

Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*

Eb Chiarini*, Thereza Christina Vessoni Penna

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo

O aumento do uso da proteína verde fluorescente (GFPuv) como ferramenta de pesquisas biotecnológicas requer um estudo mais cuidadoso das propriedades bioquímicas e físicas da molécula de GFPuv. Este trabalho teve como objetivo a aplicação de métodos físicos e químicos para o isolamento, a extração da GFPuv de células de Escherichia coli DH5- α , purificação da proteína, e o estudo da estabilidade desta em diferentes valores de pH. Células de E. coli expressando GFPuv foram submetidas a quatro ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento intercalados por sonicação (CDS), para promover a permeação seletiva da GFPuv. Os permeados foram submetidos à extração por partição em três fases (TPP) e posterior purificação por eluição da proteína em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC). Obteve-se rendimento semelhante em GFPuv no 1º ciclo de permeação seletiva (CDS) e por extração (TPP) associada à purificação (HIC) para os quais impurezas não foram visualizadas por eletroforese. As estruturas moleculares da GFPuv extraída e purificada mostraram-se inalteradas em valores de pH entre 6,0 e 9,8, e foram confirmadas nos espectros de emissão e de excitação.

Unitermos

- Proteína verde fluorescente recombinante
- GFPuv
- *Escherichia coli*
- Purificação de proteínas
- TPP

*Correspondência:

E. Chiarini
R. Mal. Hermes da Fonseca, 185/92-A
- Santana
02020-000 - São Paulo - SP - Brasil
E-mail: ebchiarini@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP) extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (Ward, 1998). A proteína na forma recombinante (GFPuv) caracteriza-se como espécie independente e tem sido expressa com sucesso em células eucariontes e procariontes, que podem ser visualizadas sob luz UV ($\lambda_{360-400\text{nm}}$). Por ser marcador fluorescente intrínseco, a GFPuv tem sido considerada um sistema novo de reconhecimento genético

(Chalfie *et al.*, 1994; Hack *et al.*, 2000), constituindo-se também em indicador biológico potencial na validação do desempenho de processos de desinfecção, pasteurização e de branqueamento. A análise quantitativa da fluorescência remanescente das amostras submetidas a diferentes processos químicos e físicos pode ser determinada por espectrofluorimetria, tornando o método rápido e preciso (Vessoni Penna, Chiarini, 2003). A análise qualitativa pode ser realizada por microscopia com ultravioleta ou por observação em lâmpada UV de comprimento de onda entre 365 - 395 nm.

Propriedades da GFP e da GFPuv

A GFPuv emite máxima fluorescência quando excitada por luz ultravioleta (360-400 nm), apresenta pico máximo de excitação em 394 nm e pico máximo de emissão em 509 nm (Ward *et al.*, 1980). A GFPuv foi recombinada através de técnicas de clonagem molecular no cDNA da GFP *in vitro*. O resultado foi a substituição de três aminoácidos

no cromóforo (fenilalanina⁹⁹ por serina, metionina¹⁵³ por treonina e valina¹⁶³ por alanina) como numeração do sistema TU#58 da GFP, resultando na GFPuv. A GFPuv apresenta baixa toxicidade e maior solubilidade no citoplasma das células do que a forma selvagem GFP; porém apresenta-se mais suscetível à dimerização (Cramer *et al.*, 1996). A forma mutante, GFPuv, é expressa duas a três vezes mais rápido em células de *Escherichia coli* e apresenta fluorescência 18 vezes mais intensa que a GFP selvagem, quando excitada pela luz UV (Cramer *et al.*, 1996; Ward, 1998). Apesar da recombinação da proteína aumentar a fluorescência da GFPuv, os picos de excitação e emissão permanecem praticamente inalterados em relação a GFP. A intensidade de fluorescência mantém-se estável em espectrofluorímetro. Porém, a exposição ao microscópio óptico, na intensidade de iluminação próxima ao pico máximo de excitação (340-390 nm e 395-440 nm), provoca o fenômeno de fotobranqueamento da fluorescência emitida por GFPuv (Chalfie *et al.*, 1994).

A GFPuv é uma proteína globular, compacta e ácida, na forma de um barril que apresenta o cromóforo situado no centro geométrico. A proteína apresenta-se estável às temperaturas ≤ 70 °C e resistência à desnaturação química. O ponto isoelétrico (pI) da GFP é entre pH 4,6 e 5,1, apresentando melhor estabilidade entre pH 5,5 e 12, sendo o pH ótimo igual a 8,0 (Bokman, Ward, 1981; Ward, 1998; Chalfie *et al.*, 1994; Cramer, 1996). Devido a instabilidade da fluorescência em valores de pH inferiores a 5,5, e superiores a 12, a GFPuv é empregada em estudos de citometria como indicadora do pH intracelular em células livres (Kneen *et al.*, 1998).

As proteínas selvagem GFP e recombinante GFPuv apresentam fluorescência em ambas as conformações: monomérica e dimerica, sendo a proporção das mesmas depende da concentração da proteína no meio. A GFPuv dimeriza via interações hidrofóbicas em concentrações de proteína de 5 a 10 mg/mL. A dimerização resulta em diminuição na absorção a 470 nm e em aumento concomitante de absorção em 395 nm. Na maioria dos estudos experimentais que utilizam a proteína como informação, a forma monomérica da GFP predomina, enquanto que a GFPuv na forma de dímero pode ocorrer, mesmo em níveis de expressão moderados (Chalfie *et al.*, 1994).

