

BÁRBARA REGINA KAPP

ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS DE

Pichia pastoris

ARARAQUARA

2013

BÁRBARA REGINA KAPP

ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS DE

Pichia pastoris

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em
Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção
do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof^a. Dra. Edwil Aparecida de Lucca
Gáttas

ARARAQUARA

2013

“Quando você decide parar ou começar alguma coisa,
seja como for, você tem que seguir em frente.

Tudo que precisa é de atitude e determinação”

Yuuko Ichihara

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que mesmo nos caminhos mais tortuosos tentaram mostrar uma saída, por todo o apoio, por todos os momentos que passamos juntos. Agradeço por não me ensinarem uma resposta, mas sim a me questionar e descobrir minhas próprias conquistas.

Aos meus irmãos Nikolas Kapp e Thomas Kapp pelos momentos de descontração e apoio. As minhas cunhadas e aos meus sobrinhos.

Agradeço aos meus amigos, os melhores que eu pude fazer na faculdade, e que levarei para sempre, e lembrarei com carinho de todos os momentos que passamos juntos, compartilhando alegrias e tristezas: Renata Cristina Afonso, Arthur Zanetti, Renata Kurokawa, Ivy Ishino Carvalho, Cindy Nishihara, Heloisa Barbosa, Alice Haddad e Isabella Santos.

A minha amiga que decidiu seguir um novo caminho, mas que apoiou o início da minha jornada, Amanda Oliveira.

Aos meus amigos da Comissão de Formatura pela confiança, trabalho e dedicação: Mariana Zaghete, Juliane Vicentino, Rafael Bianchi, Vanessa Loria e Monique Gonçalves.

Ao Rômulo pelo auxílio e suporte, sem o qual esse trabalho não seria realizado. Ao Ederlan pela ajuda e ensinamentos.

A minha colega de laboratório que infelizmente não está mais entre nós, Adriana Midori.

Agradeço especialmente a minha orientadora Edwil Aparecida de Lucca Gáttas pela oportunidade de desenvolver um projeto que eu gosto ensinar e ter paciência.

Sumário

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 12 |
| 1.1 Biotecnologia | 12 |
| 1.2 A Levedura <i>Pichia pastoris</i> | 12 |
| 1.3 A Enzima Glicerol Quinase | 14 |
| 1.4 A Eletroforese | 15 |
| 2 Desenvolvimento | 16 |
| 2.1 Fermentação da <i>Pichia pastoris</i> | 16 |
| 2.2 Purificação da Amostra | 17 |
| 2.2.1 Ultrafiltração..... | 18 |
| 2.2.2 Precipitação | 19 |
| 2.2.2.1 Ácido Tricloro Acético | 19 |
| 2.2.2.2 Etanol | 19 |
| 2.2.2.2.1 Precipitação Única | 19 |
| 2.2.2.2.2 Precipitação Dupla..... | 20 |
| 2.2.2.3 Sulfato de Amônio | 20 |
| 2.3 Determinação de Proteínas | 21 |
| 2.4 Eletroforese | 22 |
| 2.4.1 Preparo do gel desnaturante (SDS-PAGE) | 22 |
| 2.4.1.1 Preparo das amostras e aplicação no gel | 24 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.1.2 | Condições da Eletroforese SDS PAGE | 25 |
| 2.4.2 | Coloração por Comassie Blue | 25 |
| 2.4.3 | Revelação por Prata | 25 |
| 2.4.3.1 | Metodologia I | 25 |
| 2.4.3.2 | Metodologia II | 26 |
| 3 | Resultados e Discussão | 27 |
| 3.1 | Fermentação da <i>Pichia pastoris</i> | 27 |
| 3.2 | Eletroforese | 29 |
| 3.2.1 | Ultrafiltração | 29 |
| 3.2.2 | Precipitação | 31 |
| 3.2.2.1 | Ácido Tricloroacético e Precipitação única por etanol | 31 |
| 3.2.2.2 | Precipitação Única por etanol | 32 |
| 3.2.2.3 | Sulfato de Amônio | 33 |
| 3.2.2.4 | Precipitação Dupla por etanol | 36 |
| 4 | Conclusão | 38 |
| 5 | Referências Bibliográficas | 39 |
| | Anexo Técnico..... | 43 |

