**Produção e purificação de um fragmento
recombinante da proteína A de superfície
do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus
pneumoniae* em *Escherichia coli***

RIMENYS JUNIOR CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2009

**Produção e purificação de um fragmento
recombinante da proteína A de superfície
do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus
pneumoniae* em *Escherichia coli***

RIMENYS JUNIOR CARVALHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Carvalho, Rimenys Junior

Produção e purificação de um fragmento recombinante da proteína A de superfície do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* / Rimenys Junior Carvalho. -- São Paulo, 2009.

Orientadora: Viviane Maimoni Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção e purificação de proteínas recombinantes.

Versão do título para o inglês: Production and purification of a recombinant fragment of pneumococcal surface protein A clade 3 (PspA3) from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*.

Descritores: 1. *Streptococcus pneumoniae* 2. *Escherichia coli* 3. Alta densidade celular 4. Clarificação 5. Purificação de proteína recombinante 6. Cromatografia líquida I. Gonçalves, Viviane Maimoni II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0147/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rimenys Junior Carvalho.

Título da Dissertação: Produção e purificação de um fragmento recombinante da proteína A de superfície do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli*.

Orientador(a): Viviane Maimoni Gonçalves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho a algumas pessoas que foram essenciais para que ele pudesse ser realizado: aos meus pais Adélio e Nanci pela dedicação, carinho e apoio, a minha irmã Elaine, ao meu cunhado Gledson, minha sobrinha Laura e aos meus tios Élio e Azuir e primos Helen e Ítalo, pela confiança e apoio ao me acolherem em suas casas e, finalmente, a minha orientadora Dra. Viviane pela extrema dedicação a todo o momento durante a execução desse trabalho. Com o mesmo carinho que recebi durante esse tempo, dedico esse trabalho tão importante para mim a vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Instituto Butantan por ter fornecido o espaço e o material de trabalho.

À Dra. Eliane Miyaji, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pelo fornecimento da cepa recombinante utilizado neste trabalho o qual foi importantíssimo para o sucesso deste.

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa auxílio, sem a qual não teria conseguido realizar este trabalho a tempo, também à FAPESP pela aprovação do projeto temático o qual este trabalho está inserido.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Biopressos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Aos pesquisadores Dra. Elisabete Sbrogio, Dra. Mickie, Dr. Pradella e Dra. Célia, que mesmo não ligados diretamente ao projeto, me apoiaram e ensinaram brilhantemente durante os trabalhos desenvolvidos. Aos técnicos Lourivaldo, Inês, Ana e Élio, pela ajuda e apoio nos trabalhos. Aos amigos e colegas de trabalho Mateus, Daniel, Roger, Verônica, Talita, Sílvia, Cíntia, Carol, Natália, Beatriz, Bruno e Rose, pela ajuda obtida nos trabalhos.

A todos os amigos do Instituto Butantan fora do laboratório e também aos amigos em geral por estarem sempre presentes e, de alguma forma incentivaram e reconheceram meu trabalho.

À banca de qualificação Dr. Adalberto, Dra. Francislene e Dr. Ivo pela disponibilidade e importante ajuda recebida na qualificação.

Aos pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento do trabalho durante a execução com o conhecimento e apoio material.

Aos meus maravilhosos pais Adélio e Nanci, por estarem sempre presentes mesmo morando em outra cidade. Pela formação obtida e não só como um profissional, mas pela formação pessoal o que é em grande parte a base das minhas vitórias alcançadas.

Pelas outras famílias conquistadas em São Paulo, minha irmã Elaine, meu cunhado Gledson, minha sobrinha Laura, meus tios Élio e Azuir e meus primos Helen e Ítalo, os quais me acolheram com carinho em suas casas por todo o período

deste trabalho e terem permitido que eu fizesse parte de sua família, pela convivência, respeito e apoio.

Ao meu co-orientador Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, pela grande ajuda obtida durante este trabalho e mesmo não sendo formalmente co-orientador foi indispensável para o sucesso deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Viviane Maimoni Gonçalves, que não mediu esforços para que este trabalho pudesse ser realizado. Pelos ensinamentos, apoio, presença, humanidade, reconhecimento, críticas, enfim, por toda ajuda obtida durante o desenvolvimento deste trabalho a qual é grande responsável pela minha formação de mestre.

E, finalmente, a Deus por ter me iluminado para o melhor caminho a seguir, por ter colocado pessoas hoje indispensáveis na minha vida pessoal e profissional.

Este é um trabalho especial feito em equipe o qual tem um pouco de todos!

Muito Obrigado!

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem
perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo
de tentar.”

Willian Shakespeare

RESUMO

CARVALHO, R. Jr. Produção e purificação de um fragmento recombinante da proteína A de superfície do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli*. **2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

Novas vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* vem sendo estudadas, entre elas uma nova vacina conjugada utilizando como carregadoras proteínas de superfície do próprio *S. pneumoniae*. A proteína “pneumococal surface protein A” (PspA) foi escolhida por ser uma proteína de superfície indispensável para a virulência da bactéria. Assim, este trabalho propôs o desenvolvimento de um processo industrial de produção e purificação de um fragmento recombinante da PspA clado 3 (rfPspA3) em *E. coli* BL21(DE3). Testes cinéticos foram realizados e, posteriormente, cultivos descontínuos alimentados em meio definido foram feitos com glicose ou com glicerol como fonte de carbono em biorreator de 5 L, obtendo-se 62 g/L de massa celular seca e ~3 g/L de rfPspA3. As células foram lisadas por homogeneizador contínuo de alta pressão com eficiência de 96,7%. Em seguida, para a etapa de clarificação, além da centrifugação, foram testadas micro e ultra filtração tangencial, as quais ocasionaram perda de rfPspA3 (58% e 29%, respectivamente), definindo-se portanto a centrifugação para esta etapa. Duas etapas cromatográficas foram determinadas, troca aniônica (Q-Sepharose) e afinidade por metal (IMAC-Sepharose) carregada com Ni^{+2} , e as duas possíveis sequências foram avaliadas. A sequência Q seguida pela IMAC-Sepharose rendeu melhores resultados de pureza e recuperação (81 e 70%, respectivamente). Para a terceira etapa foram avaliadas: a cromatografia hidrofóbica (Phenyl-Sepharose), a gel filtração (Sephacryl S-200 HR) e a troca catiônica (SP-Sepharose). A última foi escolhida para compor o processo de purificação. Os resultados da purificação do material proveniente dos cultivos em alta densidade com glicose ou glicerol foram então comparados e não foram encontradas diferenças relevantes para a Q-Sepharose. A pureza final do rfPspA3 foi de 90%, porém o rendimento da última etapa foi menor que o obtido quando da definição do processo. Concluindo, um processo de produção e purificação escalonável foi desenvolvido e possibilitou a obtenção de rfPspA3 com um alto grau de pureza (90%).

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. *Escherichia coli*. Alta densidade celular. Clarificação. Purificação de proteína recombinante. Cromatografia líquida.

ABSTRACT

CARVALHO, R. Jr. Production and purification of a recombinant fragment of pneumococcal surface protein A clade 3 (PspA3) from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*. **2009. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

New vaccines against *Streptococcus pneumoniae* have been developed, among them a new conjugated vaccine using as carriers pneumococcal surface proteins has been studied. The protein pneumococcal surface protein A (PspA) was the first choice as carrier because it is indispensable for virulence of *S. pneumoniae*. Hence, the purpose of this work was to develop an industrial production and purification process of a recombinant fragment of PspA clade 3 (rfPspA3) in *E. coli* BL21(DE3). Kinetic assays were performed, and then fed-batch cultivations in 5 L bioreactors with defined medium were carried out using glucose or glycerol as carbon sources. It was obtained 62 g/L of dry cell weight and 3 g/L of rfPspA3. Cells were disrupted with 96.7% of efficiency by high pressure continuous homogenizer. For the clarification step, besides centrifugation, it was tested cross flow micro and ultra filtrations in hollow fibers, but these methods led to rfPspA3 loss (58% and 29%, respectively). Therefore, centrifugation was defined for the clarification step. Two chromatographic steps and the best sequence of them were analyzed: anion exchange (Q-Sepharose) and metal affinity (IMAC-Sepharose). The sequence with Q followed by IMAC-Sepharose yielded the best purity and recovery of rfPspA3 (81 and 70%, respectively). For the third chromatographic step, three methods were evaluated: hydrophobic interaction (Phenyl-Sepharose), gel filtration (Sephacryl S-200 HR) and cation exchange (SP-Sepharose). The last one was chosen for the purification process. The results of rfPspA3 purification from cultures using glucose or glycerol were compared and no relevant differences were found in the Q-Sepharose step. The final purity of rfPspA3 was 90%, but the recovery of the last chromatography was lower than previously obtained. In conclusion, an industrial production and purification process was developed and rfPspA3 was obtained with high purity (90%).

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. *Escherichia coli*. High cell density. Clarification. Recombinant protein purification. Liquid chromatography.

LISTA DE ABREVIATURAS

PS – Polissacarídeos

E. coli BL21(DE3) – Bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 com o gene do fago DE3 inserido em seu gene

PspA – *pneumococcal surface protein A* (proteína pneumocócica A de superfície)

rfPspA3 – Fragmento recombinante da proteína PspA clado 3

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

OMS – Organização Mundial da Saúde

FDA – *Food and Drug Administration*

CIP – *Cleaning in place*

SIP – *Satinization in place*

Kan – Antibiótico kanamicina

LB – Meio de cultivo complexo Luria Bertani

MQD – Meio de cultivo quimicamente definido

DO_{600nm} – Densidade óptica à 600 nm de comprimento de onda

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
(Dodecilsulfato de sódio – eletroforese de gel de poliacrilamida)

pI – Ponto isoelétrico

RF – *Relative front* (distância percorrida pela biomolécula em um gel de eletroforese em relação à distância total do gel)

EDTA – Ácido etilenodiamino-tetra-acético

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

PMSF - Fenilmetanosulfonilfluorídrico

PPG – Polipropilenoglicol

IMAC – *Immobilized metal affinity chromatography* (Cromatografia de afinidade por metais)

HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

HPSEC – *High performance size-exclusion chromatography* (Cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência)

RID – Detector de índice de refração

UFC – Unidade formadora de colônia

CD – Dicroísmo circular

UV – Ultravioleta

LISTA DE NOMENCLATURAS

$m_s(t)$ = Fluxo mássico de alimentação de substrato em função do tempo (g/h)

V_0 = Volume do reator no início da alimentação (L)

X_0 = Concentração celular no início da alimentação (g/L)

S = Concentração do substrato limitante dentro do reator (g/L)

S_f = Concentração do substrato limitante no meio do reator (g/L)

e = Função matemática exponencial

t = tempo (h)

t_0 = tempo no início da alimentação (h)

$Y_{X/S}$ = Conversão de substrato em células (g massa celular seca/ g fonte carbono consumida)

m = coeficiente de manutenção celular (0,025 g/g.h)

kDa = Quilodaltons

FV = Fluxo volumétrico (mL/min)

FL = Fluxo linear (cm/h)

R = Raio (cm)

π = Letra grega de nome “pi” correspondente ao número $\sim 3,1416$

$\mu_{\max}$ = velocidade máxima de crescimento celular (h^{-1})

μ_{set} = velocidade de crescimento celular no set point (h^{-1})

μ_{crit} = velocidade crítica de crescimento celular (h^{-1})

MS = massa celular seca (g/L)

M_{tc} = massa do tubo contendo o pellet bacteriano (g)

M_{tv} = massa do tubo vazio para medida de massa celular (g)

V = volume (L)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1:** Taxa anual de mortalidade de crianças menores de 5 anos por doenças causadas por diferentes patógenos em todo o mundo, sendo que mais de 800.000 mortes são causadas somente por doenças pneumocócicas.....26
- Figura 1.2:** Estrutura da PspA, a barra estreita indica os fragmentos fPspA 1 e 3 clonados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.....28
- Figura 1.3:** Esquema da estrutura da parede celular do pneumococo e do ancoramento da PspA. A parte vermelha da proteína é helicoidal e eletronegativa e a parte azul é plana e eletropositiva.....29
- Figura 1.4:** Sistema de controle do óperon Lac. A) no cromossomo da bactéria com a produção de permease; B) no sistema pET com a indução da expressão do gene de interesse presente no vetor.....32
- Figura 3.1:** Etapas do processo de produção e purificação do fragmento recombinante da PspA3.....37
- Figura 3.2:** Homogeneizador contínuo de alta pressão APV-Gauling utilizado para lise celular de *E. coli*.....44
- Figura 3.3:** Estação de trabalho Äkta Explorer da Amersham Pharmacia Biotech munido de 2 bombas. Na figura há o computador que monitora e controla o sistema on-line do processo através do software Unicorn 3.21 e a coluna XK 26 com 75 mL da resina SP-Sepharose Fast-Flow.....49
- Figura 4.1:** Gel de eletroforese do teste de expressão de 4 diferentes colônias da *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET37b⁺/rfpspA3.....56
- Figura 4.2:** Curva de crescimento nos meios LB e MQD utilizando *E. coli* BL21(DE3) carregando pET37b⁺/rfpspA3.....57
- Figura 4.3:** **A** - Eletroforese do rfPspA3 no meio LB. **B** - Eletroforese do rfPspA3 no meio MQD.....58
- Figura 4.4:** Parâmetros do cultivo descontínuo de *E. coli* BL21(DE3) em meio MQD utilizando glicose como fonte de carbono em biorreator de 5 L para produção de rfPspA3. **A** - Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$); **B** – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).....59
- Figura 4.5:** Parâmetros do cultivo descontínuo de *E. coli* BL21(DE3) em meio MQD utilizando glicerol como fonte de carbono em biorreator de 5 L para produção de rfPspA3. **A** - Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$); **B** – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).....59

Figura 4.6: Cultivo Descontínuo de *E. coli* BL21(DE3)+pET37b⁺/rfpspA3 em meio MQD com glicose como fonte de carbono.....60

Figura 4.7: Cultivo Descontínuo de *E. coli* BL21(DE3)+pET37b⁺/rfpspA3 em meio MQD com glicerol como fonte de carbono.....60

Figura 4.8: **A** – Gel de eletroforese da produção do rfPspA3 durante o cultivo descontínuo com glicose como fonte de carbono. **B** – Gel de eletroforese da produção do rfPspA3 durante o cultivo descontínuo com glicerol como fonte de carbono.....62

Figura 4.9: Gel de eletroforese com as frações obtidas na cromatografia IMAC-sepharose carregada com Ni²⁺ (com clarificados e eluições diluídos 10 vezes, fração não-adsorvida 5 vezes e lavagens sem diluição). **A** – Purificação a partir das células do cultivo em batelada com glicose. **B** – Purificação a partir das células do cultivo em batelada com glicerol.....63

Figura 4.10: Cultivo descontínuo alimentado de *E. coli* BL21(DE3) para produção de rfPspA3 com glicose como fonte de carbono.....65

Figura 4.11: Cultivo descontínuo alimentado de *E. coli* BL21(DE3) para produção de rfPspA3 com glicerol como fonte de carbono..... 66

Figura 4.12: Gel de eletroforese de rfPspA3 das amostras do cultivo descontínuo alimentado com glicose (A) e glicerol (B) como fonte de carbono.....68

Figura 4.13: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação de DO_{600nm}. Cada amostra foi ajustada em DO_{600nm} igual a cinco para aplicação ao gel. **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.....69

Figura 4.14: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação de DO_{600nm}. Foi aplicado ao gel 2 µL de cada amostra. **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.....69

Figura 4.15: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração celular fixa (DO_{600nm} = 140), lactose 16 g/L e variação da concentração de IPTG. Para cada teste, uma quantidade de células correspondente a DO_{600nm} igual a cinco foi aplicada ao gel. **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.....70

Figura 4.16: Perfil de produção de rfPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L. Área da banda do rfPspA3 (SDS-PAGE –Figura 4.13) versus relação µmol IPTG/DO_{600nm}. SDS-PAGE de amostras com quantidade de células correspondentes à DO_{600nm}=5,0.....70

Figura 4.17: Perfil de produção de rfPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação da

concentração celular. Área da banda do rPspA3 (SDS-PAGE – Figura 4.14) versus relação $\mu\text{mol IPTG}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. SDS-PAGE de amostras com volume de 2 μL71

Figura 4.18: Perfil de produção de rPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentrações fixas de células ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 140$) e lactose 16 g/L e variação da concentração de IPTG analisado pela eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.15). SDS-PAGE de amostras com quantidade de células correspondentes à $\text{DO}_{600\text{nm}}=5,0$71

Figura 4.19: Sequência do fragmento recombinante da PspA3 utilizado neste trabalho.....73

Figura 4.20: Curva de titulação teórica do rPspA3 obtido do programa.....74

Figura 4.21: Géis de eletroforese do sobrenadante das amostras da lise celular mecânica em homogeneizador de alta pressão APV Gauling 60. A-Lise celular do cultivo com glicose como fonte de carbono e B- Lise celular do cultivo com glicerol como fonte de carbono.....76

Figura 4.22: Perfil da concentração de proteínas totais (A) e rPspA3 (B) obtido em relação ao tempo de lise das células obtidas do cultivo de alta densidade com glicose como fonte de carbono e com glicerol.....77

Figura 4.23: Perfil da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ e também de contagem de colônias pelo tempo de lise celular em homogeneizador de alta pressão Gaulin APV 60. Amostras a partir das células do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono e também com glicerol.....78

Figura 4.24: Gel de eletroforese do teste de solubilidade da proteína rPspA3 feito por centrifugação do homogenato bruto da *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET37b+/rfpspA3.....79

Figura 4.25: Amostras obtidas após diferentes etapas de clarificação (10 μg de proteínas totais).....80

Figura 4.26: Foto dos clarificados em diferentes tratamentos.....81

Figura 4.27: Cromatogramas do homogenato bruto e das 3 clarificações.....81

Figura 4.28: Gel de eletroforese do teste de solubilidade do rPspA3 em diferentes pH.....83

Figura 4.29: Perfil da porcentagem de recuperação rPspA3 e proteínas totais recuperadas no sobrenadante do clarificado centrifugado de *E. coli* BL21(DE3) submetido a diferentes pH e a indicação do pl teórico no gráfico.....84

Figura 4.30: Gel de eletroforese da adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-sepharose FF em diferentes pH.....85

Figura 4.31: 1-Gel de eletroforese de testes de adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-Sepharose em diferentes pH. 2-Western Blotting obtido a partir do gel de eletroforese 1.....	87
Figura 4.32: α e β -Géis de eletroforese do teste de adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-sepharose em diferentes concentrações de NaCl.....	88
Figura 4.33: Porcentagem relativa de rPspA3 nas frações não-adsorvidas em resina Q-Sepharose FF em diferentes concentrações de NaCl.....	89
Figura 4.34: Fluxograma do primeiro teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas.....	90
Figura 4.35: Fluxograma do segundo teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas.....	91
Figura 4.36: Fluxograma do terceiro teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas.....	92
Figura 4.37: Fluxograma do primeiro teste de eluição em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-sepharose Fast-Flow carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada etapa do processo indicada pela seta.....	94
Figura 4.38: Fluxograma do segundo teste de em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-sepharose FF carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida indicada pela seta.....	95
Figura 4.39: Fluxograma do terceiro teste em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-sepharose FF carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração indicada pela seta.....	96
Figura 4.40: Esquemas dos processos de purificação de rPspA3 testados para estabelecer a sequência das etapas cromatográficas.....	97
Figura 4.41: Condições da cromatografia utilizando coluna com 500 mL de Q-Sepharose Fast-Flow para estabelecer a sequência das etapas de purificação de rPspA3.....	98
Figura 4.42: Condições da cromatografia utilizando 500 mL de IMAC-Sepharose Fast-Flow carregada com Ni^{+2} para estabelecer a sequência das etapas de purificação de rPspA3.....	98
Figura 4.43: Cromatogramas e SDS-PAGE das frações da primeira sequência cromatográfica em Q-Sepharose seguida de IMAC-Sepharose.....	99
Figura 4.44: Cromatogramas e SDS-PAGE das frações da segunda sequência de cromatografias em IMAC-Sepharose seguida de Q-Sepharose.....	100

Figura 4.45: A-Cromatograma da purificação em Sephacryl S-200 HR da amostra de eluição da segunda cromatografia IMAC-Sepharose. B1 e B2-Géis de eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas a partir de 80 mL de eluição até 330 mL indicada pelas setas vermelhas.....	102
Figura 4.46: Gel de eletroforese SDS-PAGE não redutor das frações obtidas do pico do cromatograma (Figura 4.45 A).....	103
Figura 4.47: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com a resina Phenyl-Sepharose.....	104
Figura 4.48: Géis de eletroforese dos testes de dessorção em coluna empacotada com resina Phenyl-Sepharose High Sub Fast Flow. A-Teste realizado com NaCl e B-Teste realizado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	105
Figura 4.49: Gel de eletroforese do teste de precipitação isoeletrica com amostra purificada em duas etapas cromatográficas.....	106
Figura 4.50: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com resina SP-Sepharose.....	107
Figura 4.51: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com resina SP-Sepharose na faixa de pH de 5,0 a 6,5.....	108
Figura 4.52: Estrutura tridimensional do fragmento protéico da PspA estudado por Jedrzej et al. ¹²	109
Figura 4.53: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos à resina SP-Sepharose em diferentes concentrações de NaCl à pH 6,0.....	109
Figura 4.54: Gel de eletroforese do terceiro teste de eluição em coluna empacotada com resina SP-Sepharose Fast Flow em pH 7,0 com diferentes concentrações de NaCl.....	111
Figura 4.55: Gel de eletroforese do teste de eluição com diferentes concentrações de tampão fosfato pH 7,0 em coluna empacotada com resina SP-Sepharose Fast Flow.....	112
Figura 4.56: Condições da cromatografia SP-Sepharose Fast-Flow determinada como última etapa cromatográfica da sequência de purificação de rfPspA3.....	112
Figura 4.57: Fluxograma das etapas cromatográficas definidas para purificação de rfPspA3.....	113
Figura 4.58: Fluxograma das etapas de purificação realizadas e suas respectivas condições de eluição para purificação do rfPspA3.....	114
Figura 4.59: Géis de eletroforese SDS-PAGE da primeira cromatografia Q-Sepharose utilizando clarificado obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono (A) e glicerol (B).....	115

Figura 4.60: Géis de eletroforese SDS-PAGE da segunda cromatografia IMAC-Sepharose utilizando clarificado obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono (A) e glicerol (B).....	115
Figura 4.61: Géis de eletroforese SDS-PAGE da terceira cromatografia SP-Sepharose utilizando clarificado obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono (A) e glicerol (B).....	116
Figura 4.62: Cromatogramas do clarificado centrifugado e frações de eluição das etapas cromatográficas de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono.....	117
Figura 4.63: Cromatogramas do clarificado centrifugado e frações de eluição das etapas cromatográficas de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicerol como fonte de carbono.....	118
Figura 4.64: Gel de eletroforese SDS-PAGE da amostra de eluição da terceira etapa cromatográfica SP-Sepharose Fast Flow obtida da produção com glicerol como fonte de carbono em diferentes quantidades de proteínas totais.....	120
Figura 4.65: Espectro CD do rPspA3 purificado a partir do cultivo com glicerol....	121
Figura 4.66: Espectro de CD obtido nas construções de PspA Rx1314 e Rx1314MI segundo Jedrzejas et al. ¹²	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição do meio LB.....	38
Tabela 3.2: Composição do meio quimicamente definido (MQD) para ensaios em frascos.....	38
Tabela 3.3: Composição do meio de alimentação para os cultivos em batelada alimentada.....	41
Tabela 4.1: Porcentagem de colônias resistentes à kanamicina durante o cultivo descontínuo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)+pET37b ⁺ /rfpspA3.....	62
Tabela 4.2: Comparação do rfPspA3 obtido nos cultivos descontínuos após a cromatografia de afinidade por metal.....	64
Tabela 4.3: Composição de aminoácidos do rfPspA3 obtida pela análise de sua seqüência pelo programa.....	74
Tabela 4.4: Dados finais dos cultivos em biorreator de 5 L após separação das células do meio de cultivo.....	75
Tabela 4.5: Pureza relativa do rfPspA3 antes e após centrifugação.....	80
Tabela 4.6: Tabela de purificação dos clarificados obtidos por centrifugação, microfiltração e ultrafiltração.....	82
Tabela 4.7: Pureza relativa do rfPspA3 no precipitado e sobrenadante das amostras do homogenato a diferentes pH.....	83
Tabela 4.8: Pureza relativa do rfPspA3, sua concentração e recuperação nas frações não-adsorvidas em resina de troca-aniônica Q-sepharose em diferentes pH.....	86
Tabela 4.9: Concentração de NaCl na solução tampão acetato 25 mM e sua respectiva condutividade.....	88
Tabela 4.10: Tabela de purificação de rfPspA3 do terceiro teste de dessorção com a resina Q-sepharose.....	93
Tabela 4.11: Tabela de purificação de rfPspA3 do terceiro teste de dessorção com a resina IMAC-Sepharose.....	97
Tabela 4.12: Tabela de purificação de rfPspA3 em Q-Sepharose seguida de IMAC-Sepharose.....	99
Tabela 4.13: Tabela de purificação de rfPspA3 em IMAC-Sepharose seguida de Q-Sepharose.....	101

Tabela 4.14: Concentrações dos sais NaCl e (NH₄)₂SO₄ utilizados no teste de adsorção em tubos à resina Phenyl-Sepharose.....104

Tabela 4.15: Tabela de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono.....118

Tabela 4.16: Tabela de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicerol como fonte de carbono.....119

Tabela 4.17: Pureza relativa de rfPspA3 purificado a partir do cultivo com glicerol.....120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 CULTIVO.....	29
1.2 PURIFICAÇÃO.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 GERAL.....	35
2.2 ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR.....	36
3.2 ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO rfPspA3.....	37
3.3 PRODUÇÃO DO <i>fPspA3</i> EM <i>E. coli</i> BL21 (DE3) – UPSTREAM.....	38
3.3.1 Ensaios em frascos agitados.....	38
3.3.2 Preparo do estoque congelado.....	39
3.3.3 Preparo de inóculo.....	39
3.3.4 Cultivo em biorreator.....	40
3.3.4.1 Descontínuo.....	40
3.3.4.2 Descontínuo alimentado.....	40
3.3.4.3 Estudo da relação IPTG/ células/ tempo de indução.....	41
Variação da concentração celular (concentração fixa de IPTG).....	42
Variação da concentração de IPTG (concentração celular fixa).....	42
3.4 ETAPAS DE PURIFICAÇÃO PROTÉICA – DOWNSTREAM.....	43
3.4.1 Separação celular do meio fermentado.....	43
3.4.2 Lise celular.....	43
3.4.3 Teste de solubilidade do rfPspA3.....	44
3.4.4 Clarificação do Homogenato.....	44
3.4.5 Teste de precipitação do rfPspA3 em diferentes pH.....	45
3.4.5.1 Precipitação do homogenato.....	45
3.4.5.2 Precipitação isoelétrica da fração de eluição da segunda cromatografia.....	45
3.4.6 Cromatografia: resinas, colunas e etapas das cromatografias estudadas.....	46

3.4.7 Testes prévios de adsorção em tubos com as resinas.....	47
3.4.7.1 Amostras.....	47
3.4.7.2 Condições cromatográficas.....	48
3.4.8 Cromatografia em coluna empacotada.....	49
3.4.8.1 Estabelecimento das condições de dessorção em coluna empacotada.....	49
3.4.8.2 Estabelecimento da sequência das etapas cromatográficas.....	51
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	52
3.5.1 Cálculos dos parâmetros fermentativos.....	52
3.5.2 Determinação da relação massa seca x DO _{600nm} de suspensões celulares.....	52
3.5.3 Determinação da concentração de glicose, glicerol e ácido acético.....	53
3.5.4 Determinação da estabilidade do plasmídeo.....	53
3.5.5 Quantificação de proteínas.....	53
3.5.6 Eletroforese SDS-PAGE.....	54
3.5.7 Determinação de Pureza Relativa do rfPspA3.....	54
3.5.8 Western Blotting.....	55
3.5.9 Dicroísmo Circular.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 EXPRESSÃO DO GENE E CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>E. coli</i> BL21(DE3) PARA PRODUÇÃO DE rfPspA3.....	56
4.1.1 Testes de expressão do gene <i>fPspA3</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e seleção do clone produtor.....	56
4.1.2 Cultivo em frascos agitados.....	57
4.1.3 Cultivo Descontínuo em biorreator de 5 L.....	58
4.1.3.1 Purificação do rfPspA3 dos cultivos descontínuos.....	63
4.1.4 Cultivo Descontínuo Alimentado de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) para produção de rfPspA3 em biorreator de 5 L.....	65
4.1.5 Estudo da relação IPTG/ células/ tempo de indução.....	68
4.2 CARACTERÍSTICAS DO rfPspA3.....	73
4.3 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO rfPspA3.....	75
4.3.1 Separação das células do meio de cultivo.....	75
4.3.2 Lise celular.....	75

4.3.3 Teste de solubilidade do rfPspA3.....	79
4.3.4 Clarificação do homogenato.....	80
4.3.5 Teste de precipitação do rfPspA3 em diferentes pH.....	82
4.3.6 Testes de adsorção em resina Q-sepharose Fast-Flow.....	84
4.3.7 Testes em Colunas Cromatográficas.....	89
4.3.7.1 Q-Sepharose Fast-Flow.....	89
4.3.7.2 IMAC-Sepharose Fast-Flow carregada com Ni ⁺²	93
4.3.7.3 Estabelecimento da seqüência das cromatografias em Q-Sepharose e IMAC-Sepharose carregada com Ni ⁺²	97
4.3.8 Estudos para estabelecer a terceira etapa de purificação.....	101
4.3.8.1 Sephacryl S-200 HR como possível terceira etapa cromatográfica.....	102
4.3.8.2 Phenyl-Sepharose High Sub Fast Flow como possível terceira etapa cromatográfica.....	104
Teste de adsorção em tubos.....	104
Teste de dessorção em coluna empacotada.....	105
4.3.8.3 Recuperação de rfPspA3 por precipitação isoeletrica.....	106
4.3.8.4 SP-Sepharose Fast Flow como possível terceira etapa cromatográfica.....	107
Teste de adsorção em tubos.....	107
Teste de dessorção em coluna empacotada.....	110
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE A PURIFICAÇÃO DO rfPspA3 OBTIDO EM CULTIVOS DE ALTA DENSIDADE COM GLICOSE E COM GLICEROL.....	113
4.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DO rfPspA3 PURIFICADO.....	121
4.6 PONTOS IMPORTANTES DURANTE O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	122
4.6.1 Em relação à manipulação do rfPspA3.....	122
4.6.2 Em relação aos aspectos econômicos do processo.....	122
5 CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
ANEXOS.....	132
A. Sephacryl S-200 HR.....	133
B. Phenyl-Sepharose 6 high sub Fast-Flow.....	134

C. Q-Sepharose Fast-Flow.....	137
D. SP-Sepharose Fast-Flow.....	137
E. IMAC-Sepharose Fast-Flow.....	139

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae é um importante patógeno humano responsável por infecções das vias respiratória superiores e inferiores, otite e meningite. A população mais vulnerável são crianças menores de 5 anos de idade (Figura 1.1), pessoas com mais de 60 anos e imunocomprometidos¹.