Expressão e liberação da GFPuv

A GFPuv expressa no citoplasma de cepas de *E. coli* (DH5- α , JM109 e TB1) pode ser liberada das células por digestão enzimática (lisozima), lise química (*t*-butanol, etanol) ou permeação física (método de congelamento, descongelamento e sonicação) (Sambrook *et al.*, 1989; Johnson, Hecht, 1994; Yakhnin *et al.*, 1998). A permeação física consiste em ciclos sucessivos de congelamento lento, descongelamento e sonicação (Vessoni Penna *et al.*, 2002). Pela permeação seletiva, proteínas de baixa massa molar são liberadas para o meio facilitando a posterior recuperação e purificação da proteína de interesse (Naglak *et al.*, 1990).

Extração direta por partição em três fases (TPP – Three Phase Partitioning) e purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

A extração direta por partição em três fases (TPP) tem sido utilizada para extrair, concentrar e purificar proteínas de origem vegetal e bacteriana (Dennison & Lovrien, 1997; Dennison *et al.*, 2000; Sharma, Gupta, 2001a,b; Yakhnin *et al.*, 1998). O método TPP combina vários princípios de extração, quais sejam: precipitação salina convencional (*salting-out*), precipitação isoelétrica (Bell *et al.*, 1983), precipitação por co-solvente (Conn, 1980); pressão osmótica (Lehninger, 1990) e cosmotropia (Sharma, Gupta, 2001a,b).

O *t*-butanol, que é miscível na água, quando adicionado à solução aquosa concentrada em sulfato de amônio (cerca de 50%) particiona a mistura em duas fases, fase superior *t*-butanol e a fase inferior aquosa. O *t*-butanol se liga às proteínas presentes na solução aquosa, precipitando-as na interface entre a fase inferior aquosa e a fase superior de *t*-butanol (Dennison, Lovrient, 1997). A relação 1:1 entre *t*-butanol e sulfato de amônio tem mostrado adequado sinergismo entre as fases na precipitação das proteínas extraídas. Sharma e Gupta (2001a) recuperaram 85% da proteína bifuncional inibidora de protease/amilase extraída de células de germe de trigo com sulfato de amônio a 30% e *t*-butanol (1:1), representando uma purificação de 25 vezes. Yakhnin *et al.* (1998) confirmaram para a mesma relação 1:1 de *t*-butanol e sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] a 50% (2 M) melhor recuperação cerca de 90% da GFPuv extraída de células bacterianas, e menor recuperação de 58% da proteína extraída com etanol e 2 M (NH₄)₂SO₄ (1:1).

A determinação do pI da proteína apresenta fundamental importância na caracterização da mesma durante a extração e nos estágios de purificação, informando

igualmente o melhor intervalo de pH na caracterização das propriedades da proteína de interesse. Apesar da disponibilidade de diferentes métodos de purificação de proteínas, atualmente a técnica por cromatografia tem sido utilizada com frequência devido ao elevado poder de resolução da mesma. A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológicas e físico-químicas da molécula da proteína: tamanho (cromatografia de filtração em gel), carga elétrica (cromatografia de troca iônica), características de bioespecificidade (cromatografia por afinidade) e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica - HIC) (Queiroz *et al.*, 2001). A HIC possui vantagens em relação a outros tipos de cromatografia, pois se utiliza do nível de hidrofobicidade da molécula para a separação da mesma por meio da interação hidrofóbica entre a região hidrofóbica imóvel do ligante (HIC) e a região apolar da superfície da proteína. A adsorção da proteína ao ligante (HIC) e a conseqüente eluição da mesma dependem da concentração do sal na fase móvel ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e do eluente. HIC utiliza-se da propriedade hidrofóbica da proteína em meio polar, sem causar a desnaturação da mesma. O desenvolvimento de grande variedade de fases estacionárias para HIC tem proporcionado o aumento da aplicação desta cromatografia na purificação de biomoléculas como: proteínas séricas, proteínas nucleares, hormônios, proteínas recombinantes e enzimas (Comings *et al.*, 1979; Hrkal, Rejnková, 1982; Lefort, Ferrara, 1986; Angelova *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 1999).

Sensor Biológico

A GFPuv, por ser marcador fluorescente intrínseco de células procariontes e eucariontes (Inouye, Tsuji, 1994), constitui-se em potencial e importante ferramenta para ser empregada como sensor biológico, também conhecido por indicador biológico (Vessoni Penna *et al.*, 2003). A capacidade de expressão da GFPuv por células de *E. coli*, o isolamento, a purificação, e a caracterização das propriedades físico-químicas desta proteína recombinada devem ser conhecidas e comparadas às propriedades da proteína verde fluorescente na forma selvagem (GFP) descritas na literatura. A avaliação do método mais eficaz de recuperação da GFPuv se faz necessária para obtenção do melhor rendimento da proteína de interesse produzida. O conhecimento destas características aliadas a outras características físico-químicas, aplicabilidade de técnicas de purificação, estabilidade da proteína em diferentes valores de pH, são fundamentais para a aplicação da GFPuv como indicador biológico em controles de processos tecnológicos.

Este trabalho teve por objetivos: (i) extração da proteína GFPuv purificada através dos métodos físico (permeação seletiva), químico (extração por partição em três fases – TPP) e por associação destes; e (ii) posterior purificação por eluição da proteína em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica (HIC). A estabilidade da proteína GFPuv extraída e purificada foi igualmente investigada em diferentes valores de pH.