RESUMO

A glicerol quinase é uma proteína tetramérica que cataliza a fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato, composta por quatro subunidades - sua análise eletroforética fornecerá apenas uma banda se for constatada a sua pureza num gel não desnaturante - e sua reação com o glicerol é dependente de magnésio e de ATP. A eletroforese de proteínas utiliza como suporte um gel de poliacrilamida, que é formado pela polimerização de monômeros de acrilamida $CH_2 = CH - CO - NH_2$ ao longo da sua cadeia e ligações cruzadas de cadeias pela inclusão de um co-monômero bifuncional apropriado, usualmente a N,N' - metileno-bis-acrilamida ou apenas Bis $CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$.

A eletroforese de proteínas mais comum é a que utiliza SDS para um gel de poliacrilamida desnaturante. O SDS é um sal chamado Dodecil Sulfato de Sódio que tem por característica se ligar a cadeia proteína nos resíduos de aminoácidos apolares, deixando com a carga negativa, sendo assim, toda proteína fica com carga total negativa, migrando para o anodo na eletroforese.

As técnicas de purificação utilizadas foram ultrafiltração e precipitação com ácido tricloro acético, etanol gelado e sulfato de amônio. A dupla precipitação com etanol resultou na recuperação de maior quantidade de proteínas. A coloração do gel com prata foi mais sensível do que Comassie blue. O gel de eletroforese mostrou quatro bandas, correspondentes às quatro subunidades da glicerol quinase quando revelados com prata em gel de SDS-PAGE

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática da estrutura tetramérica da glicerol quinase de <i>Escherichia coli</i> (KOGA ET AL, 1998)..... | 14 |
| Figura 2. Fluxograma das etapas de purificação da enzima glicerol quinase (GK) | 18 |
| Figura 3. Curva Padrão de proteína pelo método de Lowry (1951) | 21 |
| Figura 4. Semeadura da levedura <i>Pichia pastoris</i> em meio YPD Ágar | 27 |
| Figura 5. Levedura <i>Pichia pastoris</i> semeada do crescimento no meio BMGY..... | 28 |
| Figura 6. Eletroforese de gel de poliacrilamina desnaturante10% (gel de 6,5 cm) com coloração de prata I | 29 |
| Figura 7. . Eletroforese de gel de poliacrilamina desnaturante10% (gel de 6,5 cm) com coloração de Comassie blue | 30 |
| Figura 8. Absorbância a 280 nm de cada tubo obtido da coleta da coluna de Sepharose CL 6B | 32 |
| Figura 9. Absorbância a 280 nm de cada tubo obtido da coleta da coluna de Sepharose CL 6B | 33 |
| Figura 10. Eletroforese de gel de poliacrilamina desnaturante12% (gel de 10 cm) com coloração de prata II | 34 |
| Figura 11. Eletroforese de gel de poliacrilamina desnaturante12% (gel de 10 cm) com coloração de prata II | 36 |

Figura 12. Figura 12. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE, 12% (gel 10 cm) coloração

de prata II..... 37

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Concentrações para gel de resolução, 9 mL, para duas placas de 6,5 cm | 22 |
| Tabela 2. Concentrações para gel de resolução, 7 mL, para uma placa de 10 cm | 23 |
| Tabela 3. Concentrações para gel de empacotamento, para gel de 6,5 cm e 10 cm | 24 |
| Tabela 4. Diluições das amostras para aplicação no gel de eletroforese | 24 |
| Tabela 5. Concentrações de géis de poliacrilimida utilizadas | 29 |
| Tabela 6. Comparação dos teores de proteína obtidas nas diferentes etapas de precipitação | 31 |
| Tabela 7. Comparação da quantidade de proteínas antes e depois da diálise..... | 35 |
| Tabela 8. Comparação dos pesos das bandas do Padrão da Glicerol Quinase com a amostra fermentada | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ : absorvidade molar

λ : comprimento de onda (nm)

AgNO₃: nitrato de prata

AOX: álcool oxidase

ATP: adenosina trifosfato

BMMY: buffered complex médium containing methanol (meio tamponado complexo contendo metanol)