Figura 1.1: Taxa anual de mortalidade de crianças menores de 5 anos por doenças causadas por diferentes patógenos em todo o mundo, sendo que mais de 800.000 mortes são causadas somente por doenças pneumocócicas².

Atualmente são identificados mais de 90 sorotipos diferentes de pneumococo, cada um correspondendo a uma composição química diferente do polissacarídeo (PS) da cápsula e aproximadamente 20 sorotipos desse total são responsáveis pela infecção grave¹. A prevalência desses sorotipos varia conforme a região geográfica, com a idade da população e ao longo do tempo. No Brasil, 13 sorotipos são responsáveis por 75% dos casos da doença invasiva, sendo 1/3 do total de casos provocado pelos sorotipos 1, 6B e 14. A distribuição se altera com a idade e o sorotipo 3 passa a ser prevalente entre a população de 15-60 anos (9,3% dos casos) e maior de 60 anos (14,6% dos casos)³.

A administração de vacinas tem demonstrado boa eficácia na prevenção da infecção pneumocócica, desde que a composição agregue os sorotipos prevalentes em cada região geográfica. Por exemplo, a vacina composta por 23 polissacarídeos provenientes de 23 sorotipos prevalentes nos EUA e na Europa apresenta cobertura de 90% dos casos da doença nessas duas regiões, entretanto de apenas 70% na Ásia⁴. O principal problema desta vacina multi-polissacarídica é que PS são

antígenos independentes de células T, por isso não protegem as crianças menores de 2 anos. Uma alternativa para melhorar a resposta imune de vacinas polissacarídicas é a conjugação dos PS com uma proteína carregadora. Atualmente, uma vacina antipneumocócica heptavalente conjugada ao toxóide diftérico tem sido comercializada. Esta vacina tem apresentado proteção em crianças, mas somente contra os sorotipos presentes na vacina. Embora seja eficiente, essa vacina é muito cara, o que inviabiliza sua introdução na campanha nacional de vacinação infantil, sendo necessário aplicar três doses para assegurar a proteção⁵.

Para contornar os problemas supracitados, estudos mais recentes têm sugerido que certas proteínas de superfície poderiam ser testadas como vacinas, pois esses antígenos ofereceriam maior proteção, seriam comuns a um maior número de cepas e poderiam ser usados individualmente ou em combinação com outros antígenos protéicos. Essas proteínas estão envolvidas nas interações diretas com o hospedeiro ou protegem a superfície da bactéria dos mecanismos de defesa do hospedeiro⁶.

A estratégia adotada pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para o desenvolvimento de uma nova vacina antipneumocócica envolve a conjugação de alguns PS de sorotipos prevalentes no Brasil com proteínas recombinantes do próprio pneumococo. A conjugação, isto é, ligação covalente do PS a uma proteína, como explicado acima, converte a resposta imune contra PS em timo-dependente, permitindo assim o desenvolvimento de memória imunológica contra esse antígeno. Desse modo, uma vacina conjugada antipneumocócica mais barata e simples seria obtida, pois ela seria composta por menor número de PS e apresentaria maior espectro de ação dado pela porção protéica da vacina. A primeira escolha do Centro de Biotecnologia foi a PspA (Pneumococal surface protein A). A presença desta proteína na superfície é considerada indispensável para a virulência do pneumococo. Estudos em camundongos têm demonstrado que esta proteína possui a capacidade de reduzir a ação mediada por complemento e a fagocitose das células de pneumococos. A imunização com PspA apresenta ainda a capacidade de induzir proteção ativa e passiva mediadas respectivamente por anticorpos e soros hiperimunes e/ou anticorpos monoclonais^{7, 6}.

Baseado na identidade e no alinhamento das seqüências de aminoácidos de PspA de diferentes cepas de *S. pneumoniae*, foram observadas 3 famílias distintas, divididas em 6 grupos denominados clados: família 1 constituída de dois clados (1 e

2); família 2 constituída de três clados (3, 4 e 5); família 3 com apenas um clado (6). Dentro de uma mesma família ocorre o reconhecimento dos diferentes clados por anticorpos anti-PspA de forma cruzada. A grande maioria dos *S. pneumoniae* isolados de pacientes são classificados como pertencentes às famílias 1 e 2, ambas com ~50% dos casos, contando a família 3 com apenas ~1% dos casos. A imunização passiva realizada em camundongos com anticorpos anti-PspA, ou a imunização ativa com PspA, tem apresentado um bom nível de proteção após desafio subsequente com pneumococos de diferentes sorotipos⁶. PspA é a única proteína pneumocócica que tem mostrado resposta de proteção contra cepas virulentas de pneumococos em camundongos desafiados com o correspondente a 100 vezes a dose letal (DL 50)⁸.

Os fragmentos do gene da PspA normalmente inseridos em vetores para expressão heteróloga não possuem a informação da proteína inteira, ou seja, eles não possuem a cauda de colina (Figura 1.2). Essa cauda fica ancorada na parede celular do *S. pneumoniae* e por não estar exposta na superfície do microrganismo (Figura 1.3) ela não está acessível ao reconhecimento pelos anticorpos, não sendo então necessária para a produção da resposta imune^{9, 10}.

Figura 1.2: Estrutura da PspA, a barra estreita indica os fragmentos fPspA 1 e 3 clonados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan¹¹.

Figura 1.3: Esquema da estrutura da parede celular do pneumococo e do ancoramento da PspA. A parte vermelha da proteína possui carga eletronegativa e a parte azul eletropositiva¹².

A obtenção e purificação do fragmento da PspA clado 3 (PspA3) permitirá uma nova candidata à vacina de subunidades antipneumocócica com cobertura de ~50% em termos de PspA e que juntamente com a PspA clado 1 (PspA1) abrangeria quase 100% de cobertura para as linhagens da família 1 e 2.

Para a produção de vacinas compostas de proteínas recombinantes há duas principais etapas do processo: a produção de células (cultivo) e, posteriormente, a purificação da proteína de interesse obtida pelo cultivo das células. Procura-se desenvolver um processo simples e eficiente visando obter um maior rendimento do produto de interesse com um menor custo. Apesar de vários estudos tratarem separadamente da produção (cultivo) e da purificação de proteínas recombinantes, estas etapas estão intimamente ligadas, uma vez que há diversos tipos de cultivo, com alta ou baixa densidade celular, e que múltiplos fatores irão interferir diretamente na purificação¹³.

1.1 CULTIVO

O principal objetivo das pesquisas em cultivo de microrganismos, não apenas para produção de vacinas, é maximizar a produtividade volumétrica, ou seja, a quantidade de produto por unidade de volume e por unidade de tempo (g/L.h)¹⁴. A produtividade volumétrica total é o produto da produtividade específica ($\text{g produto/g biomassa.h}$) pela concentração final da biomassa (g biomassa/L). Vários fatores influenciam essas variáveis como: a linhagem bacteriana, modificações genéticas,

escolha de promotores adequados quando se tratam de microrganismos recombinantes, indutores e condições do cultivo.

O estudo de todos esses fatores que englobam desde as etapas de biologia molecular até a engenharia bioquímica tem como finalidade reduzir o consumo de meios de cultura, de insumos e de energia, minimizando assim a geração de resíduos e facilitando os processos de purificação. Paralelamente, busca-se também diminuir o impacto do capital fixo, otimizando as dimensões dos equipamentos utilizados. A obtenção destes parâmetros é consequência de um processo com uma produção elevada, altos rendimentos do produto de interesse e menor geração de subprodutos que possam inibir a produção celular, objetivo dos cultivos em alta densidade celular¹⁵.

E. coli é o procarioto mais utilizado para a síntese de proteínas heterólogas por possuir um sistema bem caracterizado¹⁶ e possibilitar seu crescimento em altas densidades celulares^{15,16}. Diversos trabalhos demonstram a eficiência da produção de proteínas recombinantes ao utilizar esse microrganismo como sistema de expressão em relação a outros sistemas, como no caso da produção de uma vacina contra a malária¹⁷. Uma proteína sintetizada para esta vacina com 21 epítopos apresentou baixo rendimento no sistema de expressão em baculovirus (0,1 – 1,0 g/L)¹⁸, porém, em *E. coli* obteve-se 3 vezes mais proteína¹⁹.

Visando a obtenção de proteínas recombinantes e outros produtos em cultivos de alta densidade dois principais problemas devem ser evitados: 1) inibição por substrato, tais como glicose (50 g/L), amônia (3 g/L), ferro (1,15 g/L) e 2) inibição por subprodutos metabólicos como acetato, propionato, lactato, etanol, etc²⁰.

Para evitar a inibição por substrato e a formação de metabólitos ácidos, os cultivos são realizados em meios definidos ou semi-definidos, com concentrações dos substratos inferiores às inibitórias e, especialmente, controlando a concentração da fonte de carbono^{14,21}. Para alcançar essas condições em geral são utilizados cultivos descontínuos alimentados, também chamados de bateladas alimentadas, havendo inúmeras estratégias de alimentação. No caso de *E. coli* recombinante, os cultivos são feitos em basicamente três fases: 1) cultivo descontínuo ou fase batelada - até que a fonte de carbono inicialmente adicionada ao meio seja consumida, com $\mu = \mu_{\max}$ (velocidade específica de crescimento, h^{-1}); 2) alimentação da fonte de carbono de forma controlada para evitar o acúmulo de acetato, com

$\mu < \mu_{\max}$; e 3) adição do agente indutor para a síntese da proteína recombinante, com $\mu < \mu_{\max}$, fase essa que representa um estresse metabólico^{22, 23}.

As estratégias de alimentação mais empregadas são: 1) alimentação constante, μ decrescente, 2) alimentação linear, μ compensado (crescente e decrescente) e 3) alimentação exponencial, $\mu_{\text{set}} < \mu_{\text{crítico}} < \mu_{\max}$, 4) alimentação através do controle da concentração de oxigênio dissolvido (DO-stat) ou do pH (pH-stat). Todas estas estratégias buscam manter substrato limitante em uma concentração suficiente para o crescimento bacteriano evitando que ocorra a formação de subprodutos inibidores¹⁵.

Além disso, quando se objetiva a produção de proteína recombinante intracelular em *E. coli*, a fase de indução é parte fundamental que pode determinar maior ou menor produtividade, dependendo de fatores como a concentração do indutor e a razão indutor/células²⁴. Em laboratório, normalmente utiliza-se o Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) como indutor para as construções derivadas do operon da lactose (Figura 1.4). Porém, se por um lado ele é um análogo estrutural que não é consumido durante o processo e independe de transportador para entrar nas células, por outro lado o IPTG apresenta duas desvantagens para um processo industrial: é caro e tóxico. A alternativa ao uso do IPTG é a própria lactose, que por sua vez apresenta a desvantagem de ser consumida durante o processo e depender da presença da permease na superfície das bactérias²⁵.

Figura 1.4: Sistema de controle do operon Lac. A) no cromossomo da bactéria com a produção de permease²⁶; B) no sistema pET com a indução da expressão do gene de interesse presente no vetor²⁷.

1.2 PURIFICAÇÃO

A purificação, também chamada de “downstream processing”, acontece logo após a obtenção do “produto bruto”, o qual é processado até obter-se o grau de pureza requerido para o seu uso, buscando-se maximizar sua recuperação e minimizar seu custo. Além da pureza relativa, os produtos biotecnológicos apresentam requerimentos em relação à quantidade de impurezas como ácidos nucleicos, pirógenos, limites relativos à “cor”, ausência de atividades enzimáticas nocivas ao produto e ao seu uso (ex: proteases, atividade hemolítica). Caso o produto apresente similar, estas normas são fornecidas pelo FDA, OMS e/ou pelas farmacopéias. O custo da purificação de um produto biotecnológico varia entre 20 a 80% do total do processo²⁸.

As estratégias para desenvolvimento de processos de purificação baseiam-se nas diferenças entre as propriedades físico-químicas do produto de nosso interesse e as das impurezas, diferenças como: localização (intra ou extracelular), massa molecular, carga elétrica, hidrofobicidade, solubilidade, afinidade por ligantes específicos. O processo de purificação das proteínas para uso farmacêutico deve ter no mínimo duas etapas, baseadas em propriedades diferentes, sempre tendo em mente a possibilidade de os métodos usados serem facilmente amplificáveis e

baratos, todos os materiais e os equipamentos devem apresentar estabilidade e resistência aos processos de limpeza e sanitização *in situ* (“CIP” cleaning in place e “SIP” sanitization in place)²⁹.

Atualmente, a produção de proteínas recombinantes, principalmente para uso terapêutico, vem sendo extensivamente estudada^{30, 31}. Devido à exigência de um alto grau de pureza (acima de 95%) e por ser geralmente um produto intracelular, há uma enorme gama de metodologias que podem ser utilizadas para a purificação de proteínas recombinantes na dependência da análise prévia das características físico-químicas da proteína de interesse, a escolha de um processo pode ser mais bem direcionada^{32, 33}.

Em linhas gerais, as etapas de purificação de uma proteína recombinante compreendem: a) separação das células do meio de cultura por centrifugação convencional ou contínua, microfiltração tangencial ou convencional; b) extração das proteínas intracelulares através da desintegração das bactérias por homogeneizador contínuo de alta pressão ou lise química; c) clarificação do homogenato, eliminação de material particulado e insolúvel por centrifugação ou filtração convencional/tangencial ou cromatografias de leito expandido; d) purificação primária, nesta etapa são eliminadas as maiores quantidades das impurezas com propriedades físico-químicas que diferem significativamente das propriedades da molécula de interesse, precipitações e cromatografias de adsorção, como troca iônica, hidrofóbica e afinidade, que são as técnicas mais usadas; e) purificação de alta resolução, separação de impurezas com propriedades físico-químicas muito semelhantes às do produto, e para isso as técnicas normalmente utilizadas são precipitações seletivas, cromatografia de filtração em gel e cromatografia de afinidade^{28, 33, 34}.

A cromatografia líquida é um método bastante utilizado na purificação de proteínas para uso farmacêutico, que requer um produto altamente puro (> 95%). A investigação de características da proteína a ser purificada para definir a cromatografia a ser utilizada é essencial para se garantir alto rendimento do produto. A cromatografia de troca iônica é uma das mais utilizadas por ser de baixo custo e de fácil operação, ela baseia-se em interações eletrostáticas como princípio de separação^{28, 33}.

A cromatografia por afinidade também é muito utilizada, apesar de ter custo mais elevado, ela é altamente específica levando a um alto fator de purificação. Um

exemplo clássico desse tipo de cromatografia é a afinidade por metais realizada em resina quelante, utilizada para separar proteínas com cauda de histidina que apresentam alta afinidade por metais³⁵.

A cromatografia de exclusão molecular, também chamada de filtração molecular ou permeação em gel, é a cromatografia mais tradicional, separando as moléculas pela sua massa molar. Desde a descoberta do gel de Sephadex, em 1959, essa cromatografia vem sendo extensivamente usada³³.

Outro exemplo de cromatografia líquida é a de interação hidrofóbica. Nesta cromatografia a fase estacionária é formada por grupamentos apolares e as soluções protéicas quando em altas concentrações salinas expõem seus grupamentos hidrofóbicos, sendo assim adsorvidas pela resina³³.

Portanto, diferentes estratégias de purificação podem ser montadas a partir da caracterização físico-química das proteínas em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Desenvolver um processo de produção e purificação de rPspA3 em *E. coli* BL21(DE3) que seja economicamente viável e escalonável.

2.2 ESPECÍFICOS

- Aperfeiçoar o processo de produção em alta densidade de *E. coli* utilizando cultivo descontínuo alimentado e avaliar duas fontes de carbono, glicose e glicerol;
- Desenvolver um processo de purificação escalonável que gere uma relação custo-benefício viável em uma produção em alta escala, analisar a lise por processo mecânico, comparar etapas de clarificação por centrifugação, micro e ultrafiltração tangencial e definir as condições de adsorção e dessorção das cromatografias de troca aniônica, afinidade, permeação em gel, hidrofóbica e troca catiônica e, posteriormente, a melhor seqüência das etapas cromatográficas escolhidas;
- Comparar a purificação de proteínas provenientes do cultivo em alta densidade com glicose e com glicerol como fonte de carbono, após a definição das etapas de purificação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR

A clonagem do gene *fpspA3* foi realizada pela Dra. Eliane Miyaji, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, no vetor pET37b+ (Departament of Microbial Genetics, National Institute of Genetics Shizuoka-ken, Japan). Este vetor apresenta marca de resistência ao antibiótico kanamicina (kan), o promotor T7 (induzido por IPTG ou lactose), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG de início de tradução, cauda de 6 histidinas, sinal de terminação de transcrição “T7 terminal” e gene do repressor LacI. A kanamicina tem a vantagem de ser aceita para a produção de biofármacos e não ser degradada no meio durante o cultivo.

3.2 ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO rfPspA3

A sequência do fragmento recombinante da PspA3 a ser produzido foi analisada através de um programa da rede mundial de Internet³⁶ de fácil acesso, o qual forneceu todas as características do fragmento recombinante necessárias para o desenvolvimento deste trabalho como ponto isoelétrico (pI), número e composição de aminoácidos, massa molecular, entre outras usadas para traçar um planejamento de purificação.

Como mostra a Figura 3.1, em cada etapa foi feito um estudo para desenvolver um processo produtivo eficiente e econômico que seja viável em uma produção de maior escala.

Figura 3.1: Etapas do processo de produção e purificação do fragmento recombinante da PspA3.

3.3 PRODUÇÃO DO *fPspA3* EM *E. coli* BL21 (DE3) – UPSTREAM

3.3.1 Ensaios em frascos agitados

A verificação da expressão do gene, a seleção do clone produtor e a avaliação da síntese da proteína de interesse em meio quimicamente definido foram realizados em frascos agitados.

Foram empregados dois meios: meio complexo Luria Bertani, LB (Tabela 3.1) e meio quimicamente definido para alta densidade celular³⁷ (MQD - Tabela 3.2), ambos contendo 25 mg/L de kan.

Tabela 3.1: Composição do meio complexo LB.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	5,0
Triptona	10,0
NaCl	10,0

Tabela 3.2: Composição do meio quimicamente definido (MQD) para ensaios em frascos.

Componentes	Concentração
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/L
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
Ác. Cítrico.H ₂ O	1,7 g/L
Fe(III)citrato	100,8 mg/L
COCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	15,0 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	1,5 mg/L
H ₃ BO ₃	3 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,1 mg/L
Zn(CH ₃ COOH) ₂ .H ₂ O	33,8 mg/L
HCl 6N	4,15 mL
EDTA	14,1 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2g/L
Tiamina	4,5mg/mL
Kanamicina	25mg/mL
pH	6,3
Fonte de Carbono*	Glicose 10,0 g/L
	Glicerol 20,0 g/L

*Utilizada somente uma fonte de carbono em cada ensaio.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 300 mL com 30 mL de meio. Uma colônia foi isolada de uma placa de LBkan/ágar e semeada em meio líquido. Foi utilizado o agitador orbital (Innova 44, New Brunswick) para controlar a agitação e a temperatura do meio em 200 rpm e 30 °C, respectivamente. A indução foi realizada quando se obteve uma densidade ótica a 600nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 1,0 pela adição 1,0 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e o cultivo prosseguiu por mais 4 horas. Amostras de 2 mL foram retiradas de hora em hora e utilizadas nas análises de crescimento celular pela turbidez em DO_{600nm} , estabilidade do plasmídeo pela porcentagem de colônias obtidas resistentes à kanamicina e síntese da proteína de interesse averiguada por eletroforese SDS-PAGE (métodos descritos no tópico 3.5).

3.3.2 Preparo do estoque congelado

Após o teste de expressão do gene foi feito um estoque de células da colônia escolhida. A produção de células estoque foi realizada nas condições descritas no item 3.3.1 com meio MQD e glicose como fonte de carbono. Como crioprotetor foi adicionado ao meio 30% v/v de glicerol. As células foram estocadas à -80 °C.

3.3.3 Preparo de inóculo

Antes do cultivo em biorreator, foram preparadas duas etapas de crescimento celular em frascos agitados chamadas de pré-inóculo e inóculo. Essas etapas foram feitas utilizando meio MQD com a mesma fonte de carbono utilizada nos biorreatores.

O cultivo do pré-inóculo foi realizado em um volume total de 10 mL em frascos de 100 mL com inoculação de uma colônia obtida de placas LBkan/ágar que foram estriadas com a suspensão de células do estoque congelado e incubadas por 24 horas à 37 °C. Posteriormente, após o crescimento até ~1,2 g de massa seca/L, uma alíquota de 2 mL do pré-inóculo foi transferida para um frasco de 2000 mL com 200 mL do mesmo meio e a cultura foi incubada à 37 °C até que se obtivesse uma concentração celular entre 1,2 e 2,0 g de massa seca/L. Foi utilizado o agitador orbital (Innova 44, New Brunswick) para controlar a agitação do pré-inóculo e inóculo

em 200 rpm. Os cultivos em reator foram inoculados com um volume de inoculo suficiente para se obter $\sim 0,04$ g de massa seca/L ($DO_{600nm} \sim 0,1$).

3.3.4 Cultivo em biorreator

3.3.4.1 Descontínuo

O meio de cultura quimicamente definido (MQD) foi empregado para os ensaios em biorreator de 5,0 litros Bioflo 2000 (New Brunswick), onde os cultivos tiveram controle automático de pH em 6,7³⁷ pela adição de hidróxido de amônio 24%v/v, controle automático da concentração de oxigênio dissolvido em 30%³⁷ da saturação pelo aumento da agitação e pela adição de oxigênio puro ao gás de entrada quando necessário. Como antiespumante foi empregado polipropilenoglicol (PPG). Os parâmetros cinéticos foram calculados graficamente através dos dados obtidos (item 3.5.1).

Após o total consumo da fonte de carbono, que foi identificado pelo aumento abrupto da concentração de O_2 no reator, a indução foi realizada pela adição de 0,1 mM de IPTG, seguida de 20 g/L de lactose²⁵.

Assim como em frascos agitados, foram feitas as análises da produção de proteína por SDS-PAGE, além dos carboidratos e metabólitos ácidos que foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), métodos descritos no tópico 3.5.

3.3.4.2 Descontínuo Alimentado

Obtidos os dados da cinética do cultivo descontínuo, foram feitos cultivos utilizando a estratégia de alimentação exponencial da fonte de carbono para se obter alta densidade celular. Para isso utilizou-se como primeira etapa a fase descontínua e após o total consumo da fonte de carbono iniciou-se a alimentação do biorreator segundo a Equação 3.1³⁷ e o controle do pH foi ajustado para 6,9³⁷.

$$m_S(t) = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_{set} + m \right] \cdot V_0 \cdot X_0 \cdot e^{\mu_{set} \cdot (t-t_0)} \quad \text{Equação 3.1}^{37}$$

Em que: $m_S(t)$ =Fluxo mássico de alimentação de substrato em função do tempo (g/h); V_0 =volume do reator no início da alimentação (L); X_0 =concentração celular no início da alimentação; μ_{set} =velocidade específica de crescimento celular desejada durante a alimentação (h^{-1}); m =coeficiente de manutenção celular (0,025 g/g.h); $Y_{x/s}$ =fator de conversão de substrato em células (g massa seca/g substrato); t =tempo em um dado instante (h) e t_0 =tempo no início da alimentação (h).

Assim como no cultivo descontínuo, o meio de cultura utilizado também foi o MQD, com volume inicial de 3,5 L para que após a alimentação e a indução se atinja um volume final < 5 L. A indução foi realizada em um período de 4h pela adição de 0,5 mM de IPTG e 20 g/L de lactose. A Tabela 3.3 apresenta a composição do meio de alimentação.

Tabela 3.3: Composição do meio de alimentação para os cultivos descontínuos alimentados³⁷.

Componentes		Concentração
Fe(III)citrato		40,0 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O		4,0 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O		23,5 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O		2,3 mg/L
H ₃ BO ₃		4,7 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		4,0 mg/L
Zn(CH ₃ COOH) ₂ .H ₂ O		16,0 mg/L
HCl 6N		4,15 mL
EDTA		13,0 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O		20,0 g/L
Tiamina		4,5 mg/mL
Kanamicina		25 mg/mL
Fonte de	Glicose	600,0 g/L
Carbono*	Glicerol	696,0 g/L

*Utilizada somente uma fonte de carbono em cada ensaio

3.3.4.3 Estudo da relação IPTG/ células/ tempo de indução

Para definir a relação IPTG/ células/ tempo de indução que levasse a maior produção de rfpSpA3 em cultivo de alta densidade celular foram propostos dois testes, um variando a concentração celular com a concentração de IPTG fixa em 1,0 mM e outro variando a concentração de IPTG com a concentração celular

fixa em 56 g/L. Nos dois testes foram analisadas amostras de 4 e 12 horas de indução. Os testes foram feitos em frascos agitados de 300 mL com 24 mL de meio a 30 °C e 250 rpm.

- **Variação da concentração celular (concentração fixa de IPTG)**

Foram retirados do reator 48 mL da suspensão celular antes da indução ($DO_{600nm} \sim 140$), as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio MQD contendo 16 g/L de lactose e 1,0 mM de IPTG. Foram feitas diluições seriadas da suspensão celular obtida utilizando meio 2x concentrado, resultando em suspensões com os seguintes valores de DO_{600nm} : 140; 70; 35; 17,5 e 8,75.

A análise da produção de rFPspA3 em cada condição foi feita a partir da densitometria das bandas obtidas em eletroforese SDS-PAGE, empregando-se duas formas de aplicação das amostras de 4 e 12 h de indução: 1) DO_{600nm} fixada em 5,0 e 2) volume fixo da suspensão celular (2 μ L).

- **Variação da concentração de IPTG (concentração celular fixa)**

Foram adicionados aos frascos 6 mL de meio MQD contendo 80 g/L de lactose, posteriormente foi adicionado 18 mL do meio do cultivo com DO_{600nm} a 140 resultando em uma concentração final de 16 g/L de lactose e DO_{600nm} igual a 105. A suspensão obtida foi dividida em 6 amostras às quais foram adicionadas as seguintes concentrações de IPTG: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mM. A produção de rFPspA3 foi avaliada após 4 e 12h de indução.

As análises foram feitas a partir da densitometria das bandas obtidas em eletroforese SDS-PAGE aplicando-se uma quantidade de células correspondente a DO_{600nm} igual 5,0 das amostras.

3.4 ETAPAS DE PURIFICAÇÃO PROTÉICA – DOWNSTREAM

3.4.1 Separação celular do meio fermentado

Após o cultivo, a suspensão celular obtida foi centrifugada a uma velocidade de 17.969 g por 30 min a 4 °C para a separação das células do meio fermentado. A massa celular foi congelada e o meio descartado, pois se trata de uma proteína solúvel intracelular.

3.4.2 Lise Celular

Em uma relação de 100 g de massa celular úmida para 1,0 L de tampão, as células foram ressuspensas em tampão de lise (25 mM Tris pH 8,0 + 0,1% de Triton X-100) com 1,0 mM de Fenilmetanosulfonilfluorídrico (PMSF – inibidor de protease). Para ajuste do pH do tampão de lise para 8,0, quando necessário, utilizou-se ácido acético glacial. Obteve-se uma suspensão homogênea em um mixer (CAT X520), que foi posteriormente lisada em um homogeneizador contínuo de alta pressão APV-Gauling 60 (Figura 3.2) em 10 ciclos de 1 minuto a 600 bar de pressão. A temperatura da suspensão foi controlada para que não ultrapasse 30 °C, obtendo-se assim o homogenato bruto.

A lise foi realizada com amostras provenientes dos cultivos em alta densidade com glicose e com glicerol como fontes de carbono. Em cada uma destas amostras foram realizadas 3 diferentes análises durante o processo de lise. Duas análises foram feitas para acompanhar a integridade das células: leitura da DO_{600nm} em espectrofotômetro Hitachi U-1800 e plaqueamento da amostra em meio LB/ágar com Kanamicina para leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Para definir o tempo necessário para liberação completa da rfPspA3, foi determinada a concentração de proteínas totais e rfPspA3 através da densitometria dos géis de eletroforese SDS-PAGE. Amostras foram recolhidas a cada minuto, durante 10 minutos, sendo o tempo inicial considerado após a obtenção da suspensão homogênea no mixer. Para a análise protéica, foi recolhido 1 mL da suspensão bacteriana, centrifugado por 60 minutos à 20817 g. O sobrenadante foi separado do precipitado e utilizado para a quantificação protéica e para a eletroforese SDS-PAGE

com 10 µg de proteínas totais. Posteriormente, foi determinada a concentração de rfPspA3 por densitometria dos géis de eletroforese obtidos.

