocols_Merck17052012.pdf. Acesso em: 09 mar. 2020
- 64 GoTaq® DNA Polymerase: Certificate of Analysis. Madison, 2018. Disponível em: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-dna-polymerase-m300.pdf?la=en>. Acesso em: 09 mar. 2020
- 65 USER Guide: Qubit Protein Assay Kits. Carlsbad, 2015. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf. Acesso em: 27 set. 2018.
- 66 TECHNICAL bulletin: Bradford Reagent. Saint Louis, 2011. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>. Acesso em: 09 mar. 2020.
- 67 APOSHIAN, H. V.; KORNBERG, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 2, p. 519–525, 1964.
- 68 LEHMAN, L. R. *et al.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 233, n. 1, p. 163–170, 1958.
- 69 LI, Y. *et al.* Crystal structures of the Klenow fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates G. **Protein Science**, v. 7, n. 5, p. 1116–1123, 1998.
- 70 BAILEY, C. L.; BIRCH, L.; MCDOWELL, D. G. **Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach**. Teddington: RSC, 2008.
- 71 MAMEDOV, T. G. *et al.* A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. **Computational Biology and Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 452–457, 2008.
- 72 GUIDO, N. *et al.* Improved PCR amplification of broad spectrum GC DNA templates. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2016.