MATERIAL E MÉTODOS

Transformação e Expressão

Células de *E. coli* DH5- α (Sambrook *et al.*, 1989; Naglak *et al.*, 1990) transformadas com o plasmídeo pGFPuv (Clontech®, USA), pelo método padrão do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989), estocadas (-75 °C) em caldo LB (Luria Bertani) adicionado de ampicilina (100 mg/mL) e glicerol (50%), foram transferidas para a superfície de agar LB/ ampicilina/ IPTG (concentração final de 0,5 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo, USB) em placas de Petri, incubadas a 37 °C por 24 h. Com lâmpada ultravioleta a 395 nm (UV, modelo UVL-4, UVP, USA), duas colônias fluorescentes e brilhantes foram selecionadas e transferidas, separadamente para tubos contendo caldo LB/ ampicilina (37 °C/24 h). Estas suspensões foram homogeneizadas em 100 mL de caldo LB/ ampicilina, divididas em duas alíquotas de 50 mL que foram incubadas em agitador metabólico (100 rpm/ 37 °C/ 3 h), quando se adicionou IPTG (concentração final de 0,5 mM) às suspensões. Após incubação por 24 h, as células expressando GFPuv foram sedimentadas por centrifugação (1 000 g/30 minutos/4 °C), e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento celular (*pellet*) foi ressuspenso em 10 mL de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0), novamente centrifugado e observado sob a luz UV. O sedimento apresentou intensa fluorescência.

Permeação

Permeação seletiva foi realizada por congelamento (-20 °C) lento (0,83 °C/min)/ descongelamento (20 °C) e sonicação (3 pulsos/6 segundos/25 de amplitude) – CDS (Vessoni Penna *et al.*, 2002). Este procedimento foi realizado na câmara de congelamento do liofilizador (Liofilizador LTF Systems™, USA), introduzindo-se termopares nas amostras e o acompanhamento realizado pelo programa específico (Lyphoware for Windows). As amostras foram levadas ao sonificador (High Intensity Ultrasonic Processor, Mod. VC100, USA) em banho de gelo. Os sedimentos celulares (massa seca de células

retidas na superfície de membrana de 0,22 mm de porosidade e secas a peso constante a 105 °C/24h) das amostras 01 (0,92 mg/mL) e 02 (1,46 mg/mL) foram ressuspensos em 1 000 mL de tampão de extração (TE – 25 mM Tris-HCl pH 8,0) e submetidos a quatro ciclos alternados de CDS.

Extração por partição em três fases (TPP – *Three Phase Partitioning*)

O princípio desta técnica de extração de proteínas consiste em duas etapas básicas: primeira – alíquota de 450 µL da amostra em TE foi adicionada de 300 µL sulfato de amônio (4 M) e 750 µL de *t*-butanol. A mistura foi submetida à agitação em vórtice e à centrifugação (6000g/2 min/temperatura ambiente), promovendo a formação de três fases: inferior aquosa (GFPuv dissolvida), superior *t*-butanol e de uma interface sólida, densa e branca de impurezas. As fases superior e de interface foram desprezadas. Na segunda etapa, a fase inferior aquosa, contendo a proteína de interesse, foi adicionada de 750 µL de *t*-butanol. A mistura foi submetida à nova agitação em vórtice e centrifugada (6000g/2 minutos/ temperatura ambiente). Houve formação de três fases: uma aquosa inferior, uma superior de *t*-butanol e uma interface sólida delgada e fluorescente contendo a GFPuv. Adição de *t*-butanol à fase aquosa inferior enquanto fluorescente (lâmpada UV) favoreceu novas extrações de GFPuv na interface.

Os quatro permeados (1°, 2°, 3° e 4°) obtidos a partir da cultura celular 01 por centrifugação (6000g/30 minutos/4 °C), foram individualmente submetidos à extração por TPP. Para a extração da GFPuv da cultura celular 02 os permeados foram reunidos e submetidos a TPP conjuntamente.

Purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (methyI HIC – *hydrophobic interaction chromatography*)

Foram utilizadas colunas cromatográficas de interação hidrofóbica de polipropileno, de 9,0 cm de altura, cônicas de 0,8 x 4,0 cm (Poly-Prep *Columns*, Bio-Rad, USA), com capacidade para 2,0 mL de leito empacotadas com a matriz metila (Macro-Prep HIC *supports*, Bio-Rad, USA), e capacidade para 10 mL de eluente.

A salinidade das matrizes das colunas HIC foi equilibrada com 2 mL de solução 2 M sulfato de amônio por 16 horas, permanecendo as extremidades tampadas. Decorrido este período, todo o conteúdo líquido da coluna foi desprezado. As amostras de GFPuv (250 µL) foram adicionadas de igual volume do tampão de ligação (250 µL

4 M sulfato de amônio). A concentração de sal das amostras foi igualada à concentração de sal do leito das colunas, tornando possível a interação das regiões hidrofóbicas da GFPuv com aquelas regiões hidrofóbicas da coluna. Observou-se através da lâmpada UV a retenção da GFPuv à região superior da coluna. Após eluição dessa solução, igual volume da solução 1,3 M sulfato de amônio foi adicionada às colunas. Devido a menor salinidade do tampão, as proteínas de menor hidrofobicidade, ou hidrofílicas, presentes, foram eluídas da coluna e a GFPuv espalhou-se através da coluna, permanecendo ligada à matriz HIC.

Para a completa eluição da GFPuv, alíquota de 750 mL do tampão Tris-HCl/ EDTA 10 mM (pH 8,0) foi adicionada à coluna. A decrescente concentração do sal expôs as regiões hidrofílicas da GFPuv ao tampão, promovendo a eluição da proteína da coluna. A eluição da proteína da coluna foi acompanhada por luz UV.

Quantificação da GFPuv

Os teores de GFPuv permeada, extraída e purificada foram determinados indiretamente da *curva de calibração* relacionando concentrações conhecidas da GFPuv padrão e a intensidade de fluorescência respectiva, quantificada em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC, Japão, $\lambda_{\text{excitação}} 394 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} 509 \text{ nm}$). A equação da *curva de calibração* obtida foi: teor de GFPuv ($\mu\text{g/mL}$) = $0,8576 + 0,0256 \times$ (intensidade de fluorescência), obtendo $R^2 = 0,9979$.