Figura 3.2: Homogeneizador contínuo de alta pressão APV-Gauling utilizado para lise celular de *E. coli*.

3.4.3 Teste de Solubilidade do rfPspA3

Após a lise celular, 1,0 mL do homogenato bruto foi centrifugado à 20.817 g por 60 min à 4 °C. As amostras do pellet e sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE. O pellet foi ressuscitado diretamente em 200 µL de tampão de amostra para eletroforese, sendo aplicados 18 µL ao gel. Do sobrenadante obtido foram aplicadas 10 µg de proteínas totais ao gel de eletroforese.

3.4.4 Clarificação do Homogenato

Três testes para clarificação do homogenato bruto foram realizados: centrifugação, microfiltração em fibra-oca de poro 0,1 µm e ultrafiltração em fibra-oca de 750 kDa. A amostra obtida da lise celular (homogenato) foi dividida em 3 partes iguais para a realização destes testes.

➤ 1º Centrifugação (método tradicional):

O homogenato bruto foi centrifugado durante 2 h a uma velocidade de 17.696 g a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado do precipitado e filtrado à vácuo em membrana de poro 0,45 µm para a retirada de precipitados que

pudessem obstruir a passagem da amostra na coluna cromatográfica. Esta fração foi denominada clarificado centrifugado.

- 2º Microfiltração em fibra-oca de poliestersulfona (GE Modelo: CFP-1-E-5A) de poro 0,1 μm e 1200 cm^2 de área filtrante:

O homogenato bruto foi microfiltrado até que a amostra retida ficasse 3 vezes concentrada. Esse concentrado foi lavado com 6 vezes o seu volume com tampão acetato 25mM pH 6,0. A pressão transmembrana foi controlada em aproximadamente 5 psi durante o processo. Esta fração foi denominada clarificado microfiltrado.

- 3º Ultrafiltração em fibra-oca de poliestersulfona (GE Modelo: UFP-750-E-4X2MA) de poro 750 kDa e 850 cm^2 de área de filtrante:

O homogenato bruto foi concentrado e diafiltrado da mesma maneira que o descrito para a fibra-oca de 0,1 μm . Esta fração foi denominada clarificado ultrafiltrado.

3.4.5 Teste de precipitação do rPspA3 em diferentes pH

3.4.5.1 Precipitação do homogenato

O teste foi feito no intervalo de pH de 3,0 até 8,0, variando 0,5 ponto de pH. O homogenato bruto estava com pH inicial de 7,3. Para aumentar o valor do pH utilizou-se solução de NaOH 5 M e para abaixar, ácido acético glacial PA. Foram obtidas 11 amostras com os seguintes pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Para $\text{pH} \leq 6,0$ utilizou-se tampão acetato 25 mM e acima desse valor, tampão Tris 25 mM. Após o ajuste de pH, as amostras ficaram 30 min em repouso, as que apresentaram turbidez devido a precipitação foram centrifugadas à 20.817 g por 90 min. O precipitado foi ressuspenso em uma solução de tampão Tris 25 mM pH 8,0 com uréia 6 M. Foram medidas as proteínas totais e, tanto do precipitado como do sobrenadante, foram aplicadas 10 μg em SDS-PAGE para análise.

3.4.5.2 Precipitação isoelétrica da fração de eluição da segunda cromatografia

Foi realizado outro teste em diferentes pH: precipitação por ponto isoelétrico do rPspA3. Foi utilizada amostra após purificação em duas etapas de cromatografia,

com aproximadamente 80% de pureza desta proteína, no intervalo de pH de 3,0 à 4,5 variando em 0,5 e o teste foi realizado tal qual o descrito no item anterior 3.4.5.1. As mesmas análises foram realizadas, porém com 5 µg de proteínas totais aplicadas ao gel de eletroforese SDS-PAGE.

3.4.6 Cromatografia: resinas, colunas e etapas das cromatografias estudadas

As seguintes resinas foram utilizadas:

- IMAC-Sepharose (Immobilized Metal Affinity Chromatography): resina de afinidade por metais.
- Phenyl-Sepharose High-Sub Fast Flow: resina de interação hidrofóbica com o grupamento apolar fenil ligado a matriz.
- Q-Sepharose Fast Flow: resina de troca iônica com carga positiva;
- Sephacryl S-200 HR: resina de exclusão molecular (gel filtração) com poder de resolução para proteínas com massa molar entre 5.000 e 250.000 kDa.
- SP-Sepharose Fast Flow: resina de troca iônica com carga negativa.

As seguintes colunas foram utilizadas:

- XK16: 1,6 cm de diâmetro com 10 e 20 mL de resina e 5,5 e 11 cm de altura, respectivamente, para o estudo das condições de lavagem, eluição e limpeza.
- XK 26: 2,6 cm de diâmetro com 75 mL de resina e 15 cm de altura, para estudo da última etapa cromatográfica (SP-Sepharose).
- XK50: 5 cm de diâmetro com 500 mL de resina e 25 cm de altura, para estudo da sequência cromatográfica.

Todas as resinas e colunas foram obtidas da GE HealthCare/Amersham Pharmacia Biotech. As características de cada resina, como máxima pressão, fluxo, entre outros estão nos Anexos A até E.

Com exceção da cromatografia em filtração em gel, as purificações cromatográficas em coluna empacotada foram realizadas seguindo as etapas descritas abaixo:

1. **Equilíbrio:** o equilíbrio da coluna foi feito nas condições de pH e condutividade que proporcionassem a máxima adsorção da proteína de interesse e mínima adsorção de impurezas na resina. O pH e

condutividade da amostra foram ajustados nos valores do tampão de equilíbrio.

2. **Lavagem:** nesta etapa utilizou-se a concentração mínima de eluente para retirar impurezas adsorvidas pela resina sem eluir a proteína de interesse.
3. **Eluição:** foi escolhido um tampão que permitisse a recuperação total da proteína de interesse adsorvida, mas que permitisse que impurezas que tenham maior afinidade pela resina permanecessem adsorvidas.
4. **Limpeza:** nesta etapa utilizou-se uma concentração de saturação do eluente para a retirada de todas as impurezas que tivessem uma alta afinidade pela resina.
5. **Regeneração:** esta última etapa pode ser feita separadamente ou junto com a limpeza. No caso da IMAC carregada com Ni^{+2} , utilizou-se EDTA para a retirada do Ni^{+2} após o processo. No caso da resina Q-Sepharose foi utilizado NaOH 0,1 M.

3.4.7 Testes prévios de adsorção em tubos com as resinas

3.4.7.1 Amostras

Phenyl-Sepharose: esta resina foi testada como uma opção de terceira etapa cromatográfica. Assim, as amostras utilizadas foram provenientes da eluição da segunda etapa cromatográfica. As amostras foram adicionadas nas resinas, após ajuste da condutividade de acordo com o tampão utilizado para equilíbrio, em uma proporção de 1,0 mL de resina para 5,0 mL de amostra.

Q-Sepharose: as amostras do sobrenadante do teste de precipitação do homogenato em diferentes pH (item 3.4.5.1) foram utilizadas para adsorção em resina de troca aniônica em tubos. As amostras foram centrifugadas 2 horas a 20.817 g e adicionadas nas resinas, após ajuste da condutividade de acordo com o tampão utilizado para equilíbrio, em uma proporção de 1,0 mL de resina para 5,0 mL de amostra.

SP-Sepharose: esta resina também foi estudada como uma opção de terceira etapa cromatográfica, assim, as amostras utilizadas foram provenientes da eluição da segunda etapa cromatográfica. Foram utilizadas as amostras do teste de

precipitação isoelétrica em diferentes pH (item 3.4.5.2), até pH 6,5. Devido à alta concentração salina, as amostras foram dialisadas e, posteriormente, adicionadas às resinas, após ajuste de condutividade de acordo com o tampão utilizado para equilíbrio, em uma proporção de 1,0 mL de resina para 5,0 mL de amostra.

3.4.7.2 Condições cromatográficas

Phenyl-Sepharose: a resina foi previamente equilibrada com tampão Tris 25 mM pH de 7,5 à 8,0³⁸, nas concentrações de 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e também 1,0; 2,0 e 3,0 M de NaCl. Após 30 min de contato da amostra com a resina sob agitação, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes, correspondentes à fração não-adsorvida, foi submetido à eletroforese.

Q-Sepharose: a resina foi previamente equilibrada com tampão acetato 25 mM + 10 mM de NaCl nos pH: 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, ou com tampão Tris 25 mM + 10 mM de NaCl nos pH: 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Após 30 min de contato da amostra com a resina, sob agitação, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes, correspondentes à fração não-adsorvida, foi submetido à eletroforese.

Uma vez definido o pH no qual toda rPspA3 foi adsorvida, foi testada a influência da condutividade sobre a adsorção seletiva da proteína. Os testes foram feitos da mesma forma que o descrito acima, mas a resina foi equilibrada com tampão adequado contendo uma concentração de NaCl que variou de 0 a 500 mM. O homogenato teve seu pH ajustado, e NaCl foi adicionado para obterem-se concentrações variando de 0-500 mM, adicionando posteriormente as amostras à resina equilibrada com o respectivo tampão. Após 30 min de contato sob agitação, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi dialisado e aplicado à eletroforese.

SP-Seharose: o teste realizado para esta resina foi semelhante ao feito para a resina Q-Sepharose nos valores de pH de 5,0 à 6,5 com tampão Histidina 20 mM. Após a definição do pH de adsorção, foram testadas as concentrações de NaCl de 0,0 a 100 mM.

3.4.8 Cromatografia em coluna empacotada

As etapas de cromatografia em coluna foram operadas pelo Äkta Explorer (Amersham Pharmacia Biotech) (Figura 3.3) em volumes de colunas pré-definidos de acordo com a concentração de proteínas totais das amostras a serem separadas. Utilizou-se fluxo linear de 150 cm/h, o qual variou em mL/min de acordo com a área da coluna utilizada. A Equação 3.2 mostra o cálculo de transformação do fluxo linear para volumétrico.

$$FV = \frac{FL * \pi * R^2}{60} \quad \text{Equação 3.2}$$

Em que: FV = fluxo volumétrico (mL/min); FL = fluxo linear (cm/h) e R = raio da coluna (cm).

Figura 3.3: Estação de trabalho Äkta Explorer da Amersham Pharmacia Biotech munido de 2 bombas. Na figura há o computador que monitora e controla o sistema através do software Unicorn 3.21 e a coluna XK 26 empacotada com 75 mL da resina SP-Sepharose Fast-Flow.

3.4.8.1 Estabelecimento das condições de dessorção em coluna empacotada

Para definir as condições de lavagem e eluição foi utilizada a coluna XK16 com 10 mL de volume de coluna para a resina Q-Sepharose, 20 mL para IMAC-Sepharose e 15 mL para SP-Sepharose. Foram determinadas as melhores condições para retirada de impurezas nas frações de lavagem e limpeza e máxima recuperação da proteína de interesse na fração de eluição. As amostras utilizadas

foram as mesmas citadas no item 3.4.7.1 e a adsorção foi realizada nas condições definidas pelos testes em tubos detalhados no item 3.4.7.2, para cada resina, respectivamente.

A resina IMAC-Sepharose foi carregada com NiSO_4 antes de ser utilizada. O eluente utilizado para esta resina foi o imidazol e o pH utilizado foi 8,0. Para a condição de lavagem foram testadas as concentrações de 7, 10, 15 e 20 mM do eluente e 150, 200 e 250 mM para a eluição. Foram adicionados 300 mM de NaCl aos tampões para evitar ligações inespecíficas ao metal ligado na resina.

Para a Phenyl-Sepharose foram utilizados como eluentes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaCl, com as seguintes concentrações para eluição descontínua : 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,1 e 0,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,0 M de NaCl. Posteriormente, foi realizado outro teste para ajustar os valores de adsorção e dessorção na tentativa de evitar perda na fração não-adsorvida e separar algumas impuras que estavam sendo eluídas juntas com o rPspA3. Neste terceiro teste foi utilizado NaCl e a adsorção foi feita com 2,5 M e testes de dessorção foram realizados nas concentrações de 1,5; 1,0; 0,5 e 0,0 M. As frações de limpeza foram obtidas com tampão Tris 25 mM pH 8,0.

Para a Q-Sepharose, resina de troca-aniônica, utilizou-se NaCl como eluente. Os valores de pH e condutividade ideais para adsorção foram previamente determinados nos testes em tubos descritos no item 3.4.7.2. O estudo das condições para lavagem foi realizado com as concentrações de 75, 100 e 125 mM do eluente e para eluição do rPspA3, concentrações de 250, 275 e 300 mM de NaCl.

Para a cromatografia em SP-Sepharose foi investigada a eluição por aumento de condutividade (com adição de NaCl) e por mudança de pH. A adsorção foi previamente definida (item 3.4.7.2) e em seguida foram testadas as concentrações de 70, 100 e 150 mM de NaCl em pH 6,0 e os seguintes pH para eluição: 7,0; 7,5 e 8,0 com 10 mM de NaCl. Posteriormente, foram realizados testes de dessorção em pH 7,0 com concentrações de 40, 60, 80 e 100 mM de NaCl, e os resultados foram comparados aos obtidos pela eluição com diferentes concentrações de Tampão fosfato pH 7,0 (20, 30, 40 e 50 mM).

3.4.8.2 Estabelecimento da sequência das etapas cromatográficas

Após a definição das condições de cada cromatografia visando aumentar a eficiência do processo, maximizando o rendimento e pureza em cada etapa cromatográfica, tal como descrito nos item anterior (3.4.8.1), a melhor sequência cromatográfica foi avaliada para purificar um volume maior de amostra.

As resinas Q-Sepharose e IMAC-Sepharose foram pré-determinadas como etapas cromatográficas, assim experimentos foram realizados com elas nas duas seqüências possíveis utilizando 250 mL e 500 mL de volume de coluna, respectivamente, em coluna XK50.

Com a necessidade de uma terceira etapa, as outras três resinas já citadas (Phenyl-Sepharose, Sephacryl S-200 e SP-Sepharose) foram estudadas para desenvolver o melhor processo de purificação.

O teste com a resina Sephacryl S-200 High Resolution (HR) foi realizado em coluna pré-empacotada com 320 mL de volume de coluna. O tampão utilizado foi fosfato de sódio 50 mM com 150 mM de NaCl. O fluxo foi de 1,3 mL/min e introduzido no máximo 5% do volume de amostra em relação ao volume de coluna (Anexo A). A amostra foi primeiramente concentrada e diafiltrada contra o tampão de corrida em membrana Pellicon XL Biomax 5 da Millipore de 5 Kda de poro em Lab Scale TFF System da Millipore, com pressão transmembrana de 20 psi (30 psi na entrada e 10 psi na saída), resultando em uma solução com concentração protéica de 6,1 mg/mL, que foi aplicada à cromatografia.

A cromatografia em SP-Sepharose foi realizada nesta etapa com 75 mL de volume de coluna nas condições determinadas nos testes de adsorção em tubos (item 3.4.7.2) e dessorção (item 3.4.8.1).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Cálculo dos parâmetros de cultivo

A máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foram calculados graficamente através dos dados obtidos no cultivo descontínuo pelo software Microsoft Excel. Para $\mu_{\text{máx}}$ foi feita uma linearização dos pontos da fase exponencial de crescimento celular, sendo o coeficiente angular desta linearização o valor da velocidade específica e, para o $Y_{X/S}$, foi montada uma curva de concentração de células versus concentração de substrato, sendo o coeficiente angular desta curva o valor deste fator. Estes parâmetros foram usados para desenhar a estratégia de alimentação do biorreator.

Foi calculada também a produtividade celular através da Equação 3.3.

$$P = \frac{PV}{T} \quad \text{Equação 3.3}$$

Em que: P = produtividade em g/L.h; PV = produção celular volumétrica em g/L e T = tempo total do processo de produção em h.

3.5.2 Determinação da relação massa seca x $DO_{600\text{nm}}$ de suspensões celulares

A leitura de suspensões celulares foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U-1800. A leitura foi feita na faixa de 0,100 a 0,500 no comprimento de onda 600 nm. A amostra foi diluída em NaCl 0,85% sempre que necessário para que a leitura caísse nessa faixa e a solução de 0,85% de NaCl foi empregada como branco.

Para determinação da massa celular seca, durante os cultivos em reator foi coletado um volume suficiente de células quando a $DO_{600\text{nm}}$ estava em torno de 40. A partir desta suspensão foram preparadas diferentes diluições. Os valores de $DO_{600\text{nm}}$ das suspensões obtidas foram lidos, 10 mL foram centrifugados a 17 800 g por 60 minutos e o sobrenadante descartado. As células presentes no pellet foram secas em tubos previamente pesados, a 60 °C até que se obtivesse massa constante. A concentração em g/L da suspensão colocada em cada tubo foi determinada pela Equação 3.3. Foi construído um gráfico de $DO_{600\text{nm}}$ versus

concentração celular em g/L, cujo coeficiente angular foi usado para converter a leitura de DO_{600nm} em massa seca (g/L).

$$MS = \frac{Mtc - Mtv}{V}$$

Equação 3.3

Em que: MS é a massa celular seca em g/L; Mtc é a massa do tubo contendo o pellet bacteriano em g; Mtv é a massa do tubo vazio em g; V é o volume em L.

3.5.3 Determinação da concentração de glicose, glicerol e ácido acético

As concentrações de glicose, glicerol e ácido acético nas amostras dos cultivos foram determinadas por HPLC (Shimadzu). Foi utilizada para essas análises a coluna Aminex HPX-87H (Biorad), fase móvel H_2SO_4 5mM, temperatura de 60 °C e vazão de 0,6 mL/min em 30 minutos de corrida para cada amostra. Os detectores utilizados foram Índice de Refração (RID) para glicose e glicerol e ultravioleta em 210 nm para ácido acético.

3.5.4 Determinação da estabilidade do plasmídeo

A estabilidade foi determinada em diferentes tempos do cultivo. A amostra da suspensão celular retirada do reator foi diluída adequadamente em salina (NaCl 0,85%) e 100 μ L foi semeado para uma placa LB/ágar sem antibiótico. Após 24h, repicaram-se 70 colônias, ou o número de colônias que cresceram, para uma placa com 25 mg/L de kanamicina e para outra placa sem kanamicina (controle), as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Calculou-se então, em porcentagem, a quantidade de colônias que cresceram na placa com o antibiótico em relação às colônias que cresceram na placa sem antibiótico.

3.5.5 Quantificação de proteínas

Foi feita pelo método segundo Lowry et al.³⁹, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e albumina bovina como padrão. A leitura das amostras foi realizada em 750 nm de comprimento de onda pelo espectrofotômetro Hitachi U-1800. Dentre os diversos interferentes deste método, os principais encontrados nas amostras deste trabalho foram o imidazol, a uréia e o Tris (este último em altas concentrações).

Assim, as amostras contendo um destes interferentes foram previamente dialisadas contra um tampão no mesmo pH da amostra em membranas de diálise com poro de 12 kDa por pelo menos 24 horas.

3.5.6 Eletroforese SDS-PAGE

O método utilizado foi segundo Laemmli et al.⁴⁰, empregando-se gel de separação a 12% de acrilamida e 5% para o gel de empilhamento. O aparelho Mini-Protean 3 Cell da Biorad foi utilizado. As amostras com alta concentração de NaCl ou outros interferentes foram previamente dialisadas por 24h em membranas de diálise com poro de 12 kDa.

As amostras foram preparadas para um volume total de 18 µL. As amostras provenientes de suspensões celulares foram ajustadas para DO_{600nm} igual a 5,0 e fervidas por 15 minutos para garantir a lise total das células. As amostras da purificação foram preparadas de forma a aplicar-se 5 a 15 µg de proteínas totais ao gel. As amostras, cujo volume a ser aplicado ao gel foi superior a 13,5 µL, foram concentradas a vácuo em concentrador Centrивap da Labconco nas temperaturas de 35 °C para volumes abaixo ou 45 °C para volumes acima de 100 µL. Após concentração, as amostras foram ressuspensas com o tampão de amostra 4 vezes concentrado para 18 µL. Antes de serem adicionadas ao gel de eletroforese, as amostras foram fervidas a 100 °C em Heat Block dry bath incubator da Fisher Scientific por 2 minutos. O tempo de corrida da eletroforese foi de cerca de 1 h, ou até que o corante das amostras saísse totalmente do gel. A corrida foi realizada nas condições iniciais de 200 V, 400 mA e 100 W e, após a corrida o gel foi corado com Comassie Blue R-250 por pelo menos 2 h sob agitação de 60 rpm e depois descorado com descorante 30% etanol e 10% ácido acético.

3.5.7 Determinação de Pureza Relativa do rfPspA3

Para esta análise foram utilizados dois métodos: densitometria e HPSEC (high performance size exclusion chromatography).

Densitometria: Para a densitometria das bandas de proteína nos géis de eletroforese foi utilizado o densitômetro Biorad modelo GS-800. O software Quantity

one 4.6.3 foi empregado para determinação da pureza relativa da banda de rPspA3 em relação ao total de bandas de proteínas presentes em cada caneleta dos géis.

HPSEC: Amostras contendo proteínas foram analisadas por HPLC (Shimadzu) para determinação da porcentagem relativa da área do pico de rPspA3 em relação à área total dos picos do cromatograma. Para a análise foi utilizada a coluna de gel filtração TSKgel G2000SWXL da Tosoh Bioscience, fase móvel tampão fosfato 50 mM + NaCl 200 mM, temperatura de 25 °C e vazão de 0,6 mL/min em 40 minutos de corrida para cada amostra. A leitura foi feita por UV à 280 nm.

3.5.8 Western Blotting

Foi realizado o método segundo Miyaji et al.⁴¹, a qual cedeu os anticorpos anti-PspA produzidos em camundongos. Após a eletroforese SDS-PAGE (item 3.5.6), as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) a 100 V e 350 mA por 1 hora, empregando o seguinte tampão de transferência: 25 mM Tris + 192 mM glicina + 20% etanol + 0,1% dodecil sulfato de sódio. Os sítios da membrana foram bloqueados com leite desnatado 5%. Como anticorpo secundário foi empregado anti-soro de camundongo produzido em coelho conjugado à peroxidase e a revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB), CoCl_2 e H_2O_2 .

3.5.9 Dicroísmo Circular

Foi realizado segundo Kelly et al.⁴². Foi utilizado 60 μL de amostra com ~8,5 μM de concentração para análise. Esta foi realizada pelo espectro polarímetro Jasco modelo J-810 em temperatura ambiente utilizando o Software Spectra Manager numa faixa de 185-260 nm de comprimento de onda.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPRESSÃO DO GENE E CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *E. coli* BL21(DE3) PARA PRODUÇÃO DE rfPspA3

4.1.1 Testes de expressão do gene *fPspA3* em *E. coli* BL21(DE3) e seleção do clone produtor

A clonagem foi obtida pela Dra. Eliane Miyaji com o gene *fpspA3* em vetor pET37b+ o qual foi usado para transformar *E. coli* BL21(DE3). Inicialmente, foi feito um teste de expressão em meio LB com essa bactéria transformada. O cultivo foi feito em frascos agitados (frascos de 300 mL com 30 mL de meio) semeando 4 colônias diferentes em frascos separados para selecionar a que produzisse a maior quantidade a rfPspA3. A Figura 4.1 apresenta o resultado do teste de expressão das 4 colônias nos cultivos com e sem indução (controle).

Figura 4.1: Gel de eletroforese do teste de expressão de 4 diferentes colônias da *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET37b⁺/rfpspA3. 1-Padrão de massa molecular (kDa), 2-Colônia 1 após 4 h de indução, 3-Colônia 1 controle (sem indução), 4- Colônia 2 após 4 h de indução, 5- Colônia 2 controle, 6- Colônia 3 após 4 h de indução, 7- Colônia 3 controle, 8- Colônia 4 após 4 h de indução, 9- Colônia 4 controle.

De acordo com o gel, as 4 colônias apresentaram uma produção equivalente de rfPspA3 (indicado na Figura 4.1). Sabe-se que essa é a proteína de interesse, pois ela possui uma massa molecular aparente em torno de 50 kDa, além de não estar presente nas amostras dos cultivos não induzidos. Todas as colônias apresentaram uma boa expressão. A colônia 4 foi escolhida para o desenvolvimento posterior do trabalho por apresentar uma colônia bem isolada evitando a coleta de

“células satélites” que possam estar presentes em volta da colônia. Observa-se também que não houve escape na produção da proteína nos cultivos sem indução (caneletas 3, 5, 7 e 9) demonstrando assim um bom sistema de controle da expressão do gene de interesse.

4.1.2 Cultivo em frascos agitados

Após isolar a colônia 4 e preparar um estoque congelado para o prosseguimento do trabalho, foi feito um estudo da cinética de crescimento, também em frascos agitados, para conhecer seu comportamento em meio complexo (LB) e meio definido MQD com glicose como fonte de carbono (Figura 4.2).

Figura 4.2: Curva de crescimento nos meios LB e MQD utilizando *E. coli* BL21(DE3) carregando pET37b+/rfp_{spA3} – (—■—) meio LB induzido, (---■---) meio LB sem indução, (—■—) meio MQD induzido e (---■---) meio MQD sem indução.

Nota-se na Figura 4.2 que, como era esperado, no meio rico LB o crescimento celular foi mais rápido que em meio definido. A indução no meio LB foi feita com $DO_{600nm} \sim 1,5$ (concentração celular 0,45 g/L) após 3 horas de cultivo, enquanto que a indução no meio MQD foi feita com $DO_{600nm} \sim 1,0$ (0,3 g/L) após 5 horas de cultivo. Apesar de o microrganismo demorar um pouco mais para crescer em meio definido, após 9 horas de cultivo as concentrações celulares dos dois meios foram semelhantes nos cultivos controle ($\sim 1,4$ g/L). Já nos cultivos que foram induzidos, a concentração celular obtida com o meio LB ($\sim 1,0$ g/L) foi maior do que a obtida com o meio MQD (0,7 g/L), concentrações menores que no cultivo controle,

sem indução. Isto ocorre devido a uma mudança no metabolismo da *E. coli*: durante a fase de indução com IPTG, o metabolismo da bactéria é direcionado para a síntese protéica e não mais para a divisão celular diminuindo a velocidade de crescimento⁴³. Assim, como a concentração celular estava mais elevada no momento da indução no meio em LB, sua DO_{600nm} final foi um pouco maior. Está apresentada na Figura 4.3 a eletroforese das amostras dos cultivos com os dois meios. Ambos permitiram a obtenção do rfPspA3.

Figura 4.3: **A** – Eletroforese do rfPspA3 no meio LB. 1- Padrão de massa molecular (kDa), 2- antes da indução, 3- após 1 hora de indução, 4- após 2 horas de indução, 5- após 3 horas de indução, 6- após 4 horas de indução. **B** – Eletroforese do rfPspA3 no meio MQD. 1- Padrão de massa molecular (kDa), 2-3 h de cultivo, 3-4 h de cultivo, 4-5 h de cultivo (antes da indução), 5- após 1 hora de indução, 6- após 2 horas de indução, 7- após 3 horas de indução, 8- após 4 horas de indução.

Comparando os resultados mostrados na Figura 4.3, nota-se que no meio LB a expressão do gene foi mais rápida, enquanto que em meio MQD o sistema de expressão encontrou-se mais reprimido. Mesmo assim, foi obtida uma quantidade equivalente de rfPspA3 nos dois meios e também não ocorreu escape antes da indução. Assim, definiu-se o meio MQD para se trabalhar com o cultivo em biorreator, pois segundo Zhang e Greasham, um meio quimicamente definido facilita o controle e monitoramento dos parâmetros durante a fase de alimentação nos cultivos em batelada alimentada⁴⁴.

4.1.3 Cultivo Descontínuo em biorreator de 5 L

Após a seleção do clone produtor e estabelecimento da cinética em frascos agitados, cultivos descontínuos foram feitos em biorreator de 5 L para obtenção dos

parâmetros cinéticos necessários para realização dos cultivos descontínuos alimentados. Foram feitos 2 cultivos em meio MQD utilizando como fontes de carbono glicose ou glicerol. As Figuras 4.4 e 4.5 mostram os resultados dos parâmetros velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Figura 4.4: Parâmetros do cultivo descontínuo de *E. coli* BL21(DE3) em meio MQD utilizando glicose como fonte de carbono em biorreator de 5 L para produção de rPspA3. **A** – Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$); **B** – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Figura 4.5: Parâmetros do cultivo descontínuo de *E. coli* BL21(DE3) em meio MQD utilizando glicerol como fonte de carbono em biorreator de 5 L para produção de rPspA3. **A** – Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$); **B** – Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

A partir dos dados apresentados nos gráficos (Figuras 4.4 A e 4.5 A) calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento no cultivo com glicose como $0,54 \text{ h}^{-1}$, maior que no cultivo com glicerol ($0,40 \text{ h}^{-1}$). A conversão de substrato em células (Figuras 4.4 B e 4.5 B) foi semelhante nos dois cultivos: $0,33 \text{ g/g}$ para o cultivo com glicose e $0,30 \text{ g/g}$ com glicerol. Apesar de o cultivo com glicerol ter apresentado menor velocidade de crescimento, nele obteve-se maior concentração

celular no momento da indução (12,6 g/L contra 8,5 g/L no cultivo com glicose), como mostram as Figuras 4.6 e 4.7.

Figura 4.6: Cultivo Descontínuo de *E. coli* BL21(DE3)+pET37b⁺/rfpspA3 em meio MQD com glicose como fonte de carbono. Perfil do consumo de glicose (—▲—), do consumo de lactose (—●—), do crescimento celular (—■—), e produção de ácido acético (—▼—).

Figura 4.7: Cultivo Descontínuo de *E. coli* BL21(DE3)+pET37b⁺/rfpspA3 em meio MQD com glicerol como fonte de carbono. Perfil do consumo de glicerol (—▲—), do consumo de lactose (—●—), do crescimento celular (—■—), e produção de ácido acético (—▼—).