BMGY: buffered complex médium containing glycerol (meio tamponado complexo contendo glicerol)

BSA: albumina de soro bovino

CuSO₄: sulfato de cobre

Na₂CO₃: carbonato de sódio

Na₂S₂O₃: tiosulfato de sódio

Da: dalton

EC: Enzyme Commission (Comissão de Enzimas)

g: força gravitacional

GK: glicerol quinase

HCl: ácido clorídrico

kDa: kilodalton

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

K₂HPO₄: fosfato de potássio dibásico

mM: mili molar

N: normalidade

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

Na₂SO₄: sulfato de sódio

(NH₄)₂SO₄: sulfato de amônio

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

p/v: peso/volume

rpm: rotação por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese de gel de poliacrilamida com SDS

SDS: dodecil sulfato de sódio

T: concentração de acrilamida

TCA: ácido tricloro acético

Tris: tris hidroximetilaminometano

UV: ultravioleta

v/v: volume/volume

YNB: yeast nitrogen base (base nitrogenada de levedura)

YPDA: yeast extract peptone dextrose medium

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOTECNOLOGIA

A biotecnologia é uma área promissora tanto no mercado internacional quanto no nacional devido aos avanços em genômica, proteômica, bioinformática e bioindústria que contribuem com para o crescimento econômico e social, sendo que de 1993 para 1999 dobrou de tamanho. A aplicação das técnicas biotecnológicas estão inseridas em diversas áreas, na saúde, como a produção vacinas, transplantes e órgãos, e também na indústria, em polímeros, produtos químicos e eletrônica molecular. (JUDICE, 2006).

O mercado global de biotecnologia cresceu no período 2002-2006 a uma taxa composta de crescimento anual de 13,4% e gerou receitas de US\$ 153,7 bilhões no ano de 2006, para uma base de U\$ 92,9 bilhões em 2002. As Américas lideram o mercado global de biotecnologia, respondendo por 58,3% das receitas geradas em 2006. Em segundo lugar, situa-se a região da Ásia e Pacífico que gerou 23,9% das receitas globais no ano de 2006. (DATAMONITOR 2007)

Em 2001 constataram a existência de 304 empresas operantes no Brasil, sendo a maioria em Minas Gerais e São Paulo. (JUDICE, 2006). Em 2006, o Brasil ocupa o 5º lugar entre os países que mais empregam no setor de biotecnologia, seja em empresas privadas, públicas ou em institutos de pesquisas, após China, Suécia, Japão e Dinamarca. (GLOBAL BIOECONOMY CONSULTING LLC - 2007).

1.2 A LEVEDURA *Pichia Pastoris*

Durante os últimos 15 anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tornou-se um sistema altamente bem sucedido para a produção de uma variedade de proteínas heterólogas. (CEREGHINO and CREGG, 2000).

A produção de uma proteína funcional está intimamente relacionada com o maquinário celular do organismo de produzir a proteína. A levedura *Pichia pastoris* é um sistema útil para a expressão de miligramas a gramas de quantidades de proteínas tanto para pesquisas laboratoriais básicos quanto fabricação industrial.(MACAULEY-PATRICH et.al., 2005)

O sistema de expressão da *Pichia pastoris* tem sido usado com sucesso para a produção de mais de 500 proteínas. Para a expressão da proteína recombinante na *P. pastoris*, a concentração de metanol é o fator mais importante para maximizar a produção proteica porque a concentração de metanol afeta diretamente o crescimento celular e produção de proteína. (WU et.al., 2011)

O primeiro fator de importância para o uso desta levedura é o promotor altamente eficiente e regulado da álcool oxidase I (AOX1) que é usado como promotor para a expressão heteróloga. Esse promotor, que é fortemente reprimido quando as células são cultivadas em glicose e outras fontes de carbono, na presença do metanol, como única fonte de carbono, é induzido mais de 1000 vezes. A possibilidade de poder reprimir a expressão da proteína heteróloga tem importância na expressão de proteínas tóxicas produzidas pela célula. O segundo fator de importância da *Pichia pastoris* é que esta levedura prefere a via respiratória a um crescimento fermentativo. A relevância dessa preferência é devido à fermentação produzir etanol e ácido acético, que atingem níveis tóxicos rapidamente e inviabilizam as células e diminuindo sua produção proteica. (CEREGHINO et al, 2002).

