

Padronização de um protocolo de solubilização da lectina recombinante *Bauhinia forficata* (BfLII)

DIEGO SERRASOL AMARAL¹; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA¹;AMILTON
SEIXAS NETO²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹ Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel
guima.sousa07@gmail.com; diegos.amaral@outlook.com

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
CDTec, UFPel - amiltonseixas@gmail.com

³Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec- dmpluc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Corpos de inclusão são formados frequentemente quando proteínas heterólogas são produzidas em grande quantidade em *Escherichia coli*. Estas proteínas são na maioria das vezes inativas e a desnaturação e redobramento delas são necessários para obter a forma ativa (Chuan He & Kouhei Ohnishi, 2017). O correto dobramento *in vitro* de proteínas recombinantes expressas em bactérias permanece um processo ineficiente e empírico que limita o uso de muitas proteínas heterólogas (KURUCZ,et al 1995), neste trabalho procurou-se desenvolver um protocolo de purificação e remodelamento visando a produção de uma lectina de *Bauhinia forficata* (BfLII) na forma ativa.

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga de forma reversível e específica à mono ou oligossacarídeos. Estão envolvidas em diversos processos biológicos, tais como sinalização celular, reconhecimento célula a célula e na defesa de plantas. É um grupo heterogêneo de proteínas encontrado em plantas, animais e microrganismos que tem sido utilizada na inibição de fungos, bactérias, vírus e até mesmo de células tumorais (Cagliari, Kremer & Pinto, 2018). Nos últimos anos a lectina de *Bauhinia forficata* tem sido alvo de algumas destas pesquisas. Apesar da produção desta proteína na forma recombinante ter sido alcançada com sucesso, sua produção em bactérias garante apenas parcialmente o redobramento correto da mesma.

Desta forma, neste trabalho procurou-se desenvolver um protocolo de purificação e remodelamento visando sua obtenção na forma ativa. Estes ensaios vão ajudar aumentar a quantidade de proteína ativa disponível, garantindo assim sua utilização em diversos ensaios de atividade biológica, o que deve propiciar entender os mecanismos biológicos complexos de glico-interações, trazendo as lectinas recombinantes para a vanguarda da glicobiologia.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção das lectinas recombinantes

Para a obtenção da lectina, o gene *bfl-II* previamente clonado no vetor de expressão pAE (pAE::*bfl-II*) foi transferido e expresso em *E. coli* BL21(DE3). A expressão foi feita em 500 mL de meio de cultivo Luria Berthani para a produção da proteína rBfL-II. A bactéria foi crescida até uma densidade ótica de 0,6 (DO 0,6) e induzida à expressão utilizando Galactose 2M durante três horas à 37° C e agitação de 120 rpm. Após a expressão as células foram reunidas por centrifugação da cultura e posteriormente ressupensas em tampão contendo 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl. As células foram lisadas utilizando-se um sonicador e centrifugadas novamente a 10.000 g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado e o precipitado utilizado para obtenção das proteínas dos corpos de inclusão por diferentes protocolos.

2.2 Protocolos de solubilização e redobramento da lectina rBfL-II

2.2.1 Solubilização com N-lauroilsarcosine

O precipitado obtido conforme descrito no item anterior foi ressuspensionado com o mesmo tampão utilizado na lise das células (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl) acrescido de N-lauroilsarcosine (SLS) a 2%. Centrifugado nas mesmas condições anteriores e foi repetido a operação mais duas vezes, armazenando o sobrenadante. Após as lavagens o pellet final foi ressuspensionado por 90 min. no mesmo tampão (KURUCZ, et al., 1995).

2.2.2 Solubilização usando ureia

Para este ensaio, o precipitado obtido após a lise e centrifugação, foi ressuspensionado com o mesmo tampão utilizado na lise, mas acrescido agora de Ureia a 2M. Os corpos de inclusão foram homogeneizados e então centrifugados nas mesmas condições anteriores. Esta operação foi repetida mais duas vezes, sempre se armazenando o sobrenadante. O precipitado final após as duas lavagens foi ressuspensionado por 90 min. no mesmo tampão inicial acrescido de 8M de ureia.