Podemos observar que após a indução o crescimento celular parou como era esperado, pois, com a presença dos indutores (IPTG e lactose) o metabolismo bacteriano voltou-se para a produção protéica da mesma forma que observado

durante o cultivo em frascos agitados. A lactose, além de indutora, também foi utilizada pelo microrganismo como fonte de carbono durante a fase de indução, pois esta foi adicionada após o total consumo das fontes de carbono, identificado pelo aumento abrupto do O₂ dissolvido no reator. Observa-se também que a lactose não foi consumida totalmente nos dois cultivos, indicando que seria possível aumentar o tempo de indução nestes cultivos.

Durante os cultivos houve produção de ácido acético na fase exponencial de crescimento celular. Este composto é tóxico quando presente em concentração igual ou maior que 3,0 g/L²¹, porém, a quantidade produzida nestes cultivos foi baixa o suficiente para não inibir o crescimento celular. Nota-se ainda nas figuras 4.6 e 4.7 que a produção de acetato foi menor no cultivo com glicerol que com glicose, o que poderia ter ocasionado a maior produção celular neste cultivo (12,6 g/L no momento da indução). Segundo Martínéz et al.⁴⁵, o uso de glicerol como fonte de carbono produziu cerca de 83,3% menos acetato que o uso de glicose nas duas diferentes cepas estudadas.

O valor da produtividade celular foi semelhante em ambos cultivos obtendo-se 0,74 g/L.h no cultivo com glicerol e 0,71 g/L.h no cultivo com glicose, pois a concentração celular foi maior antes da indução no cultivo com glicerol, porém o tempo gasto até esse momento também foi maior que no cultivo com glicose. Pode-se observar ainda que após o total consumo da fonte de carbono dos cultivos, a concentração de acetato começou a diminuir, pois ele passou a ser consumido pela *E. coli* como fonte de carbono. Apesar de a lactose ter sido adicionada no momento de esgotamento da glicose ou glicerol, este açúcar deve ser hidrolisado pela bactéria antes de ser consumido, o que faz com que ela utilize outra fonte de carbono disponível (acetato) até o consumo da lactose.

A figura 4.8 mostra a produção de rPspA3 nos cultivos descontínuos realizados.

Figura 4.8: **A** – Gel de eletroforese da produção do rfPspA3 durante o cultivo descontínuo com glicose como fonte de carbono. 1-Padrão de massa molecular em kDa; 2-8ª hora do cultivo; 3-9ª hora; 4-10ª hora; 5-11ª hora (antes da indução); 6-1 hora induzido; 7-2 horas induzido; 8-3 horas induzido; 9-4 horas induzido. **B** – Gel de eletroforese da produção do rfPspA3 durante o cultivo descontínuo com glicerol como fonte de carbono. 1-Padrão de peso molecular em kDa; 2-11ª hora do cultivo; 3-12ª hora; 4-13ª hora; 5-13,5ª hora (antes da indução); 6-1 hora induzido; 7-2 horas induzido; 8-3 horas induzido; 9-4 horas induzido.

Na figura 4.8, pode-se verificar no cultivo com glicose (caneletas de 2 a 5 em A) que não houve escape na produção da proteína antes da indução, devido ao fato de a glicose atuar sobre o Lac operon e reprimir a expressão do gene. Enquanto que, no cultivo com glicerol como fonte de carbono, a proteína parece ter sido produzida em baixa quantidade antes da indução.

Foi avaliada também a estabilidade do plasmídeo (Tabela 4.1) nos cultivos. O plasmídeo apresentou uma estabilidade acima de 95% durante o cultivo com glicose e acima de 97% com glicerol.

Tabela 4.1: Porcentagem de colônias resistentes à kanamicina durante o cultivo descontínuo de *E. coli* BL21(DE3)+pET37b⁺/rfpspA3.

% Colônias resistentes à kanamicina		
Amostras	Glicose	Glicerol
Inóculo	95,7	99,0
Antes da indução	95,7	100,0
Após a indução	95,0	100,0
Final do cultivo	100,0	97,0

4.1.3.1 Purificação de rfPspA3 dos cultivos descontínuos

Com o intuito de quantificar a produção de rfPspA3 nos cultivos descontínuos com glicose e glicerol, foi feita uma primeira etapa de purificação em resina IMAC-sepharose empacotada e carregada com Ni^{+2} .

De cada cultivo tomaram-se 110g de massa úmida de células. As células foram lisadas em um homogeneizador contínuo de alta pressão em tampão Tris 25 mM pH 8,0 e 0,1% de Triton X-100 em presença de 1 mM de PMSF e, posteriormente, o material foi centrifugado para clarificação do homogenato (clarificado). As etapas do processo de cromatografia estão descritas no item 3.4.8.1. Utilizou-se imidazol como eluente nas seguintes concentrações em cada etapa: equilíbrio 5 mM, lavagem 10 mM e eluição 250 mM, sendo a limpeza feita com EDTA.

Foi feita a eletroforese SDS-PAGE das frações obtidas em cada etapa do processo cromatográfico de cada cultivo como mostra a Figura 4.9.

Figura 4.9: Gel de eletroforese com as frações obtidas na cromatografia IMAC-sepharose carregada com Ni^{+2} (com clarificados e eluições diluídos 10 vezes, fração não-adsorvida 5 vezes e lavagens sem diluição). **A** – Purificação a partir das células do cultivo em batelada com glicose. 1-Padrão de massa molecular (kDa), 2-Clarificado centrifugado, 3-Fração não-adsorvida, 4-Lavagem com 10 mM de imidazol, 5-Eluição com 250mM de imidazol, 6-Limpeza e regeneração da resina com EDTA. **B** – Purificação a partir das células do cultivo em batelada com glicerol. 1-Padrão Molecular (kDa), 2-Clarificado centrifugado, 3-Fração não-adsorvida, 4-Lavagem com 10 mM de imidazol, 5-Eluição com 250mM de imidazol, 6-Limpeza e regeneração da resina com EDTA.

Observa-se pela Figura 4.9 que a fração de eluição da purificação feita com as células provenientes do cultivo com glicose (caneleta 5 A) apresentou uma maior concentração do rfPspA3, o que pode ser confirmado pela Tabela 4.2. Não houve grande perda de rfPspA3 na fração não-adsorvida e na fração lavagem, além disso,

essa última fração foi responsável pela remoção de uma quantidade significativa de impurezas, as quais seriam eluídas juntamente com o rfPspA3 caso a lavagem não fosse realizada.

Através dessas eletroforeses foram feitas densitometrias para determinar a pureza e quantificar o rfPspA3. A Tabela 4.2 apresenta os resultados da densitometria.

Tabela 4.2: Comparação do rfPspA3 obtido nos cultivos descontínuos após a cromatografia de afinidade por metal.

	Cultivo Glicose	Cultivo Glicerol
Proteínas Totais (mg)	1860,9	932,8
Pureza do rfPspA3 (%)*	78,8	78,2
Fator de Purificação	2,9	3,9
rfPspA3 na fração de eluição (mg)**	1455,2	735,1
Produção Volumétrica (g/L)	0,72	0,47

*Dados obtidos da densitometria dos géis de eletroforese SDS-PAGE (Figuras 4.9 A e B). **Calculado como: pureza x proteínas totais (mg)/100.

Nota-se pelos resultados da tabela 4.2 que a produção volumétrica de rfPspA3 foi 35% maior no cultivo com glicose. Apesar de este resultado ter sido obtido de uma fração purificada, as perdas ocorridas nas demais frações da cromatografia foram muito semelhantes: 5,6 e 5,4% na fração não-adsorvida e 9,0 e 7,0% na lavagem dos cultivos com glicose e com glicerol respectivamente. Além disso, a pureza alcançada nesta etapa foi muito semelhante entre o material proveniente dos dois cultivos, aproximadamente 78%. No cultivo com glicerol o fator de purificação foi maior porque a pureza do material de partida, o clarificado, foi menor: 20,2% contra 26,6% do clarificado obtido do cultivo com glicose.

Uma possível razão para que o cultivo em glicerol tenha levado a maior produtividade celular, porém menor produção de rfPspA3 seria o fato de a razão IPTG/ células não ter sido suficiente para induzir todas as células do cultivo, pois no cultivo com glicerol esta razão foi menor que no cultivo com glicose: no momento da indução havia 8,5 g/L de células no cultivo com glicose e 12,6 g/L no cultivo com glicerol. Outro fato importante a ser notado é que, após 4 horas de indução, a lactose não foi totalmente consumida nos dois cultivos (Figuras 4.6 e 4.7) o que indica a necessidade de um tempo de indução maior para que todas as células

fossem induzidas, o que levaria a uma maior produção volumétrica de rPspA3. Assim, uma amostra do cultivo descontínuo alimentado foi empregada para estudar a relação IPTG/ células e IPTG/ tempo de indução com o intuito de definir uma relação que levasse à maior produção da proteína de interesse.

4.1.4 Cultivo Descontínuo Alimentado de *E. coli* BL21(DE3) para produção de rPspA3 em biorreator de 5 L

Determinados os parâmetros cinéticos em cultivo descontínuo, o estudo em descontínuo alimentado foi feito utilizando a vazão de alimentação descrita pela Equação 3.1 do item 3.3.4.2. No cultivo descontínuo, o uso de glicerol como fonte de carbono apresentou maior produção celular e menor produção de acetato que o cultivo em glicose, enquanto que a produção volumétrica de rPspA3 foi maior no cultivo com glicose. Como isso poderia ser decorrente de uma relação inadequada IPTG/células, decidiu-se realizar cultivos descontínuos alimentados utilizando novamente as duas fontes de carbono. As Figuras 4.10 e 4.11 mostram os resultados do cultivo descontínuo alimentado com glicose e glicerol, respectivamente, como fonte de carbono.

Figura 4.10: Cultivo descontínuo alimentado de *E. coli* BL21(DE3) para produção de rPspA3 com glicose como fonte de carbono. Perfil do consumo de glicose (—▲—), do consumo de lactose (—●—), do crescimento celular (—■—), e da produção de ácido acético (—▼—).

Figura 4.11: Cultivo descontínuo alimentado de *E. coli* BL21(DE3) para produção de rPspA3 com glicerol como fonte de carbono. Perfil do consumo de glicose (—▲—), do consumo de lactose (—●—), do crescimento celular (—■—), e da produção de ácido acético (—▼—).

De acordo com o gráfico mostrado na Figura 4.10 podemos verificar que a fase descontínua do cultivo com glicose foi um pouco mais longa que a do cultivo anterior (Figura 4.6) e a produção de acetato foi maior, passando de 2,2 para 4,5 g/L. Isto se deveu ao fato de que a concentração inicial de glicose mais elevada ocasionou maior produção de acetato e conseqüentemente a velocidade máxima de crescimento celular diminuiu, chegando a $0,41 \text{ h}^{-1}$, enquanto que na produção em cultivo descontínuo foi $0,53 \text{ h}^{-1}$. Além disso, segundo Gnoth et al., dependendo do valor da concentração inicial de glicose a inibição do crescimento celular pelo substrato pode ocorrer, pois, o substrato em alta concentração provoca uma maior produção de subprodutos que inibem o crescimento⁴⁶. Porém, esses fatos não impediram que a produtividade em células atingisse $1,06 \text{ g/L.h}$ na fase descontínua deste cultivo contra $0,77 \text{ g/L.h}$ do processo descontínuo anterior.

No cultivo com glicerol como fonte de carbono (Figura 4.11) foi obtida uma velocidade de crescimento de $0,38 \text{ h}^{-1}$ na fase descontínua, semelhante à obtida no cultivo descontínuo ($0,40 \text{ h}^{-1}$) e no cultivo descontínuo alimentado com glicose. Como constatado no cultivo descontínuo, no descontínuo alimentado a produção de acetato com glicerol foi menor do que no cultivo com glicose como fonte de carbono,

não chegando a 1,0 g/L durante toda essa etapa de produção. A produtividade celular na etapa descontínua chegou a 1,15 g/L.h superando a do cultivo descontínuo com glicerol (0,74 g/L.h) e também os cultivos descontínuo e descontínuo alimentado com glicose. Entretanto, no final do cultivo foi obtido 1,87 g/L.h de produtividade celular, abaixo dos 2,10 g/L.h obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono. Segundo Shiloach e Fass, uma concentração celular acima de 50 g/L é considerada alta densidade celular, sendo possível, atualmente, alcançar no máximo em torno de 200 g/L, pois, acima desse valor a cultura de *E. coli* perde a fluidez. Nesse trabalho foram alcançados os valores de 62,05 g/L e 61,71 g/L nos cultivos com glicose e glicerol, respectivamente, como fonte de carbono no início da indução. Pinsach et al.²⁴ em seu trabalho com cultivo descontínuo alimentado iniciou a indução com uma DO_{600nm} de *E. coli* M15 em torno de 150, e após a indução, eles constataram que houve crescimento celular chegando a 200 de DO_{600nm} e diminuindo ao fim de 6 horas de indução para 150.

Após a fase descontínua, quando acaba a fonte de carbono, o acetato começa a ser consumido pela bactéria até que sua concentração fique estável durante a alimentação e voltando a aumentar durante a indução, provavelmente devido ao estresse celular nesse momento do processo.

Após 25 horas de cultivo com glicose e 29 horas com glicerol, foi feita a indução, pois a DO_{600nm} começou a se estabilizar. Nesse momento adicionou-se a lactose, que foi consumida totalmente ao final de 4 horas de indução, diferente do processo descontínuo, no qual ao final do processo ainda restava lactose. Isto se deveu à maior concentração celular no biorreator ao final do cultivo descontínuo alimentado em relação ao cultivo descontínuo.

Foi avaliada também a produção de rPspA3 dos cultivos por eletroforese SDS-PAGE como mostra a Figura 4.12.

Figura 4.12: Gel de eletroforese de rfPspA3 das amostras do cultivo descontínuo alimentado com glicose (A) e glicerol (B) como fonte de carbono. **A:** 1-Padrão de massa molecular em kDa; 2-21^a hora do cultivo; 3-22^a hora do cultivo; 4-23^a hora do cultivo; 5-24^a hora do cultivo; 6-25^a hora do cultivo (antes da indução); 7-1 hora de indução; 8-2 horas de indução; 9-3 horas de indução; 10-4 horas de indução. **B:** 1-26^a hora do cultivo; 2-27^a hora do cultivo; 3-28^a hora do cultivo; 4-29^a hora do cultivo (antes da indução); 5-1 hora de indução; 6-2 horas de indução; 7-3 horas de indução; 8-4 horas de indução; 9-4 horas de indução; 10-Padrão de massa molecular em kDa.

De acordo com a Figura 4.12, verifica-se que houve produção crescente de rfPspA3 durante a fase de indução nos dois cultivos. Não houve escape da expressão do gene antes da indução no cultivo com glicose como fonte de carbono, porém a proteína foi produzida em baixa quantidade no cultivo com glicerol como fonte de carbono, assim como no cultivo descontínuo. No cultivo descontínuo alimentado esse valor chegou a ~7,0% uma hora antes da indução. A estabilidade do plasmídeo manteve-se em 100% durante todo o cultivo com glicose e acima de 88% no cultivo com glicerol.

Estimou-se através da densitometria das bandas dos géis de eletroforese que, ao final dos processos, foi obtido 22,1% de rfPspA3 no cultivo utilizando glicose como fonte de carbono e 20,8% utilizando glicerol (Figura 4.12, B, canetas 8 e 9). Observa-se que a produção foi muito semelhante nos dois casos, por isso o cultivo com glicose foi melhor em produtividade de rfPspA3 (o mesmo foi produzido em menor tempo), chegando a 0,12 g/L.h com glicose e 0,09 g/L.h com glicerol.

4.1.5 Estudo da relação IPTG/ células/ tempo de indução

Depois de verificada, pelos cultivos descontínuos, a necessidade de definir as relações entre IPTG/células/tempo de indução, células do cultivo descontínuo alimentado com glicose como fonte de carbono foram retiradas, antes

da indução, para a realização de testes em frascos agitados. Foram feitas duas séries de testes, uma variando a concentração de células e a outra a de IPTG, todas analisadas em 4 e 12 horas de indução.

Variando a concentração celular, medida por DO_{600nm} , foram feitos dois tipos de análises:

- 1- Aplicado ao SDS-PAGE uma quantidade de células correspondentes a DO_{600nm} igual a 5,0 para todas as amostras;
- 2- Aplicado ao SDS-PAGE volume constante das amostras (2 μ L), independentemente da quantidade de células contida neste volume.

Abaixo as figuras 4.13 e 4.14 (A e B) mostram a produção de rfPspA3 nas amostras cuja DO_{600nm} variou nos dois tempos de indução.

Figura 4.13: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação de DO_{600nm} . Cada amostra foi ajustada em DO_{600nm} igual a cinco para aplicação ao gel. 1-Padrão de massa molecular em kDa; 2- DO_{600nm} = 140; 3- DO_{600nm} = 70; 4- DO_{600nm} = 35; 5- DO_{600nm} = 17,5; 6- DO_{600nm} = 8,75; 7- DO_{600nm} = 140 sem IPTG (controle). **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.

Figura 4.14: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação de DO_{600nm} . Foi aplicado ao gel 2 μ L de cada amostra. 1-Padrão de massa molecular em kDa; 2- DO_{600nm} = 140; 3- DO_{600nm} = 70; 4- DO_{600nm} = 35; 5- DO_{600nm} = 17,5; 6- DO_{600nm} = 8,75; 7- DO_{600nm} = 140 sem IPTG (controle). **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.

Assim como no teste anterior, foram feitos dois géis de eletroforese para análise do efeito de diferentes concentrações de IPTG para indução em 4 e 12 horas. A figura 4.15 apresenta esses resultados.

Figura 4.15: Eletroforese de rfPspA3 produzido por *E. coli* BL21(DE3) dos testes da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração celular fixa ($DO_{600nm} = 140$), lactose 16 g/L e variação da concentração de IPTG. Para cada teste, uma quantidade de células correspondente a DO_{600nm} igual a cinco foi aplicada ao gel. 1-Padrão de massa molecular em kDa; 2-0,5 mM de IPTG; 3-1,0 mM de IPTG; 4-1,5 mM de IPTG; 5-2,0 mM de IPTG; 6-2,5 mM de IPTG; 7-0,0 mM de IPTG (controle). **A** – 4 horas de indução e **B** – 12 horas.

Verificou-se em todas as amostras analisadas que houve produção do rfPspA3, inclusive nas amostras controle sem IPTG. Isto aconteceu devido à presença de lactose adicionada em todos os frascos. Abaixo estão os perfis da concentração de rfPspA3 nos testes realizados mostrados nas Figuras 4.16, 4.17 e 4.18. Esses valores foram calculados por densitometria das áreas das bandas de rfPspA3 dos géis de eletroforese das figuras acima.

Figura 4.16: Perfil de produção de rfPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L. Área da banda do rfPspA3 (SDS-PAGE – Figura 4.13) versus relação $\mu\text{mol IPTG}/DO_{600nm}$. SDS-PAGE de amostras com quantidade de células correspondentes a $DO_{600nm}=5,0$. (◆) 4 horas de indução e (■) 12 horas de indução.

Figura 4.17: Perfil de produção de rPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentração de IPTG 1 mM/lactose 16 g/L e variação da concentração celular. Área da banda do rPspA3 (SDS-PAGE – Figura 4.14) versus relação $\mu\text{mol IPTG}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. SDS-PAGE de amostras com volume de 2 μL . (—◆—) 4 horas de indução e (—■—) 12 horas de indução.

Figura 4.18: Perfil de produção de rPspA3 em teste da relação IPTG/células/tempo de indução com concentrações fixas de células ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 140$) e lactose 16 g/L e variação da concentração de IPTG analisado pela eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.15). SDS-PAGE de amostras com quantidade de células correspondentes à $\text{DO}_{600\text{nm}}=5,0$. (—◆—) 4 horas de indução e (—■—) 12 horas de indução.

Considerando-se que, quanto maior a área da banda de rPspA3, maior a quantidade dessa proteína na amostra, observou-se que, em todos os testes, foi obtida maior quantidade de proteína com 12 horas de indução.

De acordo com a Figura 4.16, a razão necessária de IPTG/células em 12 horas de indução foi maior do que quando se induziu por 4 horas, pois, a curva no tempo menor atingiu um patamar com menor valor da relação entre IPTG e $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

(~0,34 $\mu\text{mol IPTG/DO}_{600\text{nm}}$) do que em 12 horas de indução (~1,3 $\mu\text{mol IPTG/DO}_{600\text{nm}}$). Na Figura 4.17 o valor da área de rPspA3 começou a decair quando se aumentou a razão IPTG/células, isto aconteceu porque foi aplicado ao gel o mesmo volume de cada amostra, ou seja, a quantidade de células aplicada ao gel diminuiu com o aumento relação IPTG/ $\text{DO}_{600\text{nm}}$, e, conseqüentemente, diminuiu também a área da proteína produzida.

Ao analisar amostras com variação do valor de IPTG (Figura 4.18), verificou-se que com 12 horas de indução, ~0,23 $\mu\text{mol IPTG/DO}_{600\text{nm}}$ foi suficiente para a indução e, com 4 horas ~0,11 $\mu\text{mol IPTG/DO}_{600\text{nm}}$, valores bem menores do que os obtidos quando se variou a concentração de células no meio. Isto pode ser, provavelmente, devido às condições do experimento em frascos agitados, pois, alguma outra variável não analisada poderia estar interferindo nos resultados, como por exemplo, a transferência de oxigênio no meio, pois esta é bem menor em frascos do que em biorreatores. A limitação de oxigênio leva a menor obtenção de energia pelas células, e pode afetar a síntese protéica.

4.2 CARACTERÍSTICAS DO rfPspA3

De acordo com a sequência do fragmento recombinante da PspA3, mostrada na Figura 4.19, foram obtidas as características físico-químicas deste fragmento empregando-se um programa disponível no site³⁶.

```
MHHHHHHHLEE EAPVASQSKA EKDYDAAVKK SEAAKKHYEE VKKKAEDAQK
KYDEGQKKTV EKAKREKEAS EKIAEATKEV QQASNESQRK EADKKIKEAT
QRKDEAEAAF ATIRTTIVVP EPSELAETTK KAEAEAKAEK VAKRKYDYAT
LKVALAKKEV EAKELEIEKL QYEISTLEQE VATAQHQVDN LKKLLAGADP
DDGTEVIEAK LNKGEAELNA KQAEELAKKQT ELEKLLDSL DPEGKTQDELD
KEAEAEALDK KADELQNKVA DLEKEISNLE ILLGGADSED DTAALQNKLA
TKKAELEKTQ KELDAALNEL GPDGDEEETP APAPQPEQPA PAPKPEQPAP
APK
```

Figura 4.19: Sequência do fragmento recombinante da PspA3 utilizado neste trabalho.

A partir da análise da sequência do rfPspA3 foram obtidas as seguintes características físico-químicas:

Número de aminoácidos: 353

Massa molecular: 39125,18 Da

Absorção 0,1% (1g/L) à 280 nm (1cm) : 0,196

Ponto isoelétrico teórico: 4,74

Através da sequência foi possível determinar a composição de aminoácidos do rfPspA3. A Tabela 4.3 mostra a composição, número de aminoácidos e sua porcentagem.

Tabela 4.3: Composição de aminoácidos do rFPspA3 obtida pela análise de sua sequência pelo programa.

Aminoácido	Nº de aminoácidos	Porcentagem de aminoácidos
Alanina (A)	55	15,58
Arginina (R)	5	1,42
Ácido Aspártico (N)	8	2,27
Asparagina (D)	24	6,80
Cisteína (C)	0	0,00
Glutamina (Q)	20	5,67
Ácido glutâmico (E)	62	17,56
Glicina (G)	9	2,55
Histidina (H)	8	2,27
Isoleucina (I)	9	2,55
Leucina (L)	30	8,50
Lisina (K)	56	15,86
Metionina (M)	1	0,28
Fenilalanina (F)	1	0,28
Prolina (P)	17	4,82
Serina (S)	11	3,12
Treonina (T)	17	4,82
Triptofano (W)	0	0,00
Tirosina (Y)	6	1,70
Valina (V)	14	3,97

Foi calculada pelo mesmo site uma curva de titulação teórica como mostra a Figura 4.20.

Figura 4.20: Curva de titulação teórica do rFPspA3 obtido do programa.

Essas características foram importantes para a definição dos parâmetros utilizados durante as etapas de purificação, bem como para análise dos resultados obtidos.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO rfPspA3

4.3.1 Separação das células do meio de cultivo

Após a finalização dos cultivos, as células foram separadas do meio por centrifugação. A Tabela 4.4 mostra a quantidade de massa celular úmida produzida em cada cultivo e também o volume final de cultivo.

Tabela 4.4: Dados finais dos cultivos em biorreator de 5 L após separação das células do meio de cultivo.

Cultivo	Fonte de carbono	Volume final (L)	Massa celular úmida final (g)	Concentração celular final (g/L)*	Produtividade celular (g/L.h)*
Descontínuo	Glicose	4,70	257,3	10,7	0,7
	Glicerol	5,04	352,6	13,0	0,7
Descontínuo	Glicose	5,00	1362,5	62,0	2,1
Alimentado	Glicerol	4,82	1194,7	61,7	1,9

*massa seca

De acordo com os dados da Tabela 4.4, podemos observar que a quantidade de biomassa gerada nos cultivos descontínuo alimentados foi aproximadamente 6 vezes superior à obtida nos cultivos descontínuos, o mesmo ocorrendo com sua concentração celular final. A quantidade de sólidos em suspensão dos cultivos descontínuos alimentados foi cerca de 30%, o que inviabiliza o uso de membranas de microfiltração nesta etapa.

4.3.2 Lise celular

Para todos os testes foram lisados ~103 g de massa celular úmida proveniente dos cultivos descontínuo alimentados com glicose como fonte de carbono e também com glicerol. A lise foi realizada em 1000 mL de tampão de lise. Em 10 minutos de lise contínua foram analisadas amostras a cada minuto, o que correspondeu a 1 amostra por ciclo, pois a vazão é de 60 L/h, ou seja, 1 L/min. Portanto, o volume total passado no homogeneizador foi determinado como 1 ciclo, o que nesse caso levou 1 minuto para ser realizado. As análises foram feitas por

espectrofotometria a 600 nm, plaqueamento e por quantificação de produto obtido (proteínas totais e rfPspA3). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado. A Figura 4.21 mostra a eletroforese feita com este sobrenadante.

Figura 4.21: Géis de eletroforese do sobrenadante das amostras da lise celular mecânica em homogeneizador de alta pressão APV Gauling 60. A-Lise celular do cultivo com glicose como fonte de carbono e B-Lise celular do cultivo com glicerol como fonte de carbono. Amostras aplicadas com 10 µg de proteínas totais. P-Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial da lise; 2-Após 1 minuto de lise; 3-Após 2 minutos; 4-Após 3 minutos; 5-Após 4 minutos; 6-Após 5 minutos; 7-Após 6 minutos; 8-Após 8 minutos; 9-Após 10 minutos (final da lise).

Verificou-se através da Figura 4.21 que havia presença de rfPspA3 em maior proporção em todas as amostras analisadas no gel (~30% por análise de densitometria). Sua presença inicial indicou que houve lise antes do início da operação no homogeneizador de alta pressão, provavelmente devido à presença do detergente Triton X-100, que mesmo em baixa concentração (0,1%) foi responsável por lise química da célula. Alguns trabalhos utilizaram este detergente só ou associado a outros produtos químicos para extrair proteínas de células gram-negativas com lise mecânica⁴⁷ ou mesmo sem lise mecânica para extração de RNAs de baixo peso molecular⁴⁸. Mesmo assim, a ruptura celular de *E. coli* por processo mecânico em homogeneizador de alta pressão demonstrou resultados de maior eficiência chegando a 100%⁴⁹, sendo que utilizando somente lise química esse fator chegou a 95%⁴⁷.

A Figura 4.22 A e B mostra o resultado de proteínas totais no sobrenadante (A) e concentração de rfPspA3 no sobrenadante (B) obtido através da densitometria dos géis de eletroforese da Figura 4.21 A e B, respectivamente.

Figura 4.22: Perfil da concentração de proteínas totais (A) e rfPspA3 (B) obtido em relação ao tempo de lise das células obtidas dos cultivos de alta densidade com glicose como fonte de carbono (—■—) e com glicerol (—●—).

Observa-se pela Figura 4.22 que após 6 minutos de lise (6 ciclos) para a lise do cultivo com glicose e 7 minutos (7 ciclos) para a lise do cultivo com glicerol alcançaram-se um patamar, indicando que não houve aumento na concentração de proteínas chegando, no final deste processo, em ~11,0 mg/mL de proteínas totais e ~ 3,75 mg/mL de rfPspA3 nas duas lises realizadas. Utilizando glicerol como fonte de carbono no cultivo, a quantidade inicial de proteínas totais em sua lise foi menor. Isto ocorreu, provavelmente, porque o glicerol teve função crioprotetora e evitou que as células lisassem durante o descongelamento. Porém, ao fim desta etapa a concentração de proteínas totais chegou a praticamente o mesmo valor com 5,0% a mais para as células providas do cultivo com glicerol. Para a concentração de rfPspA3 ao final do processo o mesmo valor foi encontrado para as duas lises realizadas (3,9 mg/mL). Goyal et al.⁵⁰ estudando a expressão e purificação de streptoquinase em *E. coli* BL21(DE3) encontrou 1,08 mg/mL desta proteína produzida em cultivo de alta densidade e, posteriormente, em outro trabalho, na tentativa de aperfeiçoar estudos dos parâmetros de cultivo em alta densidade, estes mesmos autores conseguiram chegar 1,12 mg/mL⁵¹.

A integridade celular também foi analisada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em placas de meio LB Agar e também por DO_{600nm}. A Figura 4.23 apresenta esses resultados.

Figura 4.23: Perfil de DO_{600nm} e de contagem de colônias pelo tempo de lise celular em homogeneizador de alta pressão Gaulin APV 60. Amostras a partir das células do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono analisadas por DO_{600nm} (■) e por UFC/mL (▲) e, com glicerol como fonte de carbono analisadas por DO_{600nm} (●) e por UFC/mL (▼).