O uso da *Pichia pastoris* como sistema de produção de proteínas heterólogas abrange diversas áreas, dentre elas temos os exemplos do seu uso no diagnóstico de doenças, como a expressão de Rhopty Protein 2 do *Toxoplasma gondii* (CHANG et.al., 2011), e estudos de proteínas humanas, como a caracterização funcional e estrutural da transferrina do soro humano (MIZUTANI et.al., 2010).

1.3 A ENZIMA GLICEROL QUINASE

A glicerol quinase (GK, E.C. 2.7.1.30: glicerol-3-fosfotranferase) cataliza a fosforilação do glicerol, diidroxiacetona e outras substâncias análogas, usando ATP como fonte de fosfato e íon magnésio. É uma enzima barata e estável na forma imobilizada. (CRANS E WHITESIDES, 1985).

A técnica de clonagem utilizada no microrganismo possibilitou a inserção do gene da glicerol quinase obtida de *Sacharomyces cerevisiae* em *Pichia pastoris* (AIZEMBERG, 2011). A glicerol quinase é uma proteína composta por quatro subunidades, como exemplificada na figura 1.

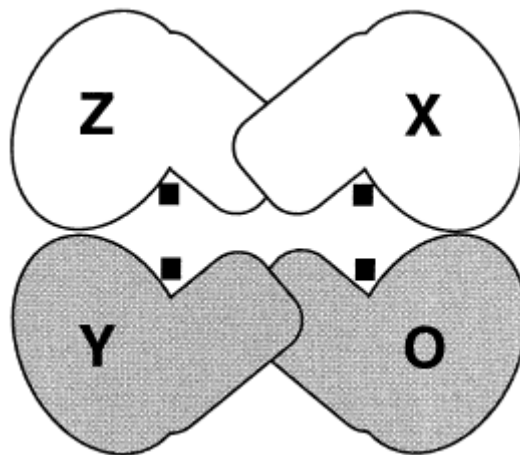


Figura 1. Representação esquemática da estrutura tetramérica da Glicerol Quinase de *Escherichia coli*. Fonte: Retirado de KOGA et. al., 1998.

A enzima de *E. coli* possui um peso molecular de 217000 e a de *Candida mycoderma*, 251000 Da. A glicerol quinase possui grupos sulfidríla em sua estrutura e é estável apenas em solução sem a presença oxigênio. Por outro lado, a presença de glicerol é essencial para a manutenção da sua estabilidade em solução. A glicerol quinase de *E. coli* é a mais estudada,

(THORNER, 1971) e o pH ideal para a sua atividade é 9,0 a 9,8. O ponto isoelétrico da proteína é 4,3 para *Thermus flavus* (HUANG et.al., 1997).

A glicerol quinase está presente em humanos e sua importância metabólica é relevante, pois participa da via de produção do triglicerídeos. Muitos estudos são feitos para avaliar a deficiência da glicerol quinase e seu efeito. A localização da glicerol quinase no genoma humano é no cromossomo X (Xp21.3), e pelo menos uma das mutações nesse gene leva a resistência a insulina e diabetes mellitus (STHEPHANIAN et.al., 2003) . A enzima pode ter relação com a distrofia muscular de Duchene (KENWRICK et.al., 1987).

1.4 A ELETROFORESE

A técnica de separação eletroforética é amplamente distribuída. Com a eletroforese uma separação altamente eficaz pode ser alcançada usando uma quantidade relativamente limitada de equipamentos. Os principais campos de aplicação da técnica são em pesquisas biológicas e bioquímicas, química protéica, farmacologia, medicina forense, investigações clínicas, ciência veterinária, controle alimentar bem como biologia molecular.

O princípio do método é baseado na influência de um campo elétrico sobre moléculas e as partículas carregadas tendem a migrar na direção do eletrodo de carga oposta. Durante esse processo, as substâncias são usualmente mantidas em soluções aquosas. Devido a suas variações de cargas e massas, diferentes moléculas e partículas de uma mistura migrarão em diferentes velocidades e serão separadas em frações individuais.