Quantificação das proteínas totais (curva de calibração de BSA – *Bovine Serum Albumine*)

As proteínas totais (representadas por albumina de soro bovino – BSA) obtidas durante as várias etapas da permeação, extração e purificação foram quantificadas a partir da curva de calibração da concentração de BSA mensurada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 280 nm (Beckman DU-600, USA). A equação da reta obtida foi: proteínas totais (mg/mL) = $-26,863 + 1727,2 (A_{280 \text{ nm}})$, $R^2 = 0,9943$.

Pico de excitação e de emissão da GFPuv padrão, extraída e purificada

Uma alíquota de GFPuv padrão (10 µg em 100 µL – Clontech®, USA) foi diluída em 400 µL de tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0, transferida para cubeta de quartzo e submetida à varredura no espectro de excitação na faixa de comprimento de onda entre 300 e 450 nm, mantendo fixo o comprimento de onda de emissão em 509 nm. A

maior intensidade de fluorescência (44,4) foi obtida no comprimento de onda de 394 nm. Para a pesquisa do espectro de emissão, a amostra foi submetida à varredura na faixa de comprimento de onda entre 450 e 550 nm, mantendo fixo o comprimento de onda de excitação em 394 nm. A maior intensidade de fluorescência (44,3) foi obtida no comprimento de onda de 508,8 nm.

Alíquota de GFPuv (cerca de 8,68 µg GFPuv/mL) permeada por CDS, posteriormente extraída por TPP, e alíquota (cerca de 8,84 µg GFPuv/mL) purificada por eluição (HIC) tiveram as intensidades de fluorescência mensuradas no espectrofluorímetro para determinar os picos próximos de emissão e de excitação. Para ambas as amostras os picos de emissão e de excitação foram próximos de 509 nm e 394 nm, respectivamente.

Eletoforese

Utilizou-se o gel de poliacrilamida (SDS – page) a 12% para a corrida das amostras de GFPuv (permeadas, extraídas e purificadas) diluídas em tampão 10 mM Tris-HCl (pH=8,0), homogeneizadas e previamente incubadas por 5 minutos em banho de água fervente. No gel polimerizado foram aplicados 10 µL das amostras de GFPuv e 1 µL do padrão de peso de 14.300 a 200.000 Da (*High range* da Gibco BRL® Products), diluído 1:5 em tampão 10 mM Tris-HCl (pH=8,0). A corrida foi realizada à temperatura ambiente por 30 min em 50 V e 50 min em 200 V. A coloração foi efetuada por imersão do gel em solução corante por 10 min, e depois em solução descorante por 2 dias, havendo a troca da solução a cada 24 horas, até que as bandas estivessem bem visíveis (Sambrook *et al.*, 1989). O gel foi colocado entre folhas de celofane e exposto à temperatura ambiente para secar.

Estabilidade da GFPuv em diferentes valores de pH

Amostras de GFPuv padrão, extraída e purificada foram expostas a diferentes valores de pH, nas soluções tampões: (i) 10 mM de acetato de sódio/ácido acético (pH 3,4 a 5,6), (ii) 10 mM fosfato de potássio monobásico/fosfato de potássio dibásico (pH 5,8 a 7,0) e (iii) 10 mM Tris-HCl (pH 7,2 a 9,8). O intervalo de pH entre 3,2 e 9,8, com variação aproximada de 0,2 foi escolhido para a determinação do pI da GFPuv. O potenciômetro AR-20 (Fisher Scientific, USA) foi calibrado previamente com tampões padrões (Synth, Brasil) de valores de pH conhecidos: 4,0, 7,0 e 9,0.

As soluções tampão foram distribuídas em microtubos identificados, adicionadas de alíquotas de GFPuv em concentrações aproximadas de 5,0 µg/mL, concentração

intermediária àquelas utilizadas para estabelecer a curva de calibração para GFPuv padrão. As amostras foram homogeneizadas, mantidas a 4 °C por 24 horas, e permaneceram à temperatura ambiente por 60 min. Os valores de pH foram novamente medidos, e os microtubos foram centrifugados a 6000g/30 min/temperatura ambiente. Não foi observada precipitação nos tubos para as amostras respectivas. As intensidades de fluorescência relativas a GFPuv foram obtidas em comprimentos de onda de excitação a 394 nm e de emissão a 509 nm, e convertidos para teores correspondentes, utilizando-se a equação da curva padrão. Alíquotas de 5 µg GFPuv padrão/mL foram expostas aos tampões acetato (pH 4,0 e 5,0), fosfato (pH 5,5, 6,0 e 7,0) e Tris (pH 8,0), nas mesmas condições. Os valores de pH foram medidos e associados aos correspondentes teores de GFPuv padrão.

Análise dos resultados

O teor de GFPuv foi expresso em microgramas de GFPuv por mililitro de amostra (µg GFPuv/mL). O teor de proteínas totais foi expresso em miligramas de BSA por mililitro de amostra (mg BSA/mL). A massa específica de GFPuv em relação ao teor total de proteínas (BSA) foi expressa em µg GFPuv/mg de proteínas totais. A produtividade específica foi obtida pela relação entre a concentração de GFPuv e a massa seca da amostra, µg GFPuv/mg de massa seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No procedimento de permeação (CDS), a temperatura da placa de congelamento, na câmara do liofilizador atingiu -40 °C e retornou para 20 °C, de forma linear. A temperatura das amostras decresceu linearmente até -13 °C, tendo havido neste ponto uma elevação abrupta da temperatura para -2 °C, mantendo-se estável por 10 min, com posterior abaixamento até atingir -20 °C, caracterizando-se o fenômeno de sobrefusão (Vessoni Penna *et al.*, 2002). A elevação da temperatura ocorreu gradativamente com ligeira estabilização ao redor de -3 °C, caracterizando o ponto crioscópico da suspensão de células de *E. coli*.