Verifica-se pela Figura 4.23 que os resultados obtidos pelas diferentes análises realizadas apresentaram os mesmos perfis, tanto para a lise das células oriundas do cultivo com glicose como do cultivo com glicerol, e que após 6 minutos de lise para o cultivo com glicose e 7 para o cultivo com glicerol formaram-se patamares, indicando que 6 e 7 ciclos, respectivamente, foram suficientes para obtenção do máximo de lise, com exceção da contagem de UFC/mL do cultivo com glicerol, a qual estabilizou-se com 9 minutos.

Observa-se também que a concentração celular inicial do cultivo com glicerol foi maior, praticamente o dobro das amostras do cultivo com glicose, indicando, assim como nas análises de concentração protéica, que o glicerol estaria agindo como conservante da célula durante o congelamento e por isso manteve uma maior quantidade de células íntegras, pois se obteve no final da lise celular a mesma quantidade protéica partindo da mesma massa celular dos dois cultivos. Mesmo começando com uma maior quantidade de células íntegras, conseguiu-se ao fim do processo maior quantidade de células lisadas do cultivo com glicerol indicadas pela

DO_{600nm} e UFC/mL (0,55 e 100, respectivamente) que nas células lisadas do cultivo com glicose (1,52 e 900, respectivamente).

Foi feito um controle da amostra inicial solubilizando as células em 100 mM de NaOH e o material obtido foi considerado como correspondendo a 100% de lise. Após a solubilização com NaOH, foi obtida uma DO_{600nm} de 1,47 para as células do cultivo com glicose como fonte de carbono e de 0,51 para as células do cultivo com glicerol, obtendo a eficiência da lise mecânica de 96,7% e 92,7%, respectivamente. Segundo Wong et al.⁴⁹, 10 ciclos foram necessários para uma eficiência de 100% de ruptura mecânica de *E. coli* induzida por IPTG.

4.3.3 Teste de Solubilidade do rfPspA3

Após a lise celular foi feito o teste de solubilidade do rfPspA3 por centrifugação a 20.817 g por 2 horas. A Figura 4.24 abaixo mostra o resultado do teste.

Figura 4.24: Gel de eletroforese do teste de solubilidade da proteína rfPspA3 feito por centrifugação do homogenato bruto da *E. coli* BL21(DE3) transformada com pET37b+/rfpspA3. 1- Padrão de massa molecular (kDa); 2-Homogenato bruto; 3-Sobrenadante do homogenato centrifugado; 4-Precipitado do homogenato centrifugado (5 vezes concentrado).

De acordo com a Figura 4.24, não houve presença significativa do rfPspA3 no precipitado da amostra centrifugada levando-se em consideração que a amostra do precipitado está 5 vezes mais concentrada que o sobrenadante. A partir desta figura, pode-se observar também que, qualitativamente, houve maior concentração do rfPspA3 na amostra após centrifugação, o que pode ser comprovado pela Tabela 4.5, pois uma parte de impurezas foi retirada durante esse processo, como se pode notar no precipitado. Assim, pode-se dizer que ocorreu purificação de 1,26 vezes do rfPspA3 nesta etapa de centrifugação e também que a proteína foi bastante solúvel a pH 8,0.

Tabela 4.5: Pureza relativa do rfPspA3 antes e após centrifugação.

Amostra	Pureza Relativa do rfPspA3 (%)
Homogenato bruto	19,0
Sobrenadante	23,9
Precipitado	2,9

Observa-se pela Tabela 4.5 que ocorreu uma pequena perda durante a centrifugação (2,9% do total de proteínas no precipitado), provavelmente, devido ao arraste do rfPspA3 junto com outras proteínas e debris celulares durante a centrifugação, pois quase toda a proteína permaneceu solúvel após este processo.

4.3.4 Clarificação do homogenato

Três condições de clarificação foram testadas a partir de uma mesma amostra: centrifugação, microfiltração tangencial e ultrafiltração tangencial.

Para esses testes, 150 g de massa úmida celular obtida do cultivo de batelada alimentada com glicose como fonte de carbono foram lisadas em homogeneizador de alta pressão, obtendo-se um volume total de 1910 mL que foi dividido em três partes iguais para as clarificações a serem testadas. Na clarificação por centrifugação, o homogenato centrifugado obtido foi filtrado em membrana de 0,45 μ m para a retirada de precipitados e outras impurezas, etapa necessária para purificações cromatográficas posteriores.

A Figura 4.25 mostra o resultado dos filtrados obtidos de cada clarificação.

Figura 4.25: Amostras obtidas após diferentes etapas de clarificação (10 μ g de proteínas totais). 1- Padrão de massa molecular (kDa); 2-Homogenato após lise celular; 3-Clarificado centrifugado e filtrado em membrana de 0,45 μ m de poro ; 4-Clarificado microfiltrado em fibra oca de 0,1 μ m de poro; 5-Fração retida em fibra oca de 0,1 μ m de poro; 6-Clarificado ultrafiltrado em fibra oca de 750 kDa de poro; 7-Fração retida em fibra oca de 750 kDa de poro.

A Figura 4.26 mostra a foto dos clarificados obtidos.

Figura 4.26: Foto dos clarificados em diferentes tratamentos. 1-Clarificado centrifugado e microfiltrado em membrana de poro 0,45 μm ; 2-Clarificado microfiltrado em fibra oca de 0,1 μm de poro; 3-Clarificado ultrafiltrado em fibra oca de 750 kDa de poro.

Podemos notar na Figura 4.26 que o clarificado centrifugado possui coloração mais escura indicando que a retirada de impurezas foi menos eficiente. Porém, utilizando a centrifugação não houve variação no volume de amostra após esta etapa. Ao utilizar a fibra-oca com poro de 0,1 μm houve uma diluição de 3,3 vezes e de 3,0 vezes para a fibra-oca com poro de 750 kDa. Esses clarificados, assim como a porção retida nos filtros do tipo fibra-oca, foram analisados por HPSEC para determinar a porcentagem da área dos picos do cromatograma (Figura 4.27). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.6.

Figura 4.27: Cromatogramas obtidos por HPSEC do homogenato bruto e das 3 clarificações: verde – Homogenato bruto, preto – clarificado centrifugado, rosa – clarificado microfiltrado por fibra oca 0,1 μm de poro e azul – clarificado ultrafiltrado por fibra oca 750 kDa de poro.

Tabela 4.6: Tabela de purificação dos clarificados obtidos por centrifugação, microfiltração e ultrafiltração.

	Proteínas Totais (mg)	P. R.* rfPspA3 (%)	rfPspA3 (mg)	Recuperação da rfPspA3 (%)	Fator de Purificação
C. ¹ Centrifugado	6444	19,9	1282	100	1,0
C. FO ² 0,1 µm	2076	27,1	563	43,9	1,4
Retido FO 0,1 µm	4969	14,9	740	57,7	-
C. FO 750 kDa	2990	26,8	801	62,5	1,3
Retido FO 750 kDa	3652	10,3	376	29,3	-

*Pureza Relativa por HPSEC

¹Clarificado²Fibra-oca

Verificou-se, pelos cromatogramas, que a centrifugação não retirou impureza do homogenato, somente diminuiu a concentração de alguns componentes, enquanto que nas filtrações houve retirada significativa de muitas impurezas. Entretanto, neste caso o fator de purificação não compensou a perda obtida. Possivelmente, formou-se uma segunda camada nas membranas, resultante do entupimento dos poros por proteínas, causando assim retenção da rfPspA3. Isso aconteceu em menor intensidade na ultrafiltração, cujos poros são bem menores e mais uniformes (Tabela 4.6). Portanto, levando-se em consideração que a perda de rfPspA3 durante a centrifugação foi muito pequena (Figura 4.24, caneleta 4), e ao se observar que a recuperação obtida das etapas de clarificação em fibra-oca foi baixa (43,9% e 62,5%, Tabela 4.6) para uma primeira etapa de purificação, a centrifugação foi o método escolhido para a etapa de clarificação.

4.3.5 Teste de precipitação do rfPspA3 em diferentes pH

Uma vez que o processo de purificação do rfPspA3 envolve etapas de cromatografia de troca iônica, o comportamento da proteína contida no clarificado centrifugado foi avaliado frente a diferentes pH. Ocorreu precipitação durante o ajuste do pH nas amostras de pH 3,0 à 5,0. Em pH 5,5 a precipitação ocorreu após 3 horas. Nos pH 6,0 à 8,0 não ocorreu precipitação.

O sobrenadante e o precipitado obtidos em cada pH foram avaliados por SDS-PAGE. A Figura 4.28 mostra o resultado da eletroforese.

Figura 4.28: Gel de eletroforese do teste de solubilidade do rfPspA3 em diferentes pH. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Clarificado centrifugado; S-Sobrenadante da amostra no pH indicado; P-Precipitado da amostra no pH indicado (10 µg de proteínas totais).

De acordo com a Figura 4.28, percebe-se que o rfPspA3 precipitou em todos os pH, sendo sua presença em maior quantidade nos precipitados obtidos a pH 4,0 e 4,5, que estão próximos ao *pI* teórico desta proteína (4,74). Em pH 5,5 foi obtida a menor quantidade desta proteína no precipitado. Os dados de densitometria desse gel estão apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7: Pureza relativa do rfPspA3 no precipitado e sobrenadante das amostras do homogenato a diferentes pH.

Amostra	Pureza relativa do rfPspA3 (%) ¹
Clarificado centrifugado	10,2
Sobrenadante pH 3,0	7,8
Precipitado pH 3,0	8
Sobrenadante pH 3,5	2,2
Precipitado pH 3,5	9,8
Sobrenadante pH 4,0	4,2
Precipitado pH 4,0	9,65
Sobrenadante pH 4,5	2,8
Precipitado pH 4,5	8,4
Sobrenadante pH 5,0	11,9
Precipitado pH 5,0	20,9
Sobrenadante pH 5,5	36,1
Precipitado pH 5,5	6,84

¹Obtido por densitometria da eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.28.

Com relação à quantidade de proteína de entrada, nota-se pela tabela que, com exceção do pH 5,5, a maior parte da proteína total e do rfPspA3 ficou no precipitado. Com esses resultados foi possível montar o perfil recuperação da proteína de interesse e de proteínas totais no sobrenadante em relação ao pH da amostra como mostra a Figura 4.29.

Figura 4.29: Perfil da porcentagem de recuperação rPspA3 e proteínas totais recuperadas no sobrenadante do clarificado centrifugado de *E. coli* BL21(DE3) submetido a diferentes pH e a indicação do pI teórico no gráfico.

Verifica-se na Figura 4.29 que na faixa próxima ao pI teórico (4,74) houve maior precipitação da rPspA3 assim como de proteínas totais. Isso pode ter ocorrido devido ao arraste da rPspA3 pelas outras proteínas do meio.

4.3.6 Testes de adsorção em resina Q-sepharose Fast-Flow

De acordo com as características analisadas do rPspA3 (item 4.2), nota-se que pelo seu pI teórico em torno de 4,74 e pelas características do clarificado centrifugado utilizado, foi possível sua manipulação em pH acima de 6,0 sem que houvesse precipitação, deixando-a com carga total negativa o que possibilita o uso de uma etapa cromatográfica de troca aniônica, como a Q-Sepharose, em seu processo de purificação. Para os testes nesta resina, foram utilizados os sobrenadantes de diferentes pH do teste descrito no item anterior (4.3.5). Para a realização de cromatografia de troca catiônica como primeira etapa seria necessário obter o rPspA3 com carga positiva (pH abaixo do seu pI), ou seja, justamente nos pH em que ocorreram precipitação, por isso seu uso foi descartado.

Para determinar o pH ótimo de adsorção foram feitos testes com 1 mL de resina Q-Sepharose em batelada previamente equilibrada com tampões na faixa de pH de 4,5 a 8,0 variando 0,5 valor de pH. Após a adsorção do clarificado à resina, as amostras do sobrenadante (fração não-adsorvida) foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 4.30).

Figura 4.30: Gel de eletroforese da adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-sepharose FF em diferentes pH. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Clarificado centrifugado; CC-Clarificado centrifugado no pH indicado; F-Fração não-adsorvida em resina Q-sepharose no pH indicado (10 µg de proteínas totais).

Observa-se pela figura 4.30 que a adsorção quase completa do rfPspA3 em Q-Sepharose ocorreu a partir do pH 6,0. Observa-se também nas frações não-adsorvidas a pH 6,0-8,0 a presença de uma pequena quantidade do rfPspA3 ou de uma proteína de mesma massa molecular aparente que ela. Assim, foi feita a densitometria desse gel de eletroforese para verificar a quantidade do rfPspA3 presente nas frações não-adsorvidas. A Tabela 4.8 apresenta estes resultados.

Tabela 4.8: Pureza relativa do rfPspA3, sua concentração e recuperação nas frações não-adsorvidas em resina de troca-aniônica Q-sepharose em diferentes pH.

Amostra	PT* (mg/mL)	Pureza relativa do rfPspA3 (%)	rfPspA3 (mg/mL)	Recuperação do rfPspA3 (%)
Clarificado 1 ¹	8,7	21,2	1,84	100
pH 4,5 CC**	1	3,1	0,03	2
pH 4,5 F***	0,39	0	0,0	0
pH 5,0 CC	2,6	11,7	0,30	16
pH 5,0 F	0,56	4,35	0,02	1
pH 5,5 CC	3,5	28	0,98	53
pH 5,5 F	1,26	12,2	0,15	8
pH 6,0 CC	8,7	25,7	2,24	121
pH 6,0 F	2,42	3,09	0,07	4
Clarificado 2 ¹	8,7	19	1,65	100
pH 6,5 CC	8,7	24,6	2,14	129
pH 6,5 F	2,78	2,97	0,08	5
pH 7,0 CC	8,7	19,2	1,67	101
pH 7,0 F	2,65	2,22	0,06	4
pH 7,5 CC	8,7	19,2	1,67	101
pH 7,5 F	2,32	2,6	0,06	4
pH 8,0 CC	8,7	21	1,83	111
pH 8,0 F	1,88	2,98	0,06	3

*Proteínas Totais **Clarificado centrifugado no pH indicado ***Fração não-adsorvida

¹ Há dois clarificados devido ao fato de as amostras estarem em dois géis de eletroforese diferentes e a densitometria de cada um deles resultou em uma pureza relativa de rfPspA3 diferente.

De acordo com a Tabela 4.8, a pH>6,0 houve pouco rfPspA3 na fração que não foi adsorvida (~3%), como já se tinha notado pelo gel de eletroforese (Figura 4.30). Porém, a distância percorrida pela proteína em relação à altura total do gel (Relative Front – RF) diferiu um pouco do RF da banda de rfPspA3 presente no clarificado centrifugado. Assim, foi feito um Western Blotting para avaliar se esta banda era ou não do rfPspA3. A Figura 4.31 mostra os resultados obtidos desta análise.

Figura 4.31: 1-Gel de eletroforese de testes de adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-Sepharose em diferentes pH. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Clarificado centrifugado; S-Sobrenadante do clarificado no pH indicado; P-Precipitado do clarificado no pH indicado; CC- Clarificado centrifugado no pH indicado (10 µg de proteínas totais); F-Fração não-adsorvida do clarificado em resina Q-Sepharose no pH indicado (10 µg de proteínas totais). 2-Western Blotting obtido a partir do gel de eletroforese 1.

De acordo com a Figura 4.31, percebe-se que em pH > 6,0 não houve perda de rPspA3 na fração não-adsorvida, como é mostrado pelo Western Blotting. Na fração não-adsorvida em pH 6,0, há um indício de que a concentração de impurezas foi um pouco maior que nos outros pH. No teste em pH 5,5 do clarificado centrifugado, verifica-se que houve grande perda da proteína também no precipitado, indicando a inviabilidade desse pH nessa etapa de purificação devido à baixa recuperação de rPspA3.

Determinado o pH 6,0 para adsorção em Q-Sepharose, foi então avaliado o efeito da condutividade com o objetivo de definir as condições de maior retirada de impurezas na fração não-adsorvida, porém sem perdas de rPspA3. Para isso diferentes concentrações de NaCl (0 à 500 mM) foram adicionadas ao tampão de equilíbrio (acetato pH 6,0) e ao clarificado (amostra). A Tabela 4.9 mostra o valor da condutividade na qual a amostra foi ajustada nas diferentes concentrações do sal e a Figura 4.32 apresenta o gel de eletroforese das frações obtidas.

Tabela 4.9: Concentração de NaCl na solução tampão acetato 25 mM e sua respectiva condutividade.

Amostra	NaCl (mM)	Condutividade (mS/cm)
Homogenato centrifugado	0,0	2,6
Tampão Acetato pH 6,0	0,0	1,7
Tampão Acetato pH 6,0	10,0	2,6
Tampão Acetato pH 6,0	20,0	3,5
Tampão Acetato pH 6,0	30,0	4,3
Tampão Acetato pH 6,0	40,0	5,2
Tampão Acetato pH 6,0	50,0	6,0
Tampão Acetato pH 6,0	75,0	8,3
Tampão Acetato pH 6,0	100	10,2
Tampão Acetato pH 6,0	150	14,5
Tampão Acetato pH 6,0	200	18,4
Tampão Acetato pH 6,0	300	25,7
Tampão Acetato pH 6,0	400	32,7
Tampão Acetato pH 6,0	500	40,0

Figura 4.32: α e β -Géis de eletroforese do teste de adsorção do clarificado centrifugado em resina Q-sepharose em diferentes concentrações de NaCl. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Clarificado centrifugado (10 μ g de proteínas totais); 1-12-Frações não-adsorvidas (em todas 10 μ g de proteínas totais) com: 1-10mM de NaCl; 2-20mM de NaCl; 3-30mM de NaCl; 4-40mM de NaCl; 5-50mM de NaCl; 6-75mM de NaCl; 7-100mM de NaCl; 8-150mM de NaCl; 9-200mM de NaCl; 10-300mM de NaCl; 11-400mM de NaCl e 12-500mM de NaCl.

A Figura 4.33 apresenta os valores de quantidade relativa de rfPspA3 medida por densitometria dos géis de eletroforese mostrados na Figura 4.32.

Figura 4.33: Porcentagem relativa de rfPspA3 medida por densitometria das bandas nas frações não-adsorvidas em resina Q-Sepharose FF em diferentes concentrações de NaCl.

De acordo com os resultados obtidos, com concentração de 150 mM de NaCl (indicada por uma seta nas Figuras 4.32β e 4.33) uma banda com mesma massa aparente que rfPspA3 começou a se concentrar indicando que nesta condutividade há carga iônica suficiente para deslocar a proteína, havendo assim menor adsorção pela resina e consequentemente ocasionando sua perda em torno de 25%. Em concentrações de NaCl abaixo desta observou-se a presença, em todas as amostras, de aproximadamente 3% de rfPspA3, que pode ser considerada uma medida basal, uma vez que este mesmo valor apareceu na Tabela 4.8. A partir de 300 mM de NaCl, podemos observar que houve total deslocamento da proteína, ficando perto de 70% na fração não-adsorvida. Com esses resultados, determinou-se a condição de entrada da amostra na cromatografia em Q-Sepharose a pH 6,0 com condutividade equivalente a 50 mM de NaCl, na tentativa de obter-se maior quantidade de impurezas na fração não-adsorvida. Mesmo sabendo que a eluição das proteínas em colunas cromatográficas ocorrem em uma cinética diferente da adsorção, pode-se inferir dos dados apresentados que a concentração de NaCl a ser utilizada na eluição deveria partir de 250 mM.

4.3.7 Testes em Colunas Cromatográficas

4.3.7.1 Q-Sepharose Fast-Flow

Após determinada a condição de adsorção da rfPspA3 à Q-Sepharose, testes em colunas empacotadas foram realizados para estabelecer as condições de eluição levando-se em consideração os testes realizados em tubos. Foi utilizado

volume de coluna de 10 mL. Foram aplicados à resina previamente equilibrada 50 mL do clarificado centrifugado. A coluna foi previamente equilibrada com o tampão acetato 25 mM pH 6,0 com 50 mM de NaCl. Para as lavagens e eluição foram empregados 5 volumes de coluna do tampão acetato 25 mM pH 6,0 com diferentes concentrações de NaCl, como indicado na Figura 4.34.

Figura 4.34: Fluxograma do primeiro teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Todas as frações com 10 µg de proteínas totais.

De acordo com a Figura 4.34, verifica-se que acima de 75 mM de NaCl houve perdas de rfpSpA3 porém, nessas concentrações houve maior remoção de impurezas como mostra as caneletas 3 e 4 da eletroforese acima. Com relação à eluição, na fração com 250 mM de NaCl consegue-se recuperar uma boa parte da proteína de interesse, porém não toda, sendo o restante eluído na fração de 300 mM, não havendo presença na fração de 350 mM nem na fração de limpeza com 500 mM de NaCl.

Um segundo teste cromatográfico foi realizado com as mesmas condições de adsorção (tampão acetato 25 mM pH 6,0 + 50 mM de NaCl) e diferentes condições de lavagem e eluição. A etapa de Lavagem com 75 mM de NaCl foi retirada e outra com 125 mM foi introduzida a fim de aumentar a remoção de impurezas. A eluição a 250 mM de NaCl foi substituída pela eluição a 275 mM para saber se há possibilidade de recuperar toda a rfPspA3 nessa concentração, deixando ainda impurezas ligadas à resina. Os resultados do teste estão apresentados na Figura 4.35 abaixo:

Figura 4.35: Fluxograma do segundo teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Todas as frações com 10 µg de proteínas totais.

A partir dos resultados apresentados na Figura 4.35, nota-se que utilizando Lavagem com 125 mM de NaCl, apesar de haver maior remoção de impurezas, houve também 9% de perda de rfPspA3 aplicada à resina. Observa-se também que

275 mM de NaCl não foi suficiente para recuperar toda a proteína, sendo o restante eluído na fração de 300 mM.

Mesmo com a perda de rfPspA3 na lavagem com 125 mM NaCl, no terceiro teste cromatográfico, esta lavagem foi mantida a fim de se avaliar se um ganho em pureza na fração de eluição compensaria a perda na lavagem. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.36 e na Tabela 4.10.

Figura 4.36: Fluxograma do terceiro teste cromatográfico em coluna empacotada com resina de troca iônica Q-sepharose e gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida conforme indicado pelas setas e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e amostra e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Todas as frações com 10 µg de proteínas totais.

A partir da eletroforese mostrada na Figura 4.36, foi feita uma densitometria, cujo resultado encontra-se na Tabela 4.10 com os valores de porcentagem relativa de rfPspA3 em cada fração.

Tabela 4.10: Tabela de purificação de rfPspA3 do terceiro teste de dessorção com a resina Q-sepharose.

	PT* (mg)	Quantidade Relativa de rfPspA3 (%)**	rfPspA3 (mg)	Rendimento (%)
Clarificado centrifugado	265,5	31,08	82,5	100
Fração não-adsorvida	118,3	0	0,0	0
Lavagem 125 mM NaCl	28,4	10,52	3,0	3,62
Eluição 300 mM NaCl	77,1	44,81	34,6	41,89
Limpeza 500 mM NaCl	7,7	0	0,0	0

*Proteínas Totais; ** por densitometria

Pelos resultados apresentados na Tabela 4.10, observa-se que houve perda de 3,62% de rfPspA3 na lavagem mantida a 125 mM de NaCl. O rendimento do processo foi baixo de acordo com a densitometria, 41,9%, porém, o valor da quantidade relativa de rfPspA3 pode estar subestimado na fração de eluição devido à grande quantidade de proteína aplicada ao gel de eletroforese, o que resultou em uma intensidade de coloração da banda de rfPspA3 que ultrapassou a capacidade de detecção do densitômetro. Corroborando esta hipótese, pode-se observar na Figura 4.36 que todo o rfPspA3 foi recuperado na fração de eluição (300 mM de NaCl), não sendo encontrado na fração de limpeza, não havendo assim razão aparente para um rendimento tão baixo nesta cromatografia .

4.3.7.2 IMAC-Sepharose Fast-Flow carregada com Ni⁺²

Para definir as condições para realização da cromatografia de afinidade por metal empregando a IMAC-Sepharose carregada com Ni⁺², foram feitos três testes utilizando como material de partida um “pool” das frações de eluição da Q-Sepharose. A escolha da IMAC foi devida à presença da cauda de histidina presente no fragmento recombinante da PspA3 clonada na *E. coli*, ou seja, o fragmento clonado possui no início da sua sequência a presença de 6 histidinas. Esse aminoácido possui afinidade pelo Ni⁺² o que possibilita o uso da resina IMAC-Sepharose carregada com esse metal em uma etapa cromatográfica de afinidade. Foi utilizado um volume de 20 mL de resina carregada com Ni⁺², previamente equilibrada com o tampão Tris 25mM pH 8,0 contendo 5 mM de imidazol e 300mM de NaCl (usado para evitar ligações inespecíficas). As etapas cromatográficas foram feitas com 5 volumes de coluna.

Para o primeiro teste, utilizou-se como amostra um pool das frações de 250 e 300 mM de NaCl do primeiro teste da Q-sepharose. Houve um problema durante a etapa de reequilíbrio da coluna, foi adicionado em torno de 15 mL de um tampão com concentração de imidazol de 250 mM. Foi obtido um pico a 280 nm com esse tampão, esta fração foi recolhida separadamente e analisada junto com as outras etapas do processo, essa fração foi denominada “fração erro”. A Figura 4.37 mostra as etapas do processo e a análise de cada uma através do gel de eletroforese SDS-PAGE:

Figura 4.37: Fluxograma do primeiro teste de eluição em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-sepharose Fast-Flow carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada etapa do processo indicada pela seta e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e amostras anteriores a esta etapa de cromatografia que também foram analisadas e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Fração de eluição com 2 μg de proteínas totais e demais frações com 10 μg de proteínas totais.

Observa-se pela Figura 4.37 que durante a lavagem e também na fração erro houve perda de rfpSpA3, porém houve também retirada de impurezas nestas frações. Nota-se também que 250 mM de imidazol foi suficiente para recuperar toda a proteína, uma vez que sua presença não foi detectada na fração de limpeza com 1,0 M de NaCl. Calculou-se que a concentração de imidazol da fração erro foi de

aproximadamente de 15 mM devido a diluição, e como nesta concentração houve remoção importante de impurezas, um segundo processo foi testado utilizando esta concentração de imidazol na fração de lavagem e também a de 20 mM. O material de partida para este teste foi o pool das eluições com 275 e 300 mM de NaCl do segundo teste em Q-sepharose. O processo e a análise dos resultados em eletroforese SDS-PAGE estão apresentados na Figura 4.38.

Figura 4.38: Fluxograma do segundo teste de em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-sepharose FF carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração obtida indicada pela seta e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e amostras anteriores a esta etapa de cromatografia que também foram analisadas e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Fração de eluição com 2 μg de proteínas totais e demais frações com 10 μg de proteínas totais.

Segundo a Figura 4.38, em todas as etapas de lavagem houve perda de rFPspA3, sendo que, com até 15 mM de imidazol houve eluição de impurezas, mas com 20 mM houve perda da proteína relativamente pura. Assim, foi definida a etapa de lavagem com 15 mM de imidazol. Em um terceiro teste, foi realizada a eluição com menor concentração de imidazol (200 mM) na tentativa de recuperar todo rFPspA3 sem eluir a proteína de massa maior que o rFPspA3 indicada pela seta na Figura 4.38 presente na eluição com 250 mM. Nas mesmas condições dos testes

anteriores, o terceiro foi realizado utilizando como material de partida a fração de eluição do terceiro teste em Q-Sepharose. Observou-se que durante a obtenção da fração não-adsorvida um segundo pico se formava ao final desta etapa, assim, foi obtida uma fração separada desse pico para análise.

A Figura 4.39 se refere ao terceiro teste em resina IMAC-Sepharose.

Figura 4.39: Fluxograma do terceiro teste em coluna empacotada com resina de afinidade IMAC-Sepharose FF carregada com Ni^{+2} e abaixo o gel de eletroforese SDS-PAGE de cada fração indicada pela seta e P-Padrão de massa molecular (kDa). Setas azuis: entrada dos tampões e amostras anteriores a esta etapa de cromatografia que também foram analisadas e setas vermelhas: saída das frações, as quais foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Fração de eluição 1 com 1 μg e eluição 2 com 5 μg de proteínas totais e demais frações com 10 μg de proteínas totais.

De acordo com a Figura 4.39, observou-se uma perda considerável de rFPspA3 na fração não-adsorvida com 5 mM de imidazol, mas no 2º pico obtido da fração não houve presença dessa proteína (Tabela 4.11). Na fração de 15 mM de imidazol também se percebeu uma perda de rFPspA3 já observada no teste anterior. Nota-se também que foi possível recuperar toda proteína adsorvida pela resina na fração de eluição com 200 mM de imidazol. Novamente, tal como descrito no item 4.3.7.1 para a Q-Sepharose, a recuperação da rFPspA3 na fração de eluição foi baixa, mas a soma da proteína presente em todas as frações não alcança o total

aplicado à resina, possivelmente devido a erros na quantificação da rfPspA3 por densitometria (Tabela 4.11).

Tabela 4.11: Tabela de purificação de rfPspA3 do terceiro teste de dessorção com a resina IMAC-sepharose.

	PT* (mg)	Quantidade Relativa de rfPspA3 (%)**	rfPspA3 (mg)	Rendimento (%)
Eluição Q-Sepharose	71,08	80,6	57,3	100
Fração não-adsorvida	35,86	42,6	15,3	26,7
2° Pico FNA***	2,60	13,5	0,4	0,7
Lavagem 15 mM imidazol	13,28	21,5	2,9	5,0
Eluição 200 mM imidazol	22,35	86,4	19,3	33,7
Eluição 250 mM imidazol	4,61	33,3	1,5	2,6
Limpeza 500 mM imidazol	4,15	37,2	1,5	2,6

*Proteínas Totais; ** por densitometria; ***Fração Não Adsorvida

4.3.7.3 Estabelecimento da sequência das cromatografias em Q-Sepharose e IMAC-Sepharose carregada com Ni⁺²

Após estabelecer previamente as condições das cromatografias em Q e IMAC-Sepharose, foram feitos dois esquemas de purificação, detalhados na Figura 4.40 para estabelecer em qual sequência obtêm-se maior rendimento do processo. A etapa de clarificação foi feita por centrifugação.