A mobilidade eletroforética, que é uma medida da velocidade de migração, é um parâmetro significativo e característico de uma molécula ou partícula carregada. A velocidade de migração é dependente dos valores de pK dos grupos carregados e do tamanho da molécula ou partícula. É influenciado pelo tipo, concentração e pH do tampão, pela temperatura e força do campo, bem como a natureza do material de suporte. (WESTERMEIER, 2005).

A eletroforese de proteínas utiliza como suporte um gel de poli(acrilamida), que é formado pela polimerização de monômeros de acrilamida $CH_2 = CH - CO - NH_2$ ao longo da sua cadeia e ligações cruzadas de cadeias pela inclusão de um co-monômero bifuncional apropriado, usualmente a N,N' - metileno-bis-acrilamida ou apenas Bis $CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$. A reação de polimerização produz, no entanto, cadeias aleatórias de poli(acrilamida) incorporando uma pequena proporção de moléculas de Bis, e essas podem, então, reagir com grupos de outras cadeias formando ligações cruzadas, resultando em uma rede tridimensional. (ANDREWS, 1985)

Há dois tipos de eletroforese para as proteínas, a mais comum é a que utiliza SDS e resulta em um gel de poli(acrilamida) desnaturante. O SDS é um sal chamado Dodecil Sulfato de Sódio que tem por característica se ligar a cadeia proteica nos resíduos de aminoácidos apolares, deixando-a com carga negativa e migrando para o anodo na eletroforese. Dessa forma, vemos a migração conforme o tamanho da molécula, ou seja, sua capacidade de permear a rede de poli(acrilamida). É chamada de desnaturante pois o SDS ao se ligar aos resíduos acaba destruindo a conformação terciária das proteínas. A técnica pode ter interferentes como carga, força iônica e porosidade do gel de acrilamida. (ANDREWS, 1985). O objetivo deste trabalho foi analisar, através da técnica de eletroforese, a enzima recombinante glicérol quinase obtida de *Pichia pastoris*.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 FERMENTAÇÃO DA *Pichia Pastoris*

A levedura utilizada foi obtida no Departamento de Ciências Biológicas, sendo o seu registro de SVL 654, retirado do acervo do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini. A levedura transformada recebeu o gene da glicérol quinase proveniente da *Sacharomyces cerevisiae*. (AIZEMBERG, 2011)

A levedura foi plaqueada em meio YPDA por 24h a 30°C, com a finalidade de rejuvenescer as células e isolar colônias. Após as 24h, duas alçadas de colônias foram adicionadas em Erlenmeyer com 50 mL de meio BMGY. A levedura ficou em meio BMGY por 24h, 30°C, 120 rpm (Incubadora Refrigerada com Agitação – TECNAL TE – 421). O meio BMGY contém glicerol é utilizado para o crescimento da biomassa da *Pichia pastoris*.

Terminado o crescimento no meio BMGY, os Erlenmeyers foram deixados por 2h em geladeira para sedimentar a levedura. O sobrenadante foi descartado, e as células resuspendidas em água estéril, para a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 2100) na determinação da densidade ótica, para posterior cálculo da quantidade do inóculo. Uma lâmina de microscopia foi feita para avaliação de contaminação. Em seguida as células foram transferidas para o meio BMMY para a indução da glicerol quinase.

Segundo o estudo de AIZEMBERG (2011), a melhor quantidade (mg/mL) de inóculo para ser transferida ao meio BMMY é de 0,1 mg/mL, e esta diretriz foi utilizada nesta etapa. E depois de inoculado em 50 mL de meio BMMY, o crescimento e a indução da glicerol quinase foi realizado, por 24h, 30°C a 120 rpm. Após 24h foi adicionado metanol 1% e mantido nestas condições por mais 24h. (AIZEMBERG, 2011).

Em seguida o meio foi transferido para tubos de centrifuga, e centrifugados a 15000 x g por 10 minutos, a 0°C. Após este tempo, o sobrenadante foi reservado e a massa de células foi descartada.