2.2.3 Solubilização com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

Neste experimento, as células foram submetidas a lise com tampão (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl), conforme descrito inicialmente e após centrifugação o sobrenadante foi armazenado e o sedimento foi lavado três vezes com mesmo tampão. Após a última centrifugação o precipitado foi suspenso no mesmo tampão anterior acrescido de SDS a 2%. O produto foi sonicado novamente até ficar claro. O excesso de SDS foi removido após descansa a 4 ° C por 4 horas e centrifugação a 10.000g por 10 min.. O SDS residual do sobrenadante foi retirado após adição de KCl na concentração final de 400 mM para a formação de cristal de SDS-KCl. Os cristais insolúveis formados foram removidos do sobrenadante

após a centrifugação como descrito anteriormente (Chuan He, Kouhei Ohnishi, 2017).

2.2.4 Solubilização com Triton-x e propanol

Para a obtenção das proteínas na forma solúvel, o sedimento foi ressuspenso no mesmo tampão inicial acrescido de 2% (v/v) de Triton -x. A etapa de sonicação foi repetida e o sedimento lavado duas vezes com 10 ml do mesmo tampão. O sedimento purificado do corpo de inclusão foi ressuspenso em 3 ml de tampão (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl) contendo ureia 2 M por 12 horas. A suspensão contendo os corpos de inclusão foi solubilizada em tampão novamente no mesmo tampão acrescido de 6 M de propanol. A suspensão foi armazenada em temperatura ambiente por 30 min e então centrifugada a 10000 g por 10 min a 4 ° C para obter um sobrenadante claro (Singh et al., 2012).

2.3 Analise em SDS-PAGE e quantificação das proteínas solubilizadas

Os sobrenadantes de todas as etapas e o pellet final de cada protocolo foram analisados por SDS – PAGE 12 % e os sobrenadantes das lavagens após a etapa de lise celular foram quantificados de acordo com a solubilização das proteínas utilizando o método de Bradford.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias transformadas produzem dentro de curtos períodos de tempo enormes quantidades de proteína rBfL-II, que se apresenta essencialmente em uma forma insolúvel e inativa de corpos de inclusão citoplasmáticos. A conversão deste aglomerado insolúvel em proteínas ativas geralmente requer procedimentos bioquímicos laboriosos e nem sempre eficazes que resultam em rendimentos variados (KURUCZ et al. 1995).

Os protocolos analisados que continham algum detergente em determinada etapa se mostraram mais eficientes em solubilizar os corpos de inclusão, pois nas etapas finais o mesmo apresentava uma redução de tamanho na inspeção visual. A quantificação confirmou a constatação anterior provando que o método utilizando o detergente N-Lauryl Sarcosine foi a mais eficiente em solubilizar os corpos de inclusão devida a maior concentração proteica (Tabela 1).

Entretanto as solubilizações não apresentaram eficiência total, visto que nos precipitados ainda era possível confirmar a presença da proteína em corpos de inclusão.

Tabela 1. Composição de tampões e resultado da capacidade de solubilizar rBfL-II de corpos de inclusão . As amostras foram quantificadas utilizando o método Bradford.

Agente solubilizante	Proteínas solubilizadas em µg/mL
N-lauroilsarcosine	202
Ureia	43,5

SDS	59,75
Triton X	82,75

A atividade hemaglutinante das frações purificadas foi testada, mas não foi possível verificar atividade.

4. CONCLUSÕES

Entre os protocolos testados os detergentes se mostraram determinantes na qualidade da solubilização das proteínas recombinantes, principalmente o N-Lauryl Sarcosine sendo o com a maior capacidade de solubilização.

Com isso deve ser pensada uma maneira de melhorar a eficiência de solubilização utilizando o mesmo, possivelmente adicionando algum agente caotrópico como a ureia nas etapas finais visando maior solubilização proteica.

As próximas etapas devem incluir a retirada lenta dos agentes solubilizantes e teste de atividade hemaglutinante para confirmar o redobramento das proteínas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies.

KURUCZ, I., TITUS, J. A. JOST, C. R.; SEGAL, D. M. **Molecular Immunology**, v. 32, n. 17/18, p. 1443-1452, 1995

Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS.

Chuan He, Kouhei Ohnishi. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **490** (2017) 1250e1253

Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications.
Cagliari, R.; Kremer, F. S. Pinto, L. S.. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 119, n. , p. 811-820, 2018

Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form.

Surinder M. Singh, Aparna Sharma, Arun K. Upadhyay, Anupam Singh, Lalit C. Garg, Amulya K. Panda. **Protein Expression and Purification** **81** (2012) 75–82