Amostras de GFPuv extraída por TPP e purificada por HIC, submetidas respectivamente à varredura dos espectros de excitação e de emissão no espectrofluorímetro, apresentaram espectros de fluorescência semelhantes para picos máximos de excitação de 394 nm e de emissão de 509 nm, ilustrados na Figura 1. Os espectros de excitação e de emissão foram semelhantes àqueles da GFPuv padrão.

No estudo de estabilidade da proteína em diferentes valores de pH, o valor do pI para as amostras de GFPuv

padrão, extraída e purificada foi verificado no intervalo entre pH 5,0 e 5,2, na região de inflexão das curvas (Figura 2), que relacionam teores de GFPuv e valores de pH. Apesar das proteínas apresentarem maior probabilidade de se agregarem próximo ao valor de pI, devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas, não foi observada qualquer natureza de precipitado nos tubos após 24 h de estabilização da proteína nos tampões. Ward (1998) constatou valor de pI para a GFP (selvagem) no intervalo de

valor de pH entre 4,7-5,1. Segundo Scopes (1994), os valores de pI para a maioria das proteínas de plantas e de bactérias são caracterizados entre pH 4,5 e 5,0, enquanto os valores de pI da maioria das proteínas animal situam-se entre pH 5,5 e 6,0.

No intervalo de valores de pH entre 6,0 e 9,8, a intensidade de fluorescência da proteína GFPuv mostrou-se máxima e estável, decrescendo entre valores de pH 5,5 e 4,5. Para os valores inferiores ao pH 4,5, a intensidade de

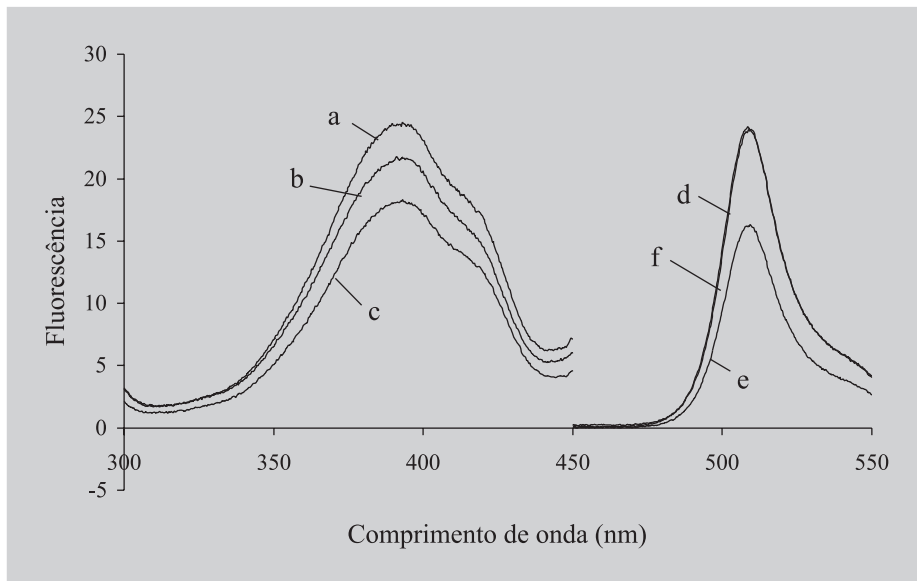


FIGURA 1 - Espectros de excitação (394 nm) para GFPuv padrão (a), extraída (b), purificada (c); e espectro de emissão (509 nm) da GFPuv padrão (d), extraída (e) e purificada (f).

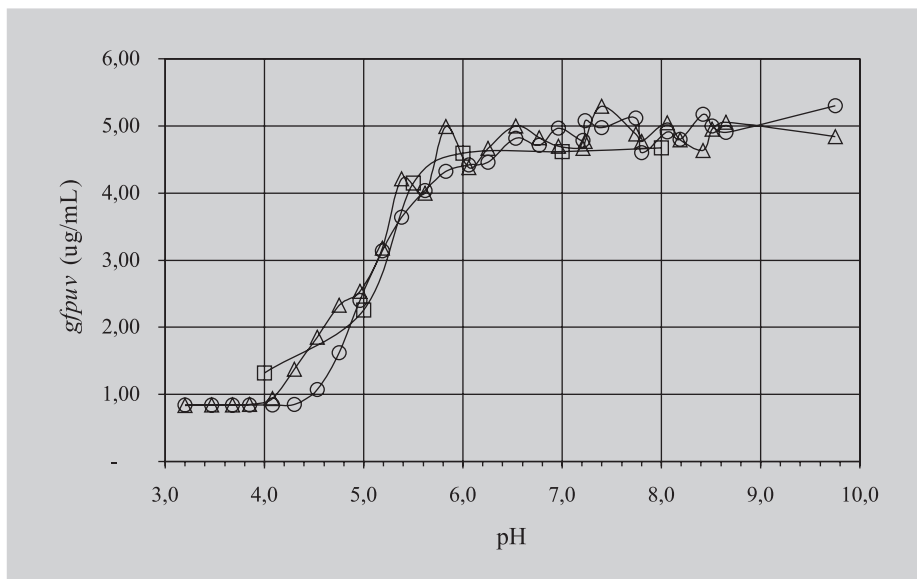


FIGURA 2 - Teores de GFPuv em diferentes valores de pH: GFPuv padrão (—□—), GFPuv extraída por TPP (—△—) e GFPuv purificada em HIC (—○—).

fluorescência foi mínima (Figura 2). Bokman e Ward (1981) constataram para GFP (selvagem) estabilidade na intensidade de fluorescência no intervalo de pH entre 5,5 e 12,0, decaindo, entretanto, entre os valores de pH 5,5 e 4,4, e para valores superiores ao pH 12,0.