Figura 4.40: Esquemas dos processos de purificação de rfPspA3 testados para estabelecer a sequência das etapas cromatográficas.

O lisado de células (~100 g massa úmida) obtido foi centrifugado e, após essa etapa foi dividido igualmente em dois volumes, obtendo-se assim o material de partida dos dois esquemas propostos. O volume inicial de cada teste foi de 1000 mL. O volume de coluna utilizado na cromatografia Q-sepharose foi de 250 mL, enquanto que foram utilizados 500 mL para a IMAC-Sepharose, quantidades necessárias para as duas cromatografias de acordo com a capacidade de cada resina em relação à quantidade de proteínas totais da amostra.

As condições das cromatografias estão detalhadas nas Figuras 4.41 e 4.42.

Figura 4.41: Condições da cromatografia utilizando coluna com 250 mL de Q-Sepharose Fast-Flow para estabelecer a sequência das etapas de purificação de rPspA3.

Figura 4.42: Condições da cromatografia utilizando 500 mL de IMAC-Sepharose Fast-Flow carregada com Ni^{+2} para estabelecer a sequência das etapas de purificação de rPspA3.

Foi realizada a primeira sequência utilizando a Q-Sepharose como primeira etapa cromatográfica seguida pela IMAC-Sepharose empregando as condições pré-determinadas indicadas nas Figuras 4.41 e 4.42. Observa-se no gel de eletroforese da Figura 4.43 que foram recolhidas duas frações de eluição na cromatografia com IMAC-Sepharose, pois no cromatograma apareceram dois picos que foram recolhidos separadamente.

Amostras de todas as frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) utilizando coluna em gel filtração (*high performance size exclusion chromatography*, HPSEC) para determinação da pureza. A partir desses dados foi possível montar a Tabela 4.12 com os dados de pureza do rPspA3.

Figura 4.43: Cromatogramas HPSEC e SDS-PAGE das frações da primeira sequência cromatográfica em Q-Sepharose seguida de IMAC-Sepharose. Cromatogramas em escala arbitrária: azul-Homogenato Clarificado, rosa-eluição Q, verde-pool da eluição IMAC, tempo de retenção da rfPspA3 = 11-12min. Caneletas SDS-PAGE: 1-Padrão de massa molecular (kDa); 2-Clarificado centrifugado (10 µg PT*); 3-Fração não-adsorvida Q (10 µg PT); 4-Fração de lavagem Q (10 µg PT); 5-Fração de eluição Q (5 µg PT); 6-Fração não-adsorvida IMAC (10 µg PT); 7-Fração de lavagem IMAC (10 µg PT); 8-Fração de eluição-primeira fração IMAC (2 µg PT); 9-Fração de eluição-segunda fração IMAC (5 µg PT); 10-Fração de limpeza Q (10 µg PT); 11-Fração de limpeza IMAC (10 µg PT). *PT = Proteínas totais.

Tabela 4.12: Tabela de purificação de rfPspA3 em Q-Sepharose seguida de IMAC-Sepharose.

	Proteínas Totais (mg)	P. R. ¹ rfPspA3 (%)	rfPspA3 (mg)	Recuperação de rfPspA3 (%)	Fator de Purificação
Clarificado Centrifugado	12771	6,26	1240,4**	100	1,0
Q-Sepharose	3963	28,61	1133	91,4	4,6
IMAC-Sepharose	1068	81,06	867	69,9 (76,5)*	12,9 (2,8)*

¹Pureza Relativa obtida por HPSEC

*Valores entre parênteses referem-se à recuperação e ao fator de purificação da etapa e fora, do processo todo.

** Calculado pela soma das frações não adsorvida, lavagem, eluição e limpeza devido ao fato de a concentração de rfPspA3 nessa amostra estar subestimada.

A pureza relativa obtida por HPSEC foi mais baixa que a normalmente medida por densitometria do gel de eletroforese. Isso ocorreu porque o coeficiente de extinção da rfPspA3 a 280 nm é muito baixo (1,0 g/L = 0,196, item 4.2), fazendo com que a área da rfPspA3 seja subestimada em relação à área dos outros picos obtidos no cromatograma (Figura 4.43, linha azul).

Nota-se pela Tabela 4.12 que na primeira etapa em Q-Sepharose ocorreu redução considerável da quantidade de proteínas totais na fração de eluição

(~8700 mg), obtendo-se assim bom fator de purificação (4,6). Observa-se também pela tabela que após a etapa cromatográfica de IMAC-Sepharose consegue-se obter alto grau de purificação (81,06%) com ~70% de recuperação da proteína de interesse. Porém, a pureza requerida de 95%, por se tratar de uma biomolécula para uso injetável em humanos, ainda não foi atingida.

Assim como na primeira sequência, foram utilizadas para a segunda sequência as mesmas condições cromatográficas indicadas nas Figuras 4.41 e 4.42 utilizando a resina IMAC-Sepharose carregada com Ni^{+2} como primeira etapa cromatográfica seguida da Q-Sepharose. A Figura 4.44 e a Tabela 4.13 indicam os resultados destas etapas de purificação.

Figura 4.44: Cromatogramas HPSEC e SDS-PAGE das frações da segunda sequência de cromatografias em IMAC-Sepharose seguida de Q-Sepharose. Cromatogramas em escala arbitrária: azul-Homogenato Clarificado, rosa-eluição IMAC, verde-pool da eluição Q. Caneletas SDS-PAGE: 1-Padrão de massa molecular (kDa); 2-Clarificado centrifugado (10 μg PT*); 3-Fração não-adsorvida IMAC (10 μg PT); 4-Fração de lavagem IMAC (10 μg PT); 5-Fração de eluição IMAC-Sepharose (5 μg PT); 6-Fração não-adsorvida Q (10 μg PT); 7-Fração de lavagem Q (10 μg PT); 8-Fração de eluição-primeira fração Q (2 μg PT); 9-Fração de eluição-segunda fração Q (5 μg PT); 10-Fração de limpeza IMAC (10 μg PT); 11-Fração de limpeza Q (10 μg PT). *PT = Proteínas totais.

Tabela 4.13: Tabela de purificação de rfPspA3 em IMAC-Sepharose seguida de Q-Sepharose.

	Proteínas	P. R.¹	rfPspA3	Recuperação	Fator de
	Totais (mg)	rfPspA3 (%)	(mg)	de rfPspA3 (%)	Purificação
Clarificado Centrifugado	13414	7,48	1521,5**	100	1,0
IMAC-Sepharose	2860	46,63	1334	87,7	6,4
Q-Sepharose	987	75,8	747	49,1 (56,0)*	10,1 (1,6)*

¹Pureza Relativa obtida por HPSEC*Valor entre parênteses refere-se à recuperação e ao fator de purificação da etapa e fora, do processo todo.

** Calculado pela soma das frações não adsorvida, lavagem, eluição e limpeza devido ao fato de a concentração de rfPspA3 nessa amostra estar subestimada.

Podemos observar na Figura 4.44 que mesmo após a eluição em 300 mM de NaCl da cromatografia em Q-Sepharose após a IMAC, houve presença de rfPspA3 na fração de limpeza. Isto indica a necessidade de aumentar a concentração salina para recuperar toda a proteína na fração eluída, pois como a amostra está mais pura, pode ser que a força de interação entre a proteína e a resina esteja maior, sendo assim necessária maior condutividade para que essa interação seja revertida.

Utilizando Q-Sepharose após IMAC-Sepharose, foi obtida uma recuperação mais baixa (49,1%) que a obtida pela sequência inversa (69,9%). O valor menor ocorreu, em parte, devido a partição da eluição da rfPspA3 nas frações com 300 mM (747 mg de rfPspA3) e 500 mM de NaCl (88 mg de rfPspA3). Observou-se também que utilizando IMAC-Sepharose como a primeira etapa cromatográfica obteve-se fator de purificação maior (6,4) do que quando se utilizou a Q-Sepharose (4,6). Porém, ao final da segunda etapa obteve-se uma pureza relativa de rfPspA3 ~6% maior (81,06%) na primeira sequência cromatográfica contra 75,8% da segunda sequência estudada.

4.3.8 Estudos para estabelecer a terceira etapa de purificação

Após a segunda etapa cromatográfica, a pureza requerida de 95% do rfPspA3 não foi alcançada e uma nova etapa de purificação seria necessária. Foram propostas, além da precipitação por ponto isoelétrico, 3 cromatografias com diferentes propriedades: Phenyl-Sepharose de interação hidrofóbica, Sephacryl S-200 de gel filtração e SP-Sepharose de troca catiônica. Esta última, anteriormente descartada como primeira etapa cromatográfica por necessitar de um pH de

adsorção abaixo do pI do rfPspA3, o que fazia com que a amostra precipitasse perdendo uma quantidade expressiva de rfPspA3, foi novamente cogitada após a tentativa de precipitação isoeletrica do rfPspA3.

4.3.8.1 Sephacryl S-200 HR como possível terceira etapa cromatográfica

Os testes com a Sephacryl S-200 HR foram realizados com amostras da fração de eluição da segunda cromatografia (IMAC-Sepharose). A amostra foi concentrada e dialisada com o tampão eluente (50 mM fosfato + 150 mM de NaCl) e 15 mL de amostra foi adicionada na coluna. A Figura 4.45 mostra o cromatograma (A) e as frações obtidas que foram analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (B1 e B2).

Figura 4.45: A-Cromatograma da purificação em Sephacryl S-200 HR da amostra de eluição da segunda cromatografia IMAC-Sepharose. B1 e B2-Géis de eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas a partir de 80 mL de eluição até 330 mL indicadas pelas setas em vermelho. P-Padrão de massa molecular (kDa) e 1-Amostra inicial concentrada e dialisada. Foram adicionados 5 µg de proteínas totais de todas as amostras.

Observou-se no cromatograma da Figura 4.45 a presença de um ombro antes da eluição do pico principal. A eletroforese mostrou que o ombro era de uma proteína de massa ~60 kDa, enquanto que o pico principal correspondeu ao rfPspA3, porém, não houve separação satisfatória do rfPspA3 das demais proteínas (Figura 4.45, B1 e B2). Uma possível explicação seria que as proteínas de menor peso molecular estariam agregadas. Diante desta hipótese, foi feita uma eletroforese SDS-PAGE não redutora, ou seja, sem β -mercaptoetanol (Figura 4.46) somente do pico principal do cromatograma indicado pelas duas barras vermelhas na Figura 4.45 A.

Figura 4.46: Gel de eletroforese SDS-PAGE não redutor das frações obtidas do pico principal do cromatograma (Figura 4.42 A). P-Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial concentrada e dialisada; Fr-Frações do pico principal (eluição de 124 a 194 mL) do cromatograma da Figura 4.45 A. Foram adicionados 5 μ g de proteínas totais de todas as amostras.

De acordo com a Figura 4.46 apareceram bandas em torno de 97 KDa (quadro vermelho) que não estavam presentes nos géis mostrados na Figura 4.45 B1 e B2. Essas bandas podem ser dímeros de rfPspA3 presentes na amostra, pois são em valor aproximado a 2 vezes a massa molecular rfPspA3, isto poderia explicar a presença do pico anterior ao pico majoritário da rfPspA3 no cromatograma da Figura 4.45 A.

Devido a incapacidade desta cromatografia de separar as impurezas da rfPspA3, a opção de usá-la como terceira etapa cromatográfica de purificação foi descartada. Rolland et al.⁵², em estudos com diferentes estratégias de purificação de proteínas recombinantes do vírus causador da Hepatite B, comparou ultracentrifugação ou filtração em gel como última etapa cromatográfica e mostrou que a resolução desta cromatografia é pior que a da ultracentrifugação.

4.3.8.2 Phenyl-Sepharose High Sub Fast-Flow como possível terceira etapa cromatográfica

- **Testes de adsorção em tubos**

Para os testes em adsorção em tubos foi utilizada uma amostra da eluição da segunda cromatografia, IMAC-Sepharose. Os testes foram feitos em tampão fosfato de sódio 10 mM com diferentes concentrações dos sais NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como mostra a Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Concentrações dos sais NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizados no teste de adsorção em tubos à resina Phenyl-Sepharose.

NaCl (M)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)
1,0	0,75
2,0	1,0
3,0	1,25
-	1,50

Nas concentrações de 1,25 e 1,50 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ os testes não foram realizados, pois a amostra precipitou ao adicionar o sal. Com 3 M de NaCl também não foi possível a realização do teste por este não ter dissolvido completamente na amostra. Os resultados da adsorção nas demais condições estão apresentados na Figura 4.47.

Figura 4.47: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com a resina Phenyl-Sepharose. P- Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial da eluição da IMAC-Sepharose (2ª cromatografia); 2-Fração não adsorvida com 1 M de NaCl; 3-Fração não adsorvida com 2 M de NaCl; 4-Fração não adsorvida com 0,75 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5-Fração não adsorvida com 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Foram adicionadas 15 μg de proteínas totais de todas as amostras.

De acordo com a Figura 4.47 observa-se que 1 M de NaCl não é suficiente para que todo o rfPspA3 seja adsorvido pela resina hidrofóbica. Porém, a adsorção foi semelhante nas demais condições testadas, nas quais houve também adsorção significativa das impurezas.

- **Testes de dessorção em coluna empacotada**

Foram realizados, inicialmente, dois testes: um utilizando para adsorção 2 M de NaCl e outro 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O tampão utilizado foi Tris 25 mM em pH entre 7,5-8,0 e a amostra foi a mesma utilizada para o teste de adsorção em tubos. Os resultados dos testes de dessorção estão apresentados na Figura 4.48 A e B.

Figura 4.48: Géis de eletroforese dos testes de dessorção em coluna empacotada com resina Phenyl-Sepharose High Sub Fast Flow. A-Teste realizado com NaCl: 1-Amostra inicial, eluição da segunda cromatografia: IMAC-Sepharose; 2-Fração não adsorvida; 3-Fração de eluição com 1 M de NaCl; 4-Pool das frações de eluição com 750 e 500 mM de NaCl; 5-Fração de eluição com 250 mM de NaCl e 6-Fração de eluição sem NaCl. B-Teste realizado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 7-Amostra inicial, eluição da segunda cromatografia: IMAC-Sepharose; 8-Fração não adsorvida; 9-Fração de eluição com 800 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10-Fração de eluição com 600 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 11-Fração de eluição com 400 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 12-Fração de eluição com 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 13-Fração de eluição sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e P-Padrão de massa molecular (kDa). Foram aplicados 5 μ g de proteínas totais de cada amostra. As setas vermelhas indicam as bandas de impurezas nas frações.

Observa-se pela Figura 4.48 que em nenhum dos dois testes conseguiu-se separar impurezas das frações obtidas. No teste com NaCl houve perda de rfPspA3 na fração não adsorvida indicando que 2 M de NaCl não foram suficientes para expor as partes hidrofóbicas da proteína para que ela fosse totalmente adsorvida pela resina. A fração não adsorvida no teste com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentou nenhuma impureza indicando total adsorção de todas as proteínas pela resina, e de

acordo com a Figura 4.48 B, as frações em diferentes concentrações deste sal apresentaram pelo menos uma impureza.

Diante destes resultados, foi feito outro teste com NaCl aumentando sua concentração inicial de adsorção para 2,5 M e realizando a dessorção nas concentrações de 1,5, 1,0, 0,5 e 0,0 M de NaCl no mesmo tampão e pH. Porém, da mesma maneira que o observado anteriormente com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4.48 B), não houve separação das impurezas, indicando não ser esta uma boa opção como última etapa cromatográfica.

4.3.8.3 Recuperação do rfPspA3 por precipitação isoelétrica

Precipitação isoelétrica é uma técnica de baixo custo e seletiva por valer-se do pH em que a proteína tem sua carga total nula, o que diminui sua solubilidade⁵³. Assim, o rfPspA3 seria recuperado do precipitado ressuspendendo-o o com tampão em pH 8,0. Porém, de acordo com a eletroforese apresentada na Figura 4.49, o resultado do teste de precipitação foi o contrário do esperado.

Figura 4.49: Gel de eletroforese do teste de precipitação isoelétrica com amostra purificada em duas etapas cromatográficas. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Amostra inicial em pH 8,0 (5µg de proteínas totais); S-Sobrenadante da amostra centrifugada no pH indicado (10µg de proteínas totais) e P-Precipitado da amostra centrifugada no pH indicado (10µg de proteínas totais).

De acordo com a Figura 4.49, a maior parte da proteína ficou solúvel no sobrenadante mesmo abaixo de seu pI (4,74). Segundo Lucarini, et al.⁵⁴ proteínas hidrofílicas como no caso da albumina e do rfPspA3 dificilmente precipitam totalmente em seu ponto isoelético. Porém, mesmo com a maior parte do rfPspA3

presente no sobrenadante, há uma perda desta proteína no precipitado, chegando a 12,7% com pH 3,0 e 8,8% com pH 4,5, uma perda alta (30 e 6%, respectivamente) se tratando de uma amostra com uma pureza relativa elevada (73,5%), e também não houve um aumento expressivo da pureza relativa, chegando a 82% com pH 3,0 (dados obtidos por densitometria). Alguns trabalhos adicionam componentes ou deixam as proteínas em condições mais favoráveis para que a solubilidade delas diminua em pH próximo ao pI ^{55,56}. Segundo Bramaud et al.⁵⁵, o aumento de temperatura associado a adição de ácido cítrico aumenta a formação de complexos com a proteína α -LA favorecendo a precipitação em temperaturas de 50 °C. Porém, essas técnicas aumentam a probabilidade de desnaturação protéica, isso seria prejudicial como última etapa cromatográfica, pois, a proteína poderia nessa etapa final perder sua função devido à desnaturação.

Com este resultado, a etapa de precipitação foi descartada, mas novamente foi cogitado o uso da SP-Sepharose (troca-catiônica) como terceira etapa cromatográfica, uma vez demonstrado por este teste ser possível manipular a amostra com uma pureza relativa mais alta em pH próximo ao pI .

4.3.8.4 SP-Sepharose Fast-Flow como possível terceira etapa cromatográfica

- **Testes de adsorção em tubos**

Inicialmente foram utilizadas as amostras do sobrenadante do teste de precipitação isoelétrica para adsorção em tubos com a resina SP-Sepharose. Os resultados deste teste estão apresentados na Figura 4.50.

Figura 4.50: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com resina SP-Sepharose. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Amostra inicial em pH 8,0 (5 μ g de proteínas totais); E-Amostra de entrada (inicial) no pH indicado (5 μ g de proteínas totais) e F-Fração não adsorvida em resina SP-Sepharose no pH indicado (10 μ g de proteínas totais).

A Figura 4.50 mostra que à medida que aumentou o pH da amostra houve maior presença de rfPspA3 na fração não adsorvida e menor presença de impurezas, ou seja, a adsorção de impurezas aumentou com o aumento de pH, fazendo com que a pureza relativa do rfPspA3 na fração não adsorvida aumentasse, chegando a 57,3% com pH 4,5. Porém, como a quantidade de proteínas totais presentes nestas frações não adsorvidas foi mínima ($\sim 0,04$ mg/mL), a perda de rfPspA3 também foi pequena, ficando em torno de apenas 0,6% em todas as frações.

A Figura 4.51 mostra os resultados do teste de adsorção em pH de 5,0 a 6,5.

Figura 4.51: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos com resina SP-Sepharose na faixa de pH entre 5,0 e 6,5. A-Padrão de massa molecular (kDa); B-Amostra inicial em pH 8,0 ($5\mu\text{g}$ de proteínas totais); E-Amostra de entrada (inicial) no pH indicado ($5\mu\text{g}$ de proteínas totais) e F-Fração não adsorvida em resina SP-Sepharose no pH indicado ($5\mu\text{g}$ de proteínas totais).

De acordo com a Figura 4.51 houve perda de rfPspA3 na fração não adsorvida em todos os pH. Porém, nos pH 5,5 e 6,0 houve maior retirada de impurezas, pois a pureza relativa de rfPspA3 nestas frações ficou em torno de 16%, o que significa uma perda de aproximadamente 2% de rfPspA3 nestas frações. O pH 6,0 foi escolhido para trabalho, pois, foi observada precipitação da amostra em pH 5,5 após um tempo acima de uma hora, o que não havia sido verificado na precipitação isoelétrica (item 4.3.8.3).

Sabe-se que em pH 6,0 o rfPspA3 possui carga total negativa, a mesma carga da resina. Contudo mesmo assim foi possível adsorvê-la nestas condições. Uma explicação para este fato é que apesar de a carga total deste fragmento ser negativa em pH acima de seu pI (4,74), a região “coiled-coil” da proteína possui carga positiva até pH 6,9. De acordo com a análise desta parte da sequência da proteína, correspondente a região enovelada, pelo site da Scripps Researchs

Institute⁵⁷ constatou-se que em pH 6,0 o valor da carga teórica dessa região protéica é aproximadamente 4,0 positivo, sendo que o fragmento inteiro possui valor de carga total de 16,8 negativo neste mesmo pH. Este fato foi observado por Jedrzejask et al.¹², ele mostrou as diferenças de distribuição eletrostática do fragmento recombinante de PspA (Figura 4.52), semelhante ao fragmento deste trabalho.

Figura 4.52: Estrutura tridimensional do fragmento protéico da PspA estudado por Jedrzejask et al.¹². A parte vermelha enovelada corresponde à magnitude da potência eletrostática negativa e a azul, região rica em prolina, positiva.

Definido o pH 6,0, foram realizados testes de adsorção neste pH com diferentes concentrações de NaCl, de 10 a 100 mM. A Figura 4.53 apresenta os resultados deste teste.

Figura 4.53: Gel de eletroforese do teste de adsorção em tubos à resina SP-Sepharose em diferentes concentrações de NaCl à pH 6,0. P-Padrão de massa molecular (kDa); A-Amostra inicial (2 µg de proteínas totais); 1-8-Frações não-adsorvidas (em todas 2 µg de proteínas totais) com: 1-10mM de NaCl; 2-20mM de NaCl; 3-30mM de NaCl; 4-40mM de NaCl; 5-50mM de NaCl; 6-70mM de NaCl; 7-90mM de NaCl; 8-100mM de NaCl.

Através desta figura, nota-se que um pequeno aumento na força iônica foi suficiente para que o rfPspA3 perdesse sua interação com a resina. Apesar de haver perda, mesmo com 10 mM de NaCl (~6,0%), foi decidido realizar a adsorção nesta

concentração na coluna, pois, há também na fração não adsorvida diversas impurezas, o que justificaria a perda do rfPspA3 caso houvesse ganho em pureza.

- **Testes de dessorção em coluna empacotada**

Foram realizados os seguintes testes de eluição:

1. por sal em tampão Tris 25 mM pH 6,0
2. por pH em tampão Tris 25 mM pH 7,0 a 8,0
3. por sal e pH em tampão Tris 25 mM pH 7,0
4. a pH 7,0 em tampão fosfato com ou sem NaCl

Para eluição por sal foram empregadas as concentrações de 70, 100 e 150 mM NaCl e para eluição por pH foi utilizado tampão histidina 20 mM pH 6,0 com 10 mM de NaCl para carregar a resina e tampão Tris 25 mM para a eluição. No primeiro teste observou-se que 150 mM de NaCl não foi suficiente para eluir todo o rfPspA3, uma vez que houve presença desta proteína na fração de limpeza com 500 mM de NaCl. No segundo teste, conseguiu-se recuperar quase toda proteína em pH 8,0, porém ainda houve presença desta na fração de limpeza. Durante este teste foi observado que a entrada da amostra com 10 mM de NaCl em tampão histidina 20 mM pH 6,0 estava provocando perda de rfPspA3 na fração não adsorvida, por isso decidiu-se equilibrar a coluna com tampão histidina 20 mM sem NaCl, ajustando a amostra para a mesma condutividade do tampão de equilíbrio.

No terceiro teste a eluição foi feita com tampão Tris 25 mM pH 7,0 na presença de 40, 60, 80 e 100 mM de NaCl. Neste teste foi inserida uma etapa de lavagem com o tampão de histidina 20 mM pH 6,0 + 10 mM de NaCl, mesmo tampão utilizado para equilíbrio nos testes anteriores. A Figura 4.54 mostra o resultado deste teste.

Figura 4.54: Gel de eletroforese do terceiro teste de eluição em coluna empacotada com resina SP-Sepharose Fast Flow em pH 7,0 com diferentes concentrações de NaCl. P-Padrão de massa molar (kDa); 1-Amostra inicial, eluição da segunda cromatografia: IMAC-Sepharose; 2-Fração não adsorvida; 3-Fração de lavagem em pH 6,0 com 10 mM de NaCl; 4- Fração de eluição em pH 7,0 com 40 mM de NaCl; 5- Fração de eluição em pH 7,0 com 60 mM de NaCl; 6- Fração de eluição em pH 7,0 com 100 mM de NaCl e 7- Fração de limpeza em pH 8,0 com 500 mM de NaCl. Foram adicionados 5µg de proteínas totais de todas as amostras.

Verificou-se na Figura 4.54 que na fração não adsorvida houve eliminação de impurezas, o que não aconteceu na fração de lavagem (caneleta 3), onde não houve retirada de impurezas que justificasse a perda de rfPspA3 nesta fração. Observou-se também que a eluição com tampão Tris 25 mM pH 7,0 + 60 mM de NaCl (caneleta 5) possibilitou a recuperação da proteína sem impurezas, o que não aconteceu na fração com 100 mM de NaCl (caneleta 6). Assim, o tampão com Tris 25 mM pH 7,0 + 60 mM de NaCl foi definido para eluição da SP-Sepharose. Porém, novas tentativas foram feitas para a troca do tampão Tris 25 mM para fosfato 50 mM, pois o tampão Tris utilizado não teve força tamponante suficiente para segurar o pH em 7,0.

Assim, para o quarto teste as seguintes frações de eluição foram obtidas: tampão fosfato 50 mM pH 7,0 com 0, 15, 30 e 40 mM de NaCl. A condutividade do tampão fosfato 50 mM sem NaCl foi suficiente para recuperar o rfPspA3. Devido a eluição de algumas impurezas junto com o rfPspA3, tentou-se diminuir a concentração de fosfato na tentativa de recuperá-la mais pura. Os valores de tampão fosfato pH 7,0 utilizados foram 50, 40, 30 e 20 mM. O resultado deste último teste está representado no gel de eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.55.

Figura 4.55: Gel de eletroforese do teste de eluição com diferentes concentrações de tampão fosfato pH 7,0 em coluna empacotada com resina SP-Sepharose Fast Flow. P-Padrão de massa molar (kDa); 1-Amostra inicial, eluição da segunda cromatografia: IMAC-Sepharose; 2-Fração não adsorvida; 3-Fração de eluição em pH 7,0 com 20 mM de tampão fosfato; 4- Fração de eluição em pH 7,0 com 30 mM de tampão fosfato; 5- Fração de eluição em pH 7,0 com 40 mM de tampão fosfato; 6- Fração de eluição em pH 7,0 com 50 mM de tampão fosfato e 7-Fração de limpeza em Tris pH 8,0 com 500 mM de NaCl. Foram adicionados 5µg de proteínas totais de todas as amostras.

De acordo com a Figura 4.55, observou-se que 30 mM de tampão fosfato pH 7,0 foi suficiente para recuperar a maior parte do rFPspA3 nesta etapa (73%), com uma pureza relativa de 93,5%. Pela densitometria do gel, observou-se a presença de rFPspA3 também nas frações não adsorvida e com 40 mM e 50 mM de fosfato pH 7,0 que somadas representariam 27% de perdas.

Deste modo, foi definida como terceira etapa cromatográfica a resina de troca catiônica SP-Sepharose, pois entre as 3 resinas propostas para esta etapa, ela foi a que melhor purificou a amostra de rFPspA3. Esta etapa cromatográfica foi definida nas condições apresentadas na Figura 4.56.

Figura 4.56: Condições da cromatografia em SP-Sepharose Fast-Flow determinada como última etapa cromatográfica da sequência de purificação de rFPspA3.

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE A PURIFICAÇÃO DO rfPspA3 OBTIDO EM CULTIVOS DE ALTA DENSIDADE COM GLICOSE E COM GLICEROL

A Figura 4.57 apresenta a sequência de cromatografias definida para a purificação do rfPspA3.

Figura 4.57: Fluxograma das etapas cromatográficas definidas para purificação de rfPspA3.

Uma vez definidas as condições de cada cromatografia, todo o processo de purificação foi realizado com amostras oriundas dos cultivos em alta densidade com glicose e com glicerol como fonte de carbono.

Para a purificação a partir do cultivo com glicose foi utilizada a fração de eluição da IMAC-Sepharose como segunda cromatografia, obtida como descrito no item 4.3.7.3 (Tabela 4.12). A amostra foi dialisada por 24 horas e histidina 1 M foi empregada para ajustar o pH para 6,0 e a condutividade após diálise, de acordo com o tampão de equilíbrio da SP-Sepharose (histidina 20 mM pH 6,0).

Com o clarificado do cultivo com glicerol foi realizada a cromatografia em Q-Sepharose nas mesmas condições empregadas para o material proveniente do cultivo com glicose. Com a definição da SP-Sepharose como última etapa cromatográfica e, como esta necessita de baixa condutividade na adsorção, foi realizada a eluição da segunda cromatografia em IMAC-Sepharose sem adição de NaCl a fim de evitar a etapa adicional de diálise. Para diminuir a condutividade da fração de eluição com imidazol 200 mM sem sal, foi inserida uma nova etapa com 1 volume de coluna de tampão Tris 25 mM pH 8,0, denominada pós-lavagem.