2.2 PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA

O meio fermentado foi previamente congelado em tubo para liofilizador com uma mistura de gelo, etanol e acetona e em seguida mantidos por 48h em freezer (-20°C). Os tubos foram colocados no liofilizador (Modulyod Freeze Dryer) até a secagem completa. O pó foi pesado e utilizado nas demais etapas, como esquematizadas na Figura 2.

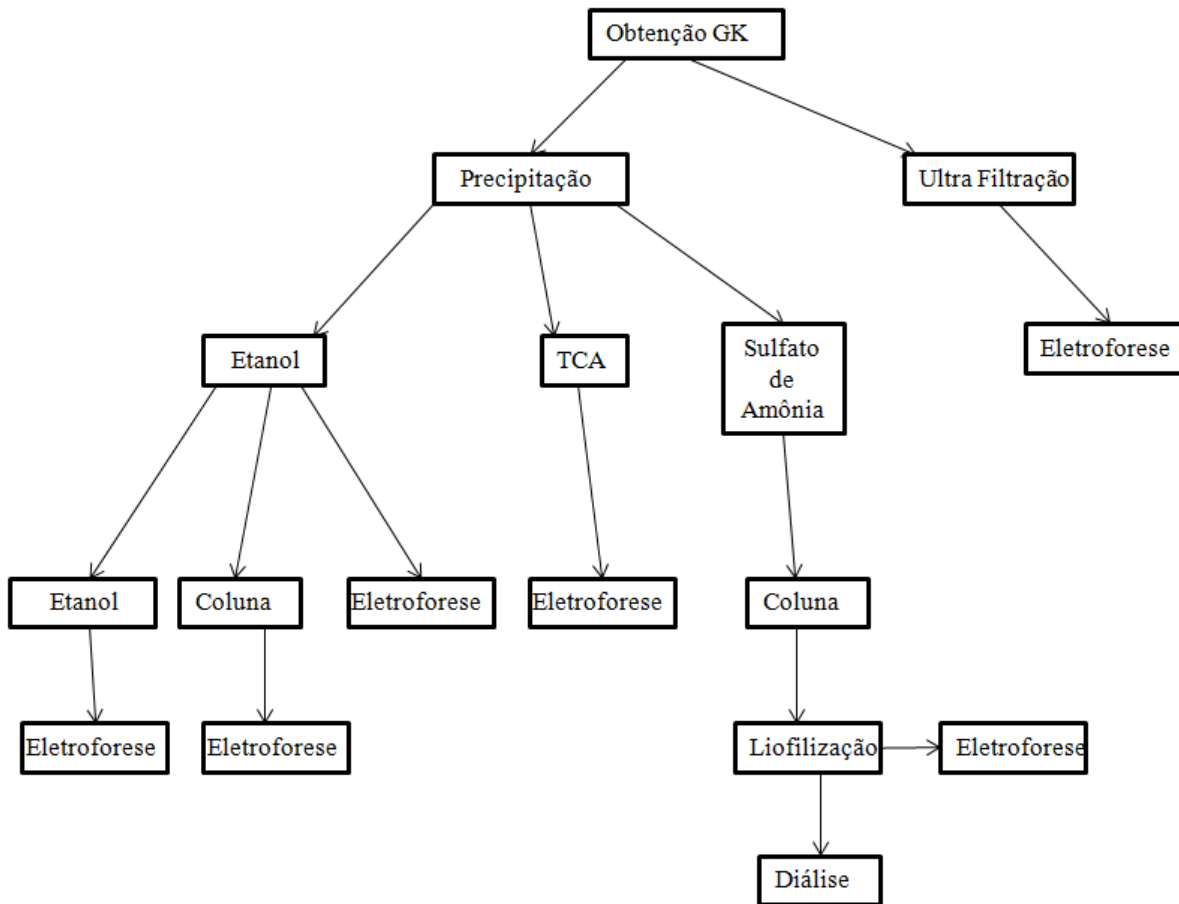


Figura 2. Fluxograma das etapas de purificação da enzima glicerol quinase (GK).

2.2.1 ULTRAFILTRAÇÃO.

O meio contém, além da enzima, os demais componentes do meio que também foram liofilizados. Portanto, uma tentativa de purificação da enzima glicerol quinase foi realizada empregando-se a centrifugação por membrana filtrante (Amicon® Ultra-