Observa-se na Figura 2 que os procedimentos de permeação (CDS), extração (TPP) e purificação (HIC) não alteraram a estrutura da proteína, pois GFPuv extraída e purificada, se comparada à GFPuv padrão, apresentaram o mesmo perfil na variação da intensidade de fluorescência e de solubilidade quanto à variação do valor de pH.

Os teores de GFPuv obtidos na permeação por métodos físicos aplicados à cultura de células, posterior extração do permeado por TPP e purificação em HIC foram apresentados na Tabela I. A permeação sucessiva por CDS permitiu a liberação seletiva da proteína de interesse, facilitando a separação de macromoléculas precipitadas na interface branca da TPP. Observaram-se rendimentos superiores a 50% de permeação de GFPuv nos dois primei-

ros ciclos CDS, respectivamente: (i) 76,8% (33,34% + 43,46%) amostra 01; e (ii) 92,8% (65,99% + 26,81%) amostra 02.

Dos permeados da amostra 01, duas alíquotas de 450 µL foram submetidas à extração da GFPuv por TPP. Para efeito de cálculos foi considerada a média dos resultados obtidos. A extração possibilitou a eliminação da maioria das macromoléculas e resíduos celulares presentes nos permeados, fenômeno confirmado na amostra 01, pela quantificação das proteínas totais, em que se pôde observar a diminuição de contaminantes em 51 vezes no 1º ciclo CDS/TPP, 24 vezes no 2º CDS/TPP, 6,8 vezes no 3º CDS/TPP e 12,3 vezes no 4º CDS/TPP. No entanto, nos teores de GFPuv desta mesma amostra houve diminuição média de 1,4 vez nos três primeiros ciclos CDS/TPP e 4,6 vezes no 4º CDS/TPP. Em consequência, obtiveram-se valores satisfatórios na massa específica (150,10 µg GFPuv/mg para o 1º CDS/TPP), havendo gradativo decréscimo nos demais ciclos: 45,43 µg GFPuv/mg (2º CDS/

TABELA I - Resultados obtidos na permeação e na extração da GFPuv

Tratamento		GFPuv (mg/mL)	Rendimento (%)	Proteínas totais BSA (mg/mL)	Massa específica (mg GFPuv/ mg BSA)	Produtividade específica (mg GFPuv/ mg massa seca)
Amostra 01 – massa seca 0,92 mg/mL						
Permeação	1º CDS	315,03	33,34	87,32	3,61	342,42
	2º CDS	410,62	43,46	136,12	3,02	446,33
	3º CDS	136,94	14,50	31,65	4,33	148,85
	4º CDS	82,17	8,70	12,55	6,55	89,32
	Mistura	946,00	-	94,24	10,04	1.028,26
Extração (média de 2 alíquotas)	1º CDS	254,71	40,75	1,70	150,10	276,86
	2º CDS	256,69	41,07	5,65	45,43	279,01
	3º CDS	96,02	15,36	4,63	20,74	104,37
	4º CDS	17,66	2,83	1,02	17,26	19,19
	Mistura	196,22	-	2,38	82,53	213,28
	HIC	51,75	-	31,55	1,64	56,25
Amostra 02 – massa seca 1,44 mg/mL						
Permeação	1º CDS	429,39	65,99	61,82	6,95	294,10
	2º CDS	174,44	26,81	28,40	6,14	119,48
	3º CDS	39,10	6,01	8,61	4,54	26,78
	4º CDS	7,78	1,20	4,58	1,70	5,33
	Mistura	233,44	-	24,28	9,62	159,89
Mistura dos permeados	1ª extração	20,47	14,04	2,23	9,18	14,02
	2ª extração	93,40	64,07	1,04	89,75	63,97
	3ª extração	31,90	21,89	1,55	20,60	21,85
	Mistura	43,19	-	2,42	17,82	29,58
	HIC	12,69	-	3,40	3,74	8,69

TPP), 20,74 μg GFPuv/mg (3^o CDS/TPP) e 17,26 μg GFPuv/mg (4^o CDS/TPP).

A amostra 01 apresentou teores semelhantes de proteínas totais (2,38 mg/mL) em relação à amostra 02 (2,42 mg/mL). A maior eliminação de contaminantes indesejáveis presentes nos permeados ocorreu na amostra 01 (2,38 mg/mL), conduzindo a expressiva massa específica (82,53 mg/mg), 4,6 vezes maior em relação àquela obtida para a amostra 02 (17,82 mg/mg). No entanto, observou-se redução de 5,4 vezes na produtividade específica na amostra 02 (29,58 mg GFPuv/mg) após a extração por TPP, em relação à mistura dos permeados (159,89 mg GFPuv/mg), enquanto na amostra 01 observou-se redução de 4,8 vezes (1.028,26 mg GFPuv/mg para 213,28 mg GFPuv/mg) no mesmo parâmetro.

Na análise da eletroforese (Figura 3) observou-se aumento progressivo de impurezas do 1^o CDS para o 4^o CDS, devido ao rompimento da parede celular em consequência à associação dos sucessivos ciclos de CDS, permitindo a permeação de moléculas de tamanho superior a 60 kDa (Johnson, Hecht, 1994; Naglak *et al.*, 1990; Scott, 1991; Endow, Piston, 1998). O rendimento de 33,34% de GFPuv obtido na 1^o CDS foi muito próximo daquele obtido após a extração química por TPP (40,75%), possibilitando produtividades específicas próximas (342,42 mg GFPuv/mg e 276,86 mg GFPuv/mg). Para estas amostras, impurezas não foram visualizadas nas canaletas 3 e 7 da

Figura 3, indicando que a aplicação da extração química por TPP, seguida da purificação por HIC, da amostra permeada no 1^o ciclo de CDS não se fez necessária, pois este procedimento de permeação mostrou-se eficaz na separação da GFPuv das células bacterianas.