A Figura 4.58 mostra as etapas de purificação realizadas e as condições nas quais foram feitas a partir da lise celular.

Figura 4.58: Fluxograma das etapas de purificação realizadas e suas respectivas condições de eluição para purificação do rPspA3.

As Figuras 4.59 a 4.61 apresentam as eletroforeses SDS-PAGE das frações obtidas das etapas cromatográficas mostradas na Figura 4.58.

Figura 4.59: Géis de eletroforese SDS-PAGE da primeira cromatografia Q-Sepharose utilizando o clarificado obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono (A) e glicerol (B). P-Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial, clarificado centrifugado; 2-Fração não adsorvida; 3-Fração de lavagem com 100 mM de NaCl; 4-Fração de eluição com 300 mM de NaCl e 5-Fração de limpeza com 500 mM de NaCl. Foram adicionados 10 µg de proteínas totais de todas as amostras com exceção das frações de eluição (5 µg).

Figura 4.60: Géis de eletroforese SDS-PAGE da segunda cromatografia IMAC-Sepharose utilizando o clarificado obtido do cultivo com glicose (A) e glicerol (B). P-Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial, eluição da Q-Sepharose; 2-Fração não adsorvida; 3-Fração de lavagem com 15 mM de Imidazol; 4-Fração de eluição do primeiro pico com 200 mM de Imidazol; 5-Fração de eluição do segundo pico com 200 mM de Imidazol; 6-Fração de limpeza com 500 mM de imidazol; 7-Amostra inicial, eluição da Q-Sepharose; 8-Fração não adsorvida; 9-Fração de lavagem com 7 mM de Imidazol 10-Fração da pós-lavagem com tampão Tris 25 mM pH 8,0; 11-Fração de eluição com 200 mM de Imidazol e 12-Fração de limpeza com 500 mM de imidazol. Foram adicionados 10 µg de proteínas totais de todas as amostras com exceção das frações de eluição e pós-lavagem (5 µg).

Figura 4.61: Géis de eletroforese SDS-PAGE da terceira cromatografia SP-Sepharose utilizando o clarificado obtido do cultivo com glicose como fonte de carbono (A) e glicerol (B). P- Padrão de massa molecular (kDa); 1-Amostra inicial, eluição da IMAC-Sepharose; 2- Fração não adsorvida; 3-Pico da fração não adsorvida; 4-Fração de eluição com tampão fosfato 30 mM pH 7,0; 5- Fração de limpeza com 500 mM de NaCl em pH 8,0; 6-Amostra inicial, eluição da IMAC-Sepharose; 7-Fração não adsorvida; 8-Pico da fração não adsorvida; 9-Primeiro pico da fração de eluição com tampão fosfato 30 mM pH 7,0; 10- Fração de eluição com tampão fosfato 30 mM pH 7,0 e 11-Fração de limpeza com 500 mM de NaCl em pH 8,0. Foram adicionados 5 µg de proteínas totais de todas as amostras com exceção das frações de eluição (3 µg) e não adsorvida (10 µg).

De acordo com as figuras, observa-se que na primeira cromatografia em Q-Sepharose (Figura 4.59) obteve-se purificação semelhante para os dois clarificados, retirando os mesmos contaminantes e apresentando o mesmo perfil, apesar da enorme quantidade de proteínas nas frações. Na segunda cromatografia (IMAC-Sepharose, Figura 4.60) houve também certa semelhança no perfil das eletroforeses. Com a purificação a partir do cultivo com glicose como fonte de carbono foram obtidas duas frações na eluição. Verifica-se que na segunda fração de eluição (Figura 4.60A – caneleta 5) foram encontradas poucas impurezas de peso molecular menor que o rfPspA3, estas mesmas impurezas foram notadas também na fração de eluição da purificação de IMAC-Sepharose a partir do cultivo com glicerol (Figura 4.60B – caneleta 11). Durante a etapa de pós-lavagem, um pico foi eluído no momento exato de queda da condutividade. Esse pico foi coletado separadamente para análise (Figura 4.60B – caneleta 9). Verificou-se a presença de rfPspA3 nesta fração, porém houve retirada de muitos contaminantes, como mostra a figura.

Na Figura 4.61 A e B estão apresentadas as eletroforeses das frações da última etapa cromatográfica SP-Sepharose. Durante o final da coleta das frações não adsorvidas observou-se a formação de um pico com as duas amostras. Esta fração foi coletada separadamente para análise em eletroforese (caneletas 3 e 8). Observou-se que, apesar da forte presença de rfPspA3, impurezas também foram

eluídas nesta fração. Observou-se também que a presença desta proteína na fração não adsorvida (caneletas 2 e 7) foi mais intensa na purificação da amostra proveniente do cultivo de glicose que do cultivo de glicerol, porém o contrário acontece na fração de limpeza (caneletas 5 da Figura 4.61A e 11 da Figura 4.61B). Nestas figuras pode-se verificar a presença de rfPspA3 em quase todas as frações, indicando perda da proteína de interesse. Este fato pode ser explicado devido à presença de duas regiões de cargas opostas no rfPspA3 (Figura 4.52), dificultando a interação entre a proteína e a resina em pH 6,0 e a eluição em pH 7,0. As perdas verificadas nesta cromatografia foram necessárias para separar as impurezas presentes na amostra inicial do rfPspA3. Os dados de pureza relativa foram calculados através do HPSEC. As Figuras 4.62 e 4.63 apresentam os cromatogramas das purificações provenientes das amostras dos cultivos de glicose e glicerol, respectivamente e as Tabelas 4.15 e 4.16 mostram os resultados dos fatores de purificação.

Figura 4.62: Cromatogramas do clarificado centrifugado e frações de eluição das etapas cromatográficas de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono. Cromatogramas em escala arbitrária: azul-Homogenato Clarificado, rosa-eluição Q, verde-pool da eluição IMAC, preto-eluição SP, tempo de retenção da rfPspA3 = 11-12min.

Tabela 4.15: Tabela de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicose como fonte de carbono.

	Proteínas Totais (mg)	P. R. ¹ rfPspA3 (%)	rfPspA3 (mg)	Recuperação de rfPspA3 (%)	Fator de Purificação
Clarificado Centrifugado	12771	6,26	1240,4**	100	1,0
Q-Sepharose	3963	28,61	1133	91,4	4,6
IMAC-Sepharose	1068	81,06	867	69,9 (76,5)*	12,9 (2,8)*
SP-Sepharose	270,2***	65,0	175,6	34,5 (49,4)*	10,4 (0,8)*

¹Pureza Relativa obtida por HPSEC

*Valor entre parênteses refere-se à recuperação e ao fator de purificação da etapa e fora, do processo todo.

**Calculado pela soma das frações não adsorvida, lavagem, eluição e limpeza devido ao fato de a concentração de rfPspA3 nessa amostra estar subestimada.

***441mg de proteínas totais da fração de eluição obtida da IMAC-Sepharose foram aplicados à SP-Sepharose e os cálculos de recuperação foram baseados nesse valor.

Figura 4.63: Cromatogramas do clarificado centrifugado e frações de eluição das etapas cromatográficas de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicerol como fonte de carbono. Cromatogramas em escala arbitrária: azul-Homogenato Clarificado, rosa-eluição Q, verde-pool da eluição IMAC, preto-eluição SP, tempo de retenção da rfPspA3 = 11-12min.

Tabela 4.16: Tabela de purificação da amostra proveniente do cultivo em alta densidade com glicerol como fonte de carbono.

	Proteínas Totais (mg)	P. R.¹ rfPspA3 (%)	rfPspA3 (mg)	Recuperação de rfPspA3 (%)	Fator de Purificação
Clarificado Centrifugado	15476	6,5	1234,8**	100	1,0
Q-Sepharose	4939,6	25,0	1234,8	100**	3,8
IMAC-Sepharose	1342	66,4	891,1	72,2	10,2 (2,7)*
SP-Sepharose	387	90,6	350,7	28,4 (39,4)*	13,9 (1,4)*

¹Pureza Relativa obtida por HPSEC

*Valores entre parênteses referem-se à recuperação e ao fator de purificação da etapa e fora, do processo todo.

**O valor da primeira cromatografia foi considerado 100% devido ao fato de a concentração de rfPspA3 nessa amostra estar subestimada.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que houve perda elevada de rfPspA3 na última cromatografia realizada em SP-Sepharose com as duas amostras utilizadas. Este fato pode ser verificado nas eletroforeses da Figura 4.61 A e B e também nas Tabelas 4.15 e 4.16. Esta etapa cromatográfica não reproduziu o teste de adsorção realizado anteriormente (Figura 4.55). Com estes resultados não se pode descartar o uso desta cromatografia, mas novos testes mostram-se necessários para melhorar a recuperação do rfPspA3.

Observou-se também que os resultados da cromatografia em Q-Sepharose foram semelhantes, não demonstrando interferência da fonte de carbono usada no cultivo sobre a purificação. Na cromatografia em IMAC-Sepharose, o fator de purificação foi menor para o material proveniente do cultivo com glicerol, provavelmente porque uma concentração menor de imidazol foi empregada na etapa de lavagem (7 mM contra 15 mM para o material do cultivo com glicose). Na terceira cromatografia realizada, SP-Sepharose, utilizando a amostra provinda do cultivo com glicose como fonte de carbono, a pureza relativa do rfPspA3 foi reduzida drasticamente para 65,0%. A redução da pureza relativa foi devido ao aparecimento de um pico com tempo de retenção de ~21 min na análise por HPSEC (Figura 4.62 – linha preta). Este pico não foi verificado na eluição da IMAC-Sepharose (Figura 4.62, linha verde), o que poderia representar degradação do rfPspA3. Um pico com o mesmo tempo de retenção, porém com menor área, também foi verificado com a amostra purificada do cultivo com glicerol (Figura 4.63 – linha preta).

Ao analisar a fração de eluição da SP-Sepharose por HPSEC sem levar em consideração a área do pico de ~21 min, o valor da pureza relativa chega a 90,1%, obtendo-se uma recuperação de 48% do rfPspA3 a partir do cultivo com glicose. Ao

analisar as frações de eluição dos géis de eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.61 por densitometria os seguintes valores de pureza relativa foram obtidos: 93,4 e 86,9% das amostras providas dos cultivos com glicose e glicerol como fonte de carbono, respectivamente.

Diferentes concentrações da fração de eluição da SP-Sepharose da amostra provida do cultivo com glicerol foram aplicadas a um gel de eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.64) e a pureza relativa dessas amostras foi analisada por densitometria (Tabela 4.17).

Figura 4.64: Gel de eletroforese SDS-PAGE da fração de eluição da SP-Sepharose Fast Flow obtida da produção com glicerol como fonte de carbono em diferentes quantidades de proteínas totais. P-Padrão de massa molecular (kDa); 1- 1 μ g de proteínas totais; 2- 2 μ g de proteínas totais; 3- 3 μ g de proteínas totais; 4- 4 μ g de proteínas totais e 5- 5 μ g de proteínas totais.

Tabela 4.17: Pureza relativa do rfPspA3 purificado a partir do cultivo com glicerol.

Proteínas Totais (μ g)	Pureza relativa de rfPspA3 (%)
1	93,7
2	93,0
3	91,4
4	93,2
5	90,6

De acordo com os resultados obtidos observou-se que a pureza relativa diminuiu à medida que aumentou a quantidade de proteínas totais aplicadas ao gel, como já era esperado. A pureza requerida para uma proteína recombinante em *E. coli* é de 95%, o que não foi alcançado por este trabalho. Entretanto, a densidade da banda de rfPspA3 obtida com 1 μ g de proteína total estava próxima ao limite de detecção do equipamento, portanto o valor de pureza relativa poderia estar subestimado acima de 2 μ g.

4.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DO rfPspA3 PURIFICADO

A amostra de rfPspA3 da fração de eluição da cromatografia SP-Sepharose proveniente do cultivo com glicerol foi analisada por dicroísmo circular (CD). Esta fração foi escolhida por estar em maior concentração e pureza. A obtenção do espectro foi realizada na faixa de 185-280 nm em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), com uma solução protéica de 0,33 mg/mL, o que corresponde a $\sim 8,5\ \mu\text{M}$. O resultado está apresentado na Figura 4.65.

Figura 4.65: Espectro CD do rfPspA3 purificado a partir do cultivo com glicerol.

De acordo com a Figura 4.65, o rfPspA3 purificado possui estrutura secundária α -helicoidal sem presença de β -sheet⁴². Jedrzejask et al.¹² estudando diversas construções de PspA encontrou em uma destas construções (Rx1314MI) o mesmo perfil de espectro de CD encontrado neste trabalho como mostra a Figura 4.66.

Figura 4.66: Espectro de CD obtido nas construções de PspA Rx1314 (----) e Rx1314MI (—) segundo Jedrzejask et al.¹².

Segundo este autor, esse perfil refere-se a uma estrutura α -helicoidal tendo uma conformação “coiled-coil” como mostra a Figura 4.52. Assim, devido a similaridade entre os cromatogramas confirma-se a estrutura do rfPspA3 deste trabalho.

4.6 PONTOS IMPORTANTES DURANTE O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

4.6.1 Em relação à manipulação do rfPspA3

Durante o processo de purificação do rfPspA3 cuidados devem ser tomados a fim de evitar, principalmente, sua precipitação. Como constatado nos testes utilizando diferentes pH, pH abaixo de 6,0 favorece sua precipitação, assim, a exposição dessa proteína em pH baixo deve ser evitada. Foi observado também que, mesmo em pH 6,0, a precipitação desta proteína pode ocorrer quando esta permanece um tempo longo neste pH. Assim, etapas que exigem o ajuste de pH para 6,0 devem ser realizadas rapidamente. O exposição dessa proteína a pH 6,0 parece também favorecer a agregação de proteínas, este fato foi observado durante as primeiras etapas de purificação. Além disso, segundo González et al.⁵⁸, a presença do detergente Triton X-100 favorece a agregação de proteínas com alta expressão com proteínas da parede celular lisada da bactéria.

Outro fator que favorece a precipitação de rfPspA3 é o congelamento da amostra. Ao estocar algumas frações purificadas dessa proteína em tampão Tris 25 mM pH 8,0 à -20 °C verificou-se que houve precipitação de grande parte do rfPspA3 ao descongelar a amostra.

4.6.2 Em relação aos aspectos econômicos do processo

Em processos onde se visa a ampliação de escala um ponto importante deve ser considerado: a integração dos processos de produção e purificação (up e downstream)⁵⁹. Devido à enorme possibilidade de estratégias de purificação, a sequência das etapas escolhidas é importante, pois ela influencia no tempo exigido para o processo, o que também vai ser refletido no custo. Minimizar custos é importante principalmente na etapa de purificação que normalmente corresponde a mais de 70% do custo do processo.

Na etapa de clarificação foi observado que mesmo a filtração tangencial sendo uma opção mais barata, a perda do produto de interesse (~30%) foi muito alta para a primeira etapa do processo. Apesar de a centrífuga ser um equipamento caro, há pouca manutenção, não provocou perdas do produto de interesse, tem um

tempo longo de vida (enquanto que a fibra-oca deve ser trocada regularmente), além de o seu manuseio ser simples.

Algumas escolhas feitas para o processo de purificação do rPspA3 foram importantes para redução do custo do processo, como no caso do uso da IMAC-Sepharose como segunda cromatografia. Durante os trabalhos foi observado que a resina da primeira etapa cromatográfica tem seu tempo de vida reduzido devido à quantidade de subprodutos presentes no material de partida, assim, o emprego da Q-Sepharose como primeira etapa cromatográfica reduziria o custo total do processo de purificação, uma vez que seu valor é bem mais baixo que o da IMAC-Sepharose, em torno de 72% mais barata⁶⁰.

Para a terceira etapa cromatográfica, o uso da SP-Sepharose também foi conveniente, pois, empregou-se baixa concentração de sal na eluição e a proteína foi obtida em pH neutro e sem necessitar de ajustes para a realização das etapas de conjugação que se seguirão para elaboração da vacina. Além disso, esta é uma resina relativamente barata, o mesmo valor que a Q-Sepharose e em torno de 30% mais barata que a Phenyl-Sepharose High Sub Fast Flow e que a Sephacryl S-200 HR⁶⁰.

5 CONCLUSÕES

A inserção do fragmento do gene *pspA3* no plasmídeo pET37b⁺ gerou uma construção estável em *E. coli* BL21(DE3), pois >88% das colônias apresentaram-se resistentes à kanamicina durante os cultivos em frascos agitados, descontínuos e em alta densidade. Houve produção protéica considerável, chegando a 3,4 g/L, e sem que houvesse escape do rPspA3 antes da adição do indutor nos cultivos utilizando glicose como fonte de carbono.

Os cultivos em alta densidade proporcionaram produtividade celular 3,0 vezes maiores do que o cultivo descontínuo com glicose como fonte de carbono e 2,5 vezes do que o cultivo com glicerol, alcançando produção volumétrica de ~62 g/L de massa seca (DO_{600nm} ~148) em ambos os cultivos.

Nos cultivos descontínuos, ao utilizar glicose como fonte de carbono, foi obtida produção volumétrica de rPspA3 35% maior que ao utilizar glicerol (0,72 g/L contra 0,47 g/L, respectivamente). Nos cultivos descontínuos alimentados a produção volumétrica com glicose foi 12,0% maior que com glicerol, atingindo, respectivamente, 3,4 g/L e 3,0 g/L de rPspA3.

A produtividade de rPspA3 no cultivo em alta densidade foi 2,4 vezes maior que no cultivo descontínuo com glicose, aumentando de 0,05 g/L.h para 0,12 g/L.h. Para os cultivos com glicerol, a produtividade aumentou 3,0 vezes, passando de 0,03 g/L.h no cultivo descontínuo para 0,09 g/L.h no cultivo em alta densidade.

O fragmento recombinante da PspA3 apresentou alta solubilidade em tampão Tris 25 mM pH 8,0, mas precipitou à medida em que o pH se aproximou de seu *pI* teórico (4,74), o que dificultou o desenvolvimento de etapas de purificação que exigissem pH abaixo de 5,5.

A análise da lise celular demonstrou que 10 minutos de lise (10 ciclos) em homogeneizador contínuo de alta pressão foi suficiente para obter o máximo de lise celular. Com seis minutos observou-se o início do patamar para a lise do material proveniente do cultivo de alta densidade com glicose. Para a lise do material obtido com glicerol, o patamar foi atingido em sete minutos. Foi obtida 96,7 e 92,7% de eficiência para as lises do cultivo com glicose e glicerol, respectivamente. A amostra inicial da lise do cultivo com glicerol apresentou o dobro de células que a amostra do cultivo com glicose, indicando que o glicerol teve a função de crioprotetor durante o

congelamento. A concentração de proteínas totais obtida durante o processo de lise foi semelhante para as duas amostras, confirmando a hipótese anterior. Conclui-se também por este trabalho que é possível acompanhar resultados da lise celular mecânica por técnicas simples como as utilizadas neste trabalho.

Na etapa de clarificação uma maior retirada de impurezas foi obtida ao utilizar micro/ultrafiltração tangencial em fibra-oca em lugar da centrifugação, porém, a perda de rfPspA3 no material retido foi muito alta e, além disso, o volume de amostra foi diluído cerca de 3 vezes. Assim, apesar da centrifugação não ter se mostrado capaz de remover quantidade expressiva de impurezas do homogenato, não promoveu a diluição e não ocasionou perdas da proteína de interesse.

Nas etapas cromatográficas, a sequência com Q-Sepharose seguida da IMAC-Sepharose apresentou melhor rendimento e maior pureza relativa do rfPspA3 (69,9% e 81,06%, respectivamente) em relação à sequência inversa (49,1% e 75,8%, respectivamente), consequentemente, maior fator de purificação, chegando à 12,9 na primeira sequência contra 10,1 na segunda. Além disso, a resina Q-Sepharose como primeira etapa reduziria também o custo total do processo.

Para a terceira etapa de purificação, necessária para chegar-se à pureza requerida, a cromatografia de troca catiônica utilizando a resina SP-Sepharose demonstrou ser a mais indicada pelos testes prévios realizados. Porém, durante a purificação o processo não foi reprodutível, ocasionando perdas elevadas de rfPspA3 (~30%) e baixa recuperação desta proteína (~30%), indicando ser necessário o refinamento desta última etapa para evitar estas perdas.

De acordo com os resultados da primeira etapa de purificação (Q-Sepharose) realizada utilizando amostras obtidas do cultivo com glicose e com glicerol como fontes de carbono, houve semelhança nos parâmetros de purificação, indicando que não houve interferência direta do processo de produção (cultivo) nesta etapa.

Por fim, este trabalho contribuiu em vários aspectos da produção e purificação do rfPspA3, pois definiu estratégias de produção em cultivo de alta densidade, determinou condições de purificação e estabeleceu a sequência das etapas cromatográficas. Deste modo, caso novas construções dessa proteína fossem feitas sem cauda de histidina, poderíamos empregar como ponto de partida as diversas cromatografias estudadas para realizar a purificação do fragmento de PspA3 sem o uso da resina de afinidade por metal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 KAMERLING J. P. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In: TOMASZ, A. (Ed.). ***Streptococcus pneumoniae Molecular Biology and Mechanisms of Disease***. New York: Mary Ann Liebert Publishers Inc., p. 81-114, 2000.
- 2 PNEUMOADIP. **Diseases & Vaccines**. Disponível em: <<http://www.preventpneumo.org/diseases/>>. Acesso em: 25 fev. 2009.
- 3 ORGANIZACIÓN PAN-AMERICANA DE LA SALUD. Informe Regional de Sireva II. **Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores, 2000-2005**. Washington, D.C.: OPS, 2007. (Documentos Técnicos. Tecnologías Esenciales de Salud. THS/EV-2007/002).
- 4 VELASCO, E. A.; VERHEUL, A. F. M.; VERHOEL, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 591-503, 1995.
- 5 BRILES, D. E.; HOLLINSHEAD S.; NABORS G. S.; PATON J. C.; BROOKS-WALTER A. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v.19, p. S87-S95, 2001.
- 6 BRILES, D. E.; HOLLINSHEAD S.; SWIATLO E.; BROOKS-WALTER A.; SZALAI A.; VIROLAINEN A.; MCDANIEL L. S.; BENTON K.; White, P.; Prellner, K.; Hermansson, A.; AERTS P. C.; DIJK H. V.; CRAIN M. J. PspA and PspC: Their potential for use as pneumococcal vaccines. **Microbial Drug Resistance**, v. 3, n.4, p. 401-408, 1997.
- 7 BRILES, D. E.; HOLLINSHEAD S.; BROOKS-WALTER A.; NABORS G. S.; FERGUSON L.; SCHILLING M.; GRAVENSTEIN S.; BRAUN P.; KING J.; SWIFT A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, p. 1707-1711, 2000.
- 8 BRILES, D. E.; TART, R. C.; SWIATLO, E.; DILLARD, J. P.; SMITH, P.; BENTON, K. A.; RALPH, B. A.; BROOKS-WALTER, A.; CRAIN, M. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; MCDANIEL, L. S. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on Pneumococcal surface protein A (PspA). **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 645-657, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

-
- 9 YOTHER, J.; LEOPOLD, K.; WHITE, J.; FISCHER, W. Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 8, p. 2093-2101, 1998.
- 10 YOTHER, J.; BRILLES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analyses. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 601-609, 1992.
- 11 HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5889-5900, 2000.
- 12 JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of Pneumococcal surface protein A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, 33121-33128, 2001.
- 13 GRANDICS, P.; SZATHMARY, S.; SZATHMARY, Z.; O'NEILL, T. Integration of cell culture with continuous, on line sterile downstream process. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 646, p. 322-333, 1991.
- 14 RIESENBERG, R.; GUTHKE, R. High cell density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 422-430, 1999.
- 15 SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development - review. **Biotechnology Advances**, p. 345-357, v. 23, 2005.
- 16 LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* – reviews. **Tibtech**, v. 14, p. 98-105, 1996.
- 17 RAVI, G.; ELLA, K.; NARASU, M. L. Development of pilot scale production process and characterization of a recombinant multi-epitope malarial vaccine candidate FALVAC-1A expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 61, p. 57-64, 2008.
- 18 SHI, Y. P.; DAS P.; HOLLOWAY, B.; UDHAYAKUMAR, V.; TONGREN, J. E.; CANDAL, F.; BISWAS, S.; AHMAD, R.; HASNAIN, S. E.; LAL, A. A. Development expression and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 18, p. 2902-2914, 2000.
- 19 ZHOU, Z.; SCHNAKE, P.; XIAO, L.; LAL, A. A. Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 87-94, 2004.
- 20 SUÁREZ, D. C.; KILIKIAN B. V. Acid acetic accumulation in aerobic growth of recombinant *E. coli*. **Process Biochemistry**, p. 1051-1055, v. 35, 2000.

-
- 21 DE MEY, M.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 689-700, 2007.
- 22 GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal of Biotechnology**, v.60, p. 47-54, 1998.
- 23 KILIKIAN B. V. et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *E. coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1019-1025, 2000.
- 24 PINSACH, J.; MAS, C.; LÓPEZ-SANTÍN, J. Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein productions in *Escherichia coli*: application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 181-187, 2008.
- 25 LEE, J.; SARASWAT, V.; KOH, I.; SONG, K. B.; PARK, Y. H.; RHEE, S. K. Secretory production of *Artrobacter* levan fructotransferase from recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 127-132, 2001.
- 26 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Aula expositiva: controle da expressão gênica em procariontes**. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupo7/iniciar/aulaexp/exp1-2.html>>. Acesso em: 20 mar. 2007.
- 27 **pET System Manual**. NOVAGEN. 11. ed. Darmstadt: EMD Biosciences, 2003, p. 11.
- 28 SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York: Springer Verlag, 1994.
- 29 WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification: desing and scale up of downstream processing**. Munich: Hanser Publishers, 1991.
- 30 DE OLIVEIRA, J. E.; SOARES, C. R.; PERONI, C. N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I. M.; MORGANTI, L.; BELLINI, M. H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R. R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. **Journal of Chromatography A**, v. 852, p. 441-450, 1999.
- 31 SILVA, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; MIYAJI, E. N.; HO, P. L.; LEITE, L. C.; LOPES, A. P. Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 146-154, 2007.

-
- 32 ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. **Wiley InterScience**, v. 22, p. 65-76, 2008.
- 33 SILVA JR., J. G. **Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.
- 34 WOO-SEOK, C.; MIDDELBERG, A. P. J. Direct chemical extraction of a recombinant viral coat protein from *Escherichia coli* at high cell density. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 4, p. 451-455, 2001.
- 35 XINDU, G.; LILI, W. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs – review. **Journal of Chromatography B**, v. 866, p. 133-153, 2008.
- 36 IUT PROVENCE ARLES. **Protéine composition: M.M, pl, composition, titrate**. Disponível em: <<http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/cgi-w3bb/a-compo-p.pl>>. Acesso em: 13 fev. 2008.
- 37 SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; MCCARTHY, J. E. G.; DECKWER, W. D.; RINAS, U. Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 10. p. 947-953, 1995.
- 38 AMERSHAM BIOSCIENCES HANDBOOK. **Hydrophobic interaction chromatography: principles and methods**. AB ed. San Francisco: Amersham pharmacia Biotech, 1993.
- 39 LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, R. H. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- 40 LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 47, p. 69-74, 1970.
- 41 MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P.; BRANDILEONE, M. C.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C. Analysis of serum crossreactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5086-5090, 2002.
- 42 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.
- 43 HARCUM, S.W.; RAMIREZ, D.M.; BENTLEY, W. E. Optimal nutrient feed policies for heterologous production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 34/5, p. 161–173, 1992.

-
- 44 ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 407-421, v. 51, 1999.
- 45 MARTÍNEZ, K.; DE ANDA, R.; HERNÁNDEZ, G.; ESCALANTE, A.; GOSSET, G.; RAMÍREZ, O. T.; BOLÍVAR, F. G. Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatics compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotranferase system. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n.1, 2008. doi: 10.1186/1475-2859-7-1.
- 46 GNOTH, S.; JENZSCH, M.; SIMUTIS, R. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. **Biprocess and Biosystems Engeneering**, v. 31, p. 21-39, 2008.
- 47 NOVELLA, I. S.; FARQUES, C.; GRÉVILLOT, G. Improvement of the extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* cells by a combined use of chemical methods. **Biotechnology Bioengineering**, v. 44, n. 3, p. 379-382, 1994.
- 48 DANILEVICH, V. N.; PETROVSKAIA, L. E.; GRISHIN, E. V. Rapid and efficient extraction of soluble proteins from gram-negative microorganisms without disruption of cell walls. **Bioorganicheskaja Khimiia**, v. 32, n. 6, p. 579-588, 2006.
- 49 WONG, H. H.; O'NEILL, B. K.; MIDDELBERG, A. P. J. Cumulative sedimentation analysis of *Escherichia coli* debris size. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 3, 1997.
- 50 GOYAL, D.; SAHOO, D. K.; SAHNI, G. Hydrophobic interaction expanded bed adsorption chromatography (HI-EBAC) based facile purification of recombinant streptokinase from *E. coli* inclusion budies. **Journal of Chromatography B**, v. 380, p. 384-391, 2007.
- 51 GOYAL, D.; SAHNI, G.; SAHOO, D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4468-4474, 2009.
- 52 ROLLAND, D.; GAUTHIER, M.; DUGUA, J. M.; FOURNIER, C.; DELPECH, L.; WATELET, B.; LETOURNEUR, O.; ARNAUD, M.; JOLIVET, M. Purification of recombinant HBc antigen expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation. **Journal Chromatography B**, v. 751, n. 1, p. 51-65, 2001.
- 53 STRYER, L. **Biochemistry**. 3. ed. W. H. New York: Freeman and Company, 1988.
- 54 LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V., PESSOA JR. A. Precipitação. In: **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. p. 89-113.
- 55 BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G. Whey protein fractionation: isoelectric precipitation of α -lactoalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 4, p. 391-397, 1997.