Porém, para a mistura de extratos obtidos por TPP (196,22 mg GFPuv/mL) e para a mistura dos extratos após a eluição (43,19 mg GFPuv/mL), observou-se remoção de impurezas, mas após eluição na HIC houve perda média de 3,5 vezes no teor de GFPuv em ambas amostras (51,75 mg GFPuv/mL e 12,69 mg GFPuv/mL, amostra 01 e 02, respectivamente, Tabela I). A baixa recuperação de GFPuv obtida após eluição por HIC pode ser explicada pela utilização da fase estacionária metila, de baixa hidrofobicidade (Tanford, 1972), havendo perda da proteína na fase fluida de sulfato de amônio, anterior à eluição com tampão. A eletroforese mostra uma única banda mais forte na região próxima a 29 kDa (massa molar padrão), 27 kDa (GFPuv padrão), ficando evidenciado que a extração da GFPuv já no primeiro ciclo de CDS apresentou baixa concentração de impurezas. A mistura dos permeados após extração por TPP (canaleta 7) e eluição por HIC (canaleta 8) renderam pureza à proteína GFPuv, apesar de demandarem maior custo e tempo de execução. Para sucessivas permeações aplicadas às células bacterianas, a associação de CDS e extração por TPP mostrou-se mais eficiente em relação à extração direta por TPP.

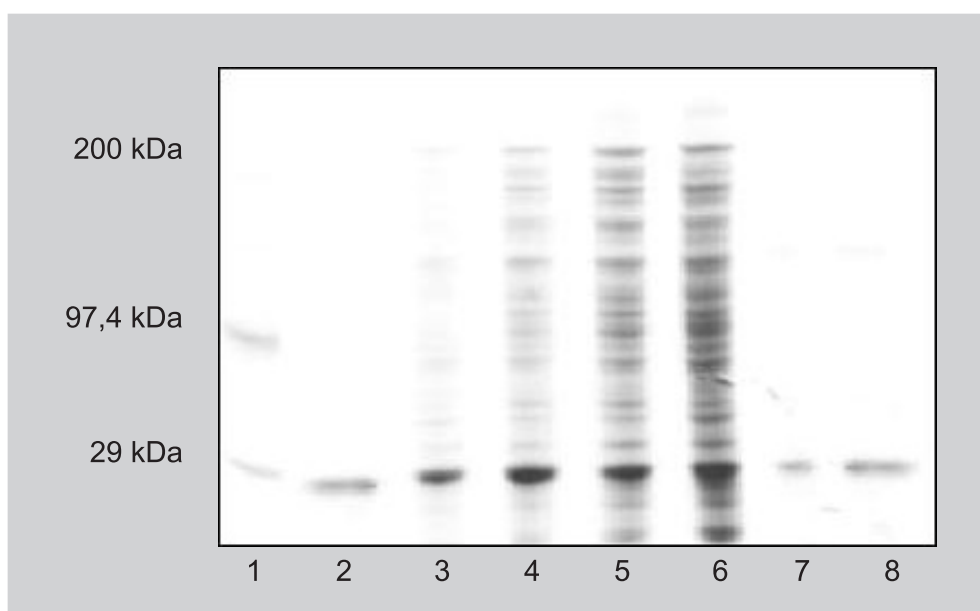


FIGURA 3 - Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-page) da amostra 01. Colunas: 1, massa molar (kDa); 2, GFPuv padrão (20,0 mg/mL); 3, permeado do 1^o ciclo CDS (32,15 mg/mL); 4, permeado do 2^o ciclo CDS (59,95 mg/mL); 5, permeado do 3^o ciclo CDS (38,61 mg/mL); 6, permeado do 4^o ciclo CDS (45,61 mg/mL); 7, mistura dos permeados após extração por TPP (12,77 mg/mL); e 8, mistura dos extratos após eluição em HIC (59,80 mg/mL).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o 1º ciclo de permeação seletiva (CDS) permitiu a liberação seletiva da GFPuv intracelular com rendimento semelhante àquele obtido por extração (TPP) e purificação (HIC) para os quais impurezas não foram visualizadas por eletroforese. As estruturas moleculares da GFPuv extraída e purificada mostraram-se inalteradas em valores de pH entre 6,0 e 9,8 e foram confirmadas nos espectros de emissão e de excitação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Irene A. Machoshvili, por sua dedicação, à FAPESP pelo auxílio financeiro e a CAPES, pela bolsa de Mestrado.

ABSTRACT

Extraction, purification and physical-chemical characterization of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) expressed in *Escherichia coli* cells

The recombinant green fluorescent protein (GFPuv) has been used as a marker in several research fields. The purpose of the present work was to evaluate the influence of the selective physical permeation procedure applied to the cells of Escherichia coli for the extraction of GFPuv in relation to the chemical procedures of extraction and purification. Transformed cells (0.92-1.44 mg/mL) of E. coli DH5-a expressing GFPuv were submitted to four cycles (1°, 2°, 3°, 4°) of freezing (-20 °C/ 0.83 °C/ min/ thawing interlaid by sonication (3 pulses/6 s/25 vibrations). The intracellular permeate with GFPuv in buffer solution (Tris-HCl 25 mM pH 8.0 + b-mercaptoethanol (1 mM) + PMSF (0.1 mM)) was submitted to the three-phase partitioning (TPP) method and subsequent purification through hydrophobic interaction chromatography column (HIC). The results showed that the first selective permeation cycle applied to the cells was more efficient in the release of the protein from the cell fragments without subsequent extraction and purification in relation to the second, third and fourth permeation procedures. The permeated, extracted and purified GFPuv showed similarity to the standard GFPuv characteristics of fluorescence, stability and solubility.

UNITERMS: Recombinant green fluorescent protein. GFPuv. *Escherichia coli*. Protein extraction, Three phase partitioning – TPP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOVA, M. K.; DIMOV, N. P.; NACHEV, N. D.; TSVETKOV, A. B. Preparative hydrophobic interaction chromatography as effective stage in the purification of glucagon and insulin. *Bulg. Chem. Commun.*, Sofia, v.29, p.90-100, 1997.
- BELL, D. J.; HOARE, M.; DUNNILL, P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. *Adv. Biochem. Eng.*, Berlin, v.26, p.1-72, 1983.
- BOKMAN, S. H.; WARD, W. W. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.101, p.1372-1380, 1981.
- CHALFIE, M., Tu, Y., EUSKIRCHEN G., WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. *Science*, Washington, v.263, p.802-805, 1994.
- COMMINGS, D. E.; MIGUEL, A. G.; LESSER, B. H. Nuclear proteins. VI. Fractionation of chromosomal non-histone proteins using hydrophobic chromatography. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.563, p.253-260, 1979.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. *Introdução à bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. p.500.
- CRAMERI, A.; WHITEHORN, E. A., TATE E.; STEMMER, W. P. C. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, Brentwood, v.14, p.315-319, 1996.
- DENNISON, C.; LOVRIENT, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression Purif.*, Orlando, v.11, p.149-161, 1997.
- DENNISON, C.; MOOLMAN, L.; PILLARY, C. S.; MEINESZ, R. E. *t*-Butanol: nature's gift for protein isolation. *S. Afr. J. Sci.*, Pretoria, v.96, p.159-160, 2000.
- ENDOW, S. A.; PISTON, D. W. Methods and Protocols. In: CHALFIE, M.; KAIN, S., ed. *Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols*. New York: Wiley-Liss, 1998. p.271-294.
- HRKAL, Z.; REJNKOVÁ, L, 1982. Hidrophobic interaction chromatography of serum proteins on Phenyl-Sepharose CL-4B. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.242, p.385-388, 1982.

- INOUE, S.; TSUJI, F. I. *Aequorea* green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.341, p.277-280, 1994.
- JOHNSON, B. H.; HECHT, M. H. Recombinant Proteins Can Be Isolated from *E. coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Bio/Technology*, New York, v.12, p.1357-1360, 1994.
- KNEEN, M.; FARINAS, J.; LI, Y.; VERKMAN, A. S. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *J. Biophys.*, Tokyo, v.74, p.1591-1599, 1998.
- LEFORT, S.; FERRARA, P. Hydrophobic adsorbents for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixture. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.361, p.209-216, 1986.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1990. p.57, p.108, p.127-152.
- LI, X.; ZHANG, G.; NGO, N.; ZHAO, X.; KAIN, S. R.; HUANG, C. C. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.242, n.45, p.28545-28549, 1997.
- NAGLAK, T. J.; HETTWER, D. J.; WANG, H. Y. Enzymatic Cell Lysis for Product Release. In: ASENJO, J.A., ed. *Separation process in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1990. p.144-175. (Bioprocess technology, 9).
- QUEIROZ, J. A.; GARCIA, F. A. P.; CABRAL, J. M. S. Purification of *Chromobacterium viscosum* lipase by hydrophobic interaction chromatography. *Isol. Purif.*, Jersey, v.3, p.1-7, 1999.
- QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotechnol.*, Oxford, v.87, p.143-159, 2001.
- ROBART, F. D.; WARD, W. W. Solvent perturbations of *Aequorea* green fluorescent protein. *Photochemistry*, London, v.51, 92s., 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*: 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SCOPES, R. K. *Protein purification: principles and practices*. 3ed. New York: Springer Verlag, 1994. 380p. (Spring advanced texts in chemistry).
- SCOTT, M. W. *Protein purification: design and scale up of downstream processing*, Hanser: Munich, 1991. p.62-65.
- SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor. *Process Biochem.*, Oxford, v.37, p.193-196, 2001a.
- SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization. *Protein Expression Purif.*, v.21, p.310-316, 2001b.
- TANFORD, C. Hydrophobic free energy micelle formation and the association of protein with amphiphiles. *J. Mol. Biol.*, Sidcup, v.67, p.59-74, 1972.
- VESSONI PENNA, T. C.; CHIARINI, E.; MACHOSHVILI, I. A.; ISHII, M.; PESSOA Jr., A. extraction of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) from *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v.98-100, p.791-802, 2002.
- VESSONI PENNA, T. C.; CHIARINI, E. Permeation Associated with Three-Phase-Partitioning Method on Release of Green Fluorescent Protein. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v.105-108, p.481-491, 2003.
- WARD, W. W.; CODY, C. W.; HART, R. C.; CORMIER, M. J. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* e *Aequorea* green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.*, Lawrence, v.31, p.611-615, 1980.
- WARD, W. W. Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein. In: CHALFIE, M., KAIN, S., eds. *Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols*. New York: Wiley-Liss, 1998. p.45 – 75.
- YAKHNIN, A. V.; VINOKUROV, L. M.; SURIN, A. K.; ALALHOV, Y. B. Green fluorescent protein purification by organic extraction. *Protein Expression Purif.*, Orlando, v.14, p.382-386, 1998.

Recebido para publicação em 27 de dezembro de 2002.