56 TASHIMA, A. K.; OTTENS, M.; VAN DER WIELEN, L. A.; CINTRA, D. E.; PAULI, J. R.; FILHO, P. D. E. A.; MIRANDA, E. A. Precipitation of porcine insulin with carbone dioxide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 909-919, 2009.

57 THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. **Protein calculator**. Disponível em: <<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>>. Acesso em: 20 de fev. 2009.

58 GONZÁLEZ, C.; LAGOS, R.; MONASTERIO, O. Recovery of soluble protein after expression in *Escherichia coli* depends on cellular disruption conditions. **Microbios**, v. 85, n. 345, p. 205-212, 1996.

59 KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR. A. Integração de processos. In: **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. p. 428-440.

60 GE HEALTHCARE. Protein purification. In: **Products for life sciences 2007**. p. 506-719, 2007.

ANEXOS

Características e condições de uso das resinas utilizadas neste trabalho segundo o fabricante (Amersham Pharmacia Biotech – GE HealthCare)

Informações obtidas do catálogo GE HealthCare 2007⁶⁰ das seguintes resinas:

- A. Sephacryl S-200 HR – Resina de gel filtração
- B. Phenyl-Sepharose 6 high sub Fast-Flow – Resina hidrofóbica
- C. Q-Sepharose Fast-Flow – Resina de troca aniônica
- D. SP-Sepharose Fast-Flow – Resina de troca catiônica
- E. IMAC-Sepharose Fast-Flow – Resina de afinidade por metal

Cada resina possui duas páginas de informações, sendo a primeira introdutória e a segunda as melhores condições de uso como fluxo máximo, capacidade, etc.

A. Sephacryl S-200 HR pré-empacotada – Resina de gel filtração

Chromatography Columns and Media

Gel Filtration

SELECTION GUIDE BY TECHNICAL OVERVIEW – Gel Filtration

Product	Useful Fractionation Range (M _r) (Proteins)	Useful Fractionation Range (M _r) (Dextran)	Rec. Flow Rate* Packed Columns (ml/min)	Average Particle Size (µm)	Page
Superdex – Prepacked Tricorn and PC columns					
Superdex Peptide 10/300 GL	100–7000 (peptides)	NA	0.4–1.2 ‡	13	592
Superdex Peptide PC 3.2/30	100 7000 (peptides)	NA	0.04–0.15 ‡	13	592
Superdex 75 10/300 GL	3 × 10 ³ –7 × 10 ⁴	5 × 10 ² –3 × 10 ⁴	0.4–1.0 ‡	13	593
Superdex 75 PC 3.2/30	3 × 10 ³ –7 × 10 ⁴	5 × 10 ² –3 × 10 ⁴	0.04–0.1 ‡	13	593
Superdex 200 10/300 GL	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.4–1.0 ‡	13	593
Superdex 200 5/150 GL NEW	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	NA	13	594
Superdex 200 PC 3.2/30	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.04–0.1 ‡	13	593
Superdex prep grade – HiLoad prepacked columns and lab packs					
Superdex 30 prep grade	up to 1 × 10 ⁴	NA	0.3–1.7	34	595
Superdex 75 prep grade	3 × 10 ³ –7 × 10 ⁴	5 × 10 ² –3 × 10 ⁴	0.3–1.7	34	595
Superdex 200 prep grade	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.3–1.7	34	595
Superose – Prepacked Tricorn and PC columns					
Superose 12 10/300 GL	1 × 10 ³ –3 × 10 ⁵	NA	0.1–0.5	10	596
Superose 12 PC 3.2/30	1 × 10 ³ –3 × 10 ⁵	NA	0.04–0.1	10	596
Superose 6 10/300 GL	5 × 10 ³ –5 × 10 ⁶	NA	0.1–0.5	13	596
Superose 6 PC 3.2/30	5 × 10 ³ –5 × 10 ⁶	NA	0.04–0.1	13	596
Superose prep grade – Lab packs					
Superose 12 prep grade	1 × 10 ³ –3 × 10 ⁵	up to 3 × 10 ⁵	0.5 ‡	30	596
Superose 6 prep grade	5 × 10 ³ –5 × 10 ⁶	up to 1 × 10 ⁶	0.3–0.5 ‡	30	596
Sephacryl – HiPrep prepacked columns and lab packs					
Sephacryl S-100 HR	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	NA	0.1–1.0	50	597
Sephacryl S-200 HR	5 × 10 ³ –2.5 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –8 × 10 ⁴	0.1–1.0	50	597
Sephacryl S-300 HR	1 × 10 ⁴ –1.5 × 10 ⁶	2 × 10 ³ –4 × 10 ⁵	0.1–1.0	50	597
Sephacryl S-400 HR	2 × 10 ⁴ –8 × 10 ⁶	1 × 10 ⁴ –2 × 10 ⁶	NA	50	597
Sephacryl S-500 HR	NA	4 × 10 ⁴ –2 × 10 ⁷	NA	50	597
Sephacryl S-1000 SF	NA	5 × 10 ⁵ –> 10 ⁸	NA	50	597

Product	Useful Fractionation Range (M _r) (Globular proteins)	Useful Fractionation Range (M _r) (Dextran)	Bed Volume ml/g Dry Sephadex	Approx. Max. Flow Rate (ml/min)*	Particle Size Range, Wet Bead (µm)	Page
Sephadex						
Sephadex G-10	up to 7 × 10 ²	up to 7 × 10 ²	2–3	Darcy's law ‡	55–165	599
Sephadex G-15	up to 1.5 × 10 ³	up to 1.5 × 10 ³	2.5–3.5	Darcy's law	60–180	599
Sephadex G-25 Fine	1 × 10 ³ –5 × 10 ³	1 × 10 ² –5 × 10 ³	4–6	Darcy's law	35–140	599
Medium					85–260	
Coarse					170–520	
Superfine					17–70	
Sephadex G-50 Fine	1 × 10 ³ –3 × 10 ⁴	5 × 10 ² –1 × 10 ⁴	9–11	Darcy's law	40–160	599
Medium					100–300	
Coarse					200–610	
Superfine					20–80	
Sephadex G-75	3 × 10 ³ –8 × 10 ⁴	1 × 10 ³ –5 × 10 ⁴	12–15	6.4	90–280	599
Sephadex LH-20	< 5 × 10 ³	NA	depends on solvent	NA	NA	

* Distilled water, 25°C.

‡ Values for 10/300 GL column.

§ Darcy's law: The flow rate is proportional to the pressure drop over the bed, inversely proportional to the bed height, and virtually independent of the column diameter. For a more detailed description of Darcy's Law, see page 758.

NA = not applicable.

Desalting Columns	Medium	Bed Volume (ml)	Rec. Sample Volumes (ml)	Page
HiPrep 26/10 Desalting	Sephadex G-25 F	53	≤ 15.0	587
HiTrap Desalting	Sephadex G-25 SF	5.0	≤ 1.5	586
Disposable PD-10 Desalting Columns	Sephadex G-25 M	8.3	≤ 2.5	588

Related Products	Code Number	Refer To
Handbook		
Gel Filtration: Principles and Methods	18-1022-18	page 649

Chromatography Columns and Media

Gel Filtration

HiPrep Sephacryl HR Columns and Sephacryl Lab Packs

HiPrep Sephacryl HR columns, prepacked with Sephacryl High Resolution media, provide reliable gel filtration separations.

Maximum recovery and minimum nonspecific adsorption with long-term chemical and physical stability resulting from the hydrophilic, rigid allyl dextran/ bisacrylamide matrix.

Sephacryl S-100 HR is designed for separating peptides and small proteins.

S-200 HR and S-300 HR are for purifying antibodies, serum proteins, and mid-size proteins.

S-400 HR and S-500 HR are used to separate polysaccharides, macromolecules with extended structures, and even small plasmids.

S-1000 SF is optimized for the purification of dextrans up to 10^8 molecular weight, spherical particles up to 400 nm, and DNA up to 20000 base pairs including plasmids, vesicles, and viruses.

ORDERING INFORMATION			
Product	Quantity	Code Number	Price FOB (USD)
■ Sephacryl S-100 HR	150 ml	17-0612-10	\$ 125.00
■ Sephacryl S-100 HR	750 ml	17-0612-01	\$ 450.00
■ Sephacryl S-200 HR	150 ml	17-0584-10	\$ 125.00
■ Sephacryl S-200 HR	750 ml	17-0584-01	\$ 450.00
■ Sephacryl S-300 HR	150 ml	17-0599-10	\$ 125.00
■ Sephacryl S-300 HR	750 ml	17-0599-01	\$ 450.00
■ Sephacryl S-400 HR	150 ml	17-0609-10	\$ 125.00
■ Sephacryl S-400 HR	750 ml	17-0609-01	\$ 450.00
■ Sephacryl S-500 HR	150 ml	17-0613-10	\$ 125.00
■ Sephacryl S-500 HR	750 ml	17-0613-01	\$ 450.00
Sephacryl S-1000 SF	750 ml	17-0476-01	\$ 472.00
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1	17-1165-01	\$ 340.00
HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR	1	17-1194-01	\$ 483.00
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	1	17-1166-01	\$ 340.00
HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR	1	17-1195-01	\$ 483.00
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	1	17-1167-01	\$ 340.00
HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR	1	17-1196-01	\$ 483.00

■ BioProcess media. Process-scale quantities are available.

Related Products	Code Number	Refer To
HiTrap/HiPrep, 1/16" male connector for AKTAdesign Handbook	28-4010-81	page 512
Gel Filtration: Principles and Methods	18-1022-18	page 649

TECHNICAL SPECIFICATIONS

Prepacked HiPrep Columns*

Bed dimensions	
HiPrep 16/60	16 × 600 mm
HiPrep 26/60	26 × 600 mm
Bed volume	
HiPrep 16/60	120 ml
HiPrep 26/60	320 ml
Sample volume	
HiPrep 16/60	≤ 5 ml
HiPrep 26/60	≤ 13 ml
Rec. linear flow rate	5–15 cm/h
Max. linear flow rate (H ₂ O at 25°C)	30 cm/h
Max. pressure over the packed bed during operation	1.5 bar (22 psi, 0.15 MPa)
Column hardware pressure limit	5 bar (73 psi, 0.5 MPa)
Theoretical plates	5000 m ⁻¹

* Columns are not suitable for use with AKTAprius plus system.

B. Phenyl-Sepharose 6 high sub Fast-Flow – Resina hidrofóbica

Chromatography Columns and Media

Hydrophobic Interaction

Introduction to Hydrophobic Interaction

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) is a versatile method for the purification and separation of biomolecules based on differences in their surface hydrophobicity. Proteins and peptides usually sequence hydrophobic amino acids in domains away from the surface of the molecule. However, many biomolecules considered hydrophilic have sufficient hydrophobic groups exposed to allow interaction with hydrophobic ligands attached to the chromatographic matrix. Compared to reversed phase chromatography, the density of the ligand on the matrix is much lower. This feature promotes the high selectivity of HIC, while allowing mild elution conditions to help preserve biological activity.

Hydrophobic interaction between a biomolecule and the matrix is enhanced by high ionic strength buffers. This makes HIC an ideal "next-step" for the purification of materials that have been precipitated with ammonium sulfate or eluted in high salt concentrations during ion exchange chromatography.

Related Products	Code Number	Refer To
Handbook		
Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography	11-0012-69	page 649

Selection Guide — Hydrophobic Interaction Chromatography Media

SELECTION GUIDE – Hydrophobic Interaction Chromatography

Matrix	Ligand	Ligand Density (μmol/ml medium)	Average Particle Size (μm)	pH Stability		Page
				Long term	Short term	
SOURCE 15						
<i>Prepacked RESOURCE and PE columns and Lab Packs</i>						
SOURCE 15ETH	ether	ND*	15	2–12	1–14	632
SOURCE 15ISO	isopropyl	ND*	15	2–12	1–14	632
SOURCE 15PHE	phenyl	ND*	15	2–12	1–14	632
Sepharose High Performance						
<i>Prepacked HiLoad and HiTrap¹ columns</i>						
Butyl Sepharose High Performance NEW	n-butyl	ND*	34	3–13	2–14	631
Phenyl Sepharose High Performance	phenyl	25	34	3–13	2–14	628
Sepharose Fast Flow						
<i>Prepacked HiTrap*, HiPrep columns, and Lab Packs</i>						
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	n-butyl	40	90	3–13	2–14	631
Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow	butyl-S	10	90	3–13	2–14	630
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	n-octyl	5	90	3–13	2–14	631
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	phenyl	25	90	3–13	2–14	629
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	phenyl	40	90	3–13	2–14	629

* Not determined at time of going to press.

† HiTrap columns prepacked with Phenyl Sepharose High Performance, Butyl Sepharose High Performance, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub), Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Butyl-S Sepharose 6 Fast Flow, and Octyl Sepharose 4 Fast Flow are supplied in the HiTrap HIC Selection Kit. Columns are all also available as individual packages.

Chromatography Columns and Media

Hydrophobic Interaction

Phenyl Sepharose 6 Fast Flow

- Available with high or low levels of phenyl substitution differing in selectivity, efficiency, and binding capacity.
- The standard (low sub) and high-capacity (high sub) aromatic HIC media are made of highly cross-linked 90- μ m agarose beads derivatized with phenyl groups via uncharged, chemically stable ether linkages.

Isolation of a monoclonal antibody, IgG₁ with Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub).

ORDERING INFORMATION

Product	Quantity	Code Number	Price FOB (USD)
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	25 ml	17-0965-10	\$ 96.00
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	200 ml	17-0965-05	\$ 498.00
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-0973-10	\$ 96.00
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	200 ml	17-0973-05	\$ 498.00

■ BioProcess media. Process quantities are available.

Related Products	Code Number	Refer To
HiPrep 16/10 Phenyl FF (high sub)	17-5095-01	page 627
HiPrep 16/10 Phenyl FF (low sub)	17-5094-01	page 627
HiTrap HIC Selection Kit NEW		page 625
HiTrap HIC HP and FF Columns		page 626
Handbook		
Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography	11-0012-69	page 649

TECHNICAL SPECIFICATIONS

Ligand density	
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	25 μ mol/ml medium
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	40 μ mol/ml medium
Binding capacity	
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	10 mg IgG/ml medium 24 mg HSA/ml medium
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	30 mg IgG/ml medium 36 mg HSA/ml medium
Pressure/flow spec.	
	200–400 cm/h, 1 bar XK 50/60 column, bed height 25 cm
pH stability	
	2–14 (short term), 3–13 (long term)
Chemical stability	
	Stable in common buffers, chaotropic agents, detergents, and polar organic solvents.
Average particle size	
	90 μ m

C. Q-Sepharose Fast-Flow – Resina de troca aniônica
D. SP-Sepharose Fast-Flow – Resina de troca catiônica

Chromatography Columns and Media

Ion Exchange

SELECTION GUIDE BY TECHNICAL OVERVIEW – Ion Exchange Chromatography						
Matrix	Exchanger Type*	Average Particle Size Wet Bead (µm)	Long Term	pH Stability		Page
MiniBeads Columns						
Prepacked Tricorn and PC columns						
Mini Q	Strong anion	3	2–12		1–14	606
Mini S	Strong cation	3	2–12		1–14	606
MonoBeads Columns						
Prepacked Tricorn and PC columns						
Mono Q	Strong anion	10	2–12		1–14	605
Mono S	Strong cation	10	2–12		1–14	605
Mono P	Weak anion	10	2–12		1–14	602
SOURCE 15						
Prepacked Tricorn, RESOURCE columns, and lab packs						
SOURCE 15Q	Strong anion	15	2–12		1–14	607
SOURCE 15S	Strong cation	15	2–12		1–14	607
SOURCE 30						
SOURCE 30Q	Strong anion	30	2–12		1–14	607
SOURCE 30S	Strong cation	30	2–12		1–14	607
Sepharose High Performance						
Prepacked HiLoad, HiTrap columns, and lab packs						
Q Sepharose High Performance	Strong anion	34 (24–44)	2–12		2–14	608
SP Sepharose High Performance	Strong cation	34 (24–44)	4–13		3–14	608
Capto						
Prepacked HiTrap columns and lab packs						
Capto MMC	Multimodal, weak cation	75	2–12		2–14	609
Capto Q	Strong anion	90	2–12		2–14	608
Capto S	Strong cation	90	2–12		2–14	608
Sepharose Fast Flow						
Prepacked HiPrep, HiTrap columns, and lab packs						
Q Sepharose Fast Flow	Strong anion	90 (45–165)	2–12		1–14	604
SP Sepharose Fast Flow	Strong cation	90 (45–165)	4–13		3–14	604
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	Weak anion	90 (45–165)	3–13		2–14	604
DEAE Sepharose Fast Flow	Weak anion	90 (45–165)	3–12		1–14	604
CM Sepharose Fast Flow	Weak cation	90 (45–165)	4–13		2–14	604
Sepharose XL						
Prepacked HiPrep, HiTrap columns, and lab packs						
Q Sepharose XL	Strong anion	90 (45–165)	3–13		2–14	606
SP Sepharose XL	Strong cation	90 (45–165)	3–13		3–14	606
* Strong ion exchangers are ionized over a wide pH range and have almost constant ionic capacity within this range. Strong exchangers may also exhibit slightly better selectivity than weak ones. Weak ion exchangers are only ionized over a limited pH range and may start to lose their charge at pH values below 6 (cation exchangers) or above 9 (anion exchangers).						

* Strong ion exchangers are ionized over a wide pH range and have almost constant ionic capacity within this range. Strong exchangers may also exhibit slightly better selectivity than weak ones. Weak ion exchangers are only ionized over a limited pH range and may start to lose their charge at pH values below 6 (cation exchangers) or above 9 (anion exchangers).

SELECTION GUIDE—Overview of HiTrap, HiPrep, and HiLoad Prepacked Columns for IEX						
Media	HiTrap 1 ml	HiTrap 5 ml	HiPrep 16/10	HiLoad 16/10	HiLoad 26/10	
ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	•	•	•	-	-	
Capto MMC	•	•	-	-	-	
Capto Q	•	•	-	-	-	
Capto S	•	•	-	-	-	
CM Sepharose Fast Flow	•	•	•	-	-	
DEAE Sepharose Fast Flow	•	•	•	-	-	
Q Sepharose Fast Flow	•	•	•	-	-	
Q Sepharose High Performance	•	•	-	•	•	
Q Sepharose XL	•	•	•	-	-	
SP Sepharose Fast Flow	•	•	•	-	-	
SP Sepharose High Performance	•	•	-	•	•	
SP Sepharose XL	•	•	•	-	-	

Chromatography Columns and Media

Ion Exchange

● Sepharose Fast Flow IEX

- For preparative purifications, even when purifying crude samples.
- Available with strong (Q and SP) and weak (DEAE, CM, and ANX) anion and cation exchangers, in bulk quantities and in prepacked HiTrap and HiPrep columns, as well as HiTrap IEX Selection Kit.
- For separation of proteins of all pI values with Q and SP having a high dynamic capacity for proteins over the entire pH range.
- ANX has a different selectivity compared to DEAE, and is applicable for separation of high molecular weight proteins.
- Easy scale-up from HiTrap scale to laboratory scale to process scale.

TECHNICAL SPECIFICATIONS

Ion exchanger type	
Q Sepharose FF	Quaternary ammonium strong anion
DEAE Sepharose FF	Diethylaminoethyl weak anion
ANX Sepharose 4 FF	Diethylaminopropyl weak anion
SP Sepharose FF	Sulfopropyl strong cation
CM Sepharose FF	Carboxymethyl weak cation
Ionic capacity	
Q Sepharose FF	0.18–0.25 mmol (Cl ⁻)/ml
DEAE Sepharose FF	0.11–0.16 mmol (Cl ⁻)/ml
ANX Sepharose 4 FF	0.13–0.18 mmol (Cl ⁻)/ml
SP Sepharose FF	0.18–0.25 mmol (H ⁺)/ml
CM Sepharose FF	0.09–0.13 mmol (H ⁺)/ml
Dynamic capacity	
Q Sepharose FF	120 mg HSA/ml medium
DEAE Sepharose FF	110 mg HSA/ml medium
ANX Sepharose 4 FF	5 mg thyroglobulin/ml medium
SP Sepharose FF	70 mg RNase/ml medium
CM Sepharose FF	50 mg RNase/ml medium
Pressure/flow spec.	
Q Sepharose FF	400–700 cm/h, 100 kPa, XK 50/30 column, bed height 15 cm
DEAE Sepharose FF	300–600 cm/h, 100 kPa, XK 50/30 column, bed height 15 cm
ANX Sepharose 4 FF	min 200 cm/h, 100 kPa, XK50/60 column, bed height 25 cm
SP Sepharose FF	400–700 cm/h, 100 kPa, XK 50/30 column, bed height 15 cm
CM Sepharose FF	300–600 cm/h, 100 kPa, XK 50/30 column, bed height 15 cm
Average particle size	
Sepharose FF	90 µm (45–165 µm)
Sepharose 4 FF	90 µm (45–165 µm)
Matrix	
Sepharose FF	Highly cross-linked agarose, 6%
Sepharose 4 FF	Highly cross-linked agarose, 4%
pH stability	
Q Sepharose FF	1–14 (short term), 2–12 (long term)
DEAE Sepharose FF	1–14 (short term), 2–13 (long term)
ANX Sepharose 4 FF	2–14 (short term), 3–13 (long term)
SP Sepharose FF	3–14 (short term), 4–13 (long term)
CM Sepharose FF	2–14 (short term), 4–13 (long term)
Chemical stability	
Stable in all common aqueous buffers: 8 M urea, 6 M guanidine HCl, 70% ethanol, 1 M NaOH*, and 1 M acetic acid*.	

* 1 M NaOH and acetic acid should be used only for cleaning purposes.

ORDERING INFORMATION

Product	Quantity	Code Number	Price FOB (USD)
■ Q Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0510-10	\$ 53.00
■ Q Sepharose Fast Flow	300 ml	17-0510-01	\$ 315.00
■ DEAE Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0709-10	\$ 52.00
■ DEAE Sepharose Fast Flow	500 ml	17-0709-01	\$ 390.00
■ SP Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0729-10	\$ 53.00
■ SP Sepharose Fast Flow	300 ml	17-0729-01	\$ 315.00
■ CM Sepharose Fast Flow	25 ml	17-0719-10	\$ 52.00
■ CM Sepharose Fast Flow	500 ml	17-0719-01	\$ 390.00
■ ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	25 ml	17-1287-10	\$ 86.00
■ ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	500 ml	17-1287-01	\$ 489.00

■ BioProcess media. Process-scale quantities are available.

Related Products	Code Number	Refer To
HiPrep 16/10 Sepharose FF IEX Columns		page 632
HiTrap Sepharose FF IEX Columns		page 632
HiTrap/HiPrep, 1/16" male connector for AKTAdesign	28-4010-81	page 632
HiTrap IEX Selection Kit	17-6002-33	page 632
Tubing Fittings and Unions		page 636
Handbook		
Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods	11-0004-21	page 648

Recombinant human superoxide dismutase produced by *Saccharomyces cerevisiae* is purified directly from clarified cell homogenate on Q Sepharose Fast Flow after desalting and buffer exchange on Sephadex G-25. A 2.6 × 5 ml ion exchange column handles 390 ml of sample in 45 min.

E. IMAC-Sepharose Fast-Flow – Resina de afinidade por metal

Chromatography Columns and Media

Affinity, Immobilized Lectin / Affinity, Metal Chelate

2 Lentil Lectin Sepharose 4B

- Like Con A, binds α -D-mannose, α -D-glucose, and sterically related residues, but lentil lectin distinguishes less sharply between glucosyl and mannosyl residues and binds simple sugars with lower affinity.
- Lentil hemagglutinin coupled to Sepharose 4B via cyanogen bromide activation.
- Retains binding in 1% deoxycholate and is especially valuable for purification of detergent-solubilized membrane proteins.
- Ligand concentration is ≈ 2 mg/ml medium. The binding capacity for porcine thyroglobulin is ≈ 25 mg/ml medium.

ORDERING INFORMATION

Product	Quantity	Code Number	Price FOB (USD)
Lentil Lectin Sepharose 4B	25 ml	17-0444-01	\$ 496.00

References

- Hayman, M.J. et al. Purification of virus glycoproteins by affinity chromatography using *Lens culinaris* phytohemagglutinin. *FEBS Lett.* **29**, 185 (1973).
- Tsujimoto, M. et al. Purification and characterisation of recombinant human interleukin 5 expressed in Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biochem.* **106**, 23 (1989).
- Jackson, P.J. et al. Combined lectin-affinity and anion exchange chromatography of serum glycoproteins to reveal induced glycan changes. In: *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* Vol. 6. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA (1988).

Mitogens / Lectins

For main product entries, see page 79.

Introduction to Metal Chelate Affinity

Metal chelate affinity chromatography is a useful separation technique applicable to most types of proteins.

- Useful for histidine-tagged* proteins, but generally applicable to most proteins with exposed histidine, cysteine, and tryptophan.
- Highly selective affinities depending upon the metal ion used such as Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} .
- Useful for purifying membrane proteins and protein aggregates where detergents or high ionic strength buffers are required.
- May be employed in analytical and preparative applications together with ion exchange or hydrophobic interaction chromatography steps.

Immobilized metal ion adsorption chromatography (IMAC) is also known as metal chelate affinity chromatography. In this technique, the medium is first charged with a transition metal ion to form a chelate before use. Proteins will bind to the medium depending upon the presence of surface histidine, cysteine, and tryptophan residues that have an affinity for chelated metal ions. The binding strength is affected principally by the metal ion and pH of the buffers. The bound protein can be eluted by competitive elution with, for example, imidazole, or by lowering pH. Strong chelating agents, such as EDTA can also be used.

IMAC is an excellent chromatography technique for optimization and purification of histidine-tagged proteins. Optimization work can be preformed with IMAC Sepharose since that allows simple replacement of the immobilized metal ions. The metal ions most frequently used for optimization of purification are Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{3+} .

Remember that other factors can affect the purity of histidine-tagged protein. The tag position on the C or N-terminus and the tag length are two factors that should be considered when optimization of a purification protocol is performed.

* See licensing information at back of catalog.

Chromatography Columns and Media

Affinity, Metal Chelate

IMAC Sepharose 6 Fast Flow Media/HiTrap IMAC FF Columns/ HiPrep IMAC FF 16/10 Column

- For optimizing purification of histidine-tagged* proteins when Ni^{2+} is not the best choice of metal ion.
- Conveniently charge with your metal of choice.
- Ideal bead size for scaling up.
- High binding capacity.
- Prepacked HiTrap columns for convenient purification.
- Prepacked HiPrep columns for easy scale-up.

IMAC Sepharose 6 Fast Flow consists of 90- μm beads of highly cross-linked agarose to which a chelating group has been covalently coupled. This chelating group can be charged with suitable metal ions, specific for your target protein of interest.

The bead size of IMAC Sepharose 6 Fast Flow enables high flow properties, making the medium an ideal choice for scaling up purification at laboratory scale and purification of histidine-tagged proteins at process scale.

Low metal ion leakage means that the activity of the purified protein is retained and the risk of precipitation reduced, which results in increased purity, activity, and yield of the target protein. Leakage of metal ions into the eluted target protein pool from IMAC Sepharose 6 Fast Flow is generally low under normal conditions.

IMAC Sepharose 6 Fast Flow is highly stable and compatible with a wide range of common additives. This helps maintain biological activity and increase product yield, while at the same time greatly expanding the range of suitable operating conditions.

The medium is available prepacked in HiTrap and HiPrep column formats for convenient purification of histidine-tagged proteins at laboratory scale. Initial purification using a 1-ml HiTrap IMAC FF column can be scaled up further with the 5-ml column. Purification can be scaled up even more using 20-ml HiPrep IMAC FF 16/10 columns.

*See licensing information at back of catalog.

ORDERING INFORMATION

Product	Quantity	Code Number	Price FOB (USD)
HiPrep IMAC FF 16/10	1 × 20 ml	17-0921-06	\$ 284.00
HiTrap IMAC FF	5 × 1 ml	17-0921-02	\$ 102.00
HiTrap IMAC FF	5 × 5 ml	17-0921-04	\$ 354.00
IMAC Sepharose 6 Fast Flow	25 ml	17-0921-07	\$ 189.00
IMAC Sepharose 6 Fast Flow	100 ml	17-0921-08	\$ 640.00

■ BioProcess medium. Process-scale quantities are available.

Related Products	Code Number	Refer To
HiPrep FF 16/10 Column		page 532
HiTrap FF Columns		page 529
Ni Sepharose 6 Fast Flow		page 528
HiTrap/HiPrep, 1/16" male connector for AKTAdesign	28-4010-81	page 512
Handbooks		
Affinity Chromatography Handbook: Principles and Methods		page 649
Recombinant Protein Purification: Principles and Methods		page 649

TECHNICAL SPECIFICATIONS

Matrix	Highly cross-linked agarose, 6%
Average particle size	90 μm
Binding capacity*	~ 40 mg histidine-tagged protein/ml medium when charged with Ni^{2+}
Compatibility	Stable in all commonly used buffers
Chemical stability†	For one week at 40°C: 0.01 M HCl, 0.1 M NaOH For 12 h: 1M NaOH, 70% acetic acid 30 min tested 30% 2-propanol 1 h tested 2% SDS
pH stability†	3–12 (long term), 2–14 (short term)
HiTrap prepacked columns	
Column volume	1 ml and 5 ml
Column dimensions	0.7 × 2.5 cm (1 ml), 1.6 × 2.5 cm (5 ml)
Recommended flow rate‡	1 ml/min (1 ml), 5 ml/min (5 ml)
Max. pressure‡	3 bar (0.3 MPa, 42 psi)
HiPrep prepacked columns	
Column volume	20 ml
Column dimensions	1.6 × 10 cm
Recommended flow rate‡	2–10 ml/min
Max. pressure over the packed bed during operation†	1.5 bar (0.15 MPa, 22 psi)
Column hardware pressure limit	5 bar (0.5 MPa, 73 psi)

* Protein- and metal-ion dependent.
† Medium uncharged with metal ion.
‡ H_2O at room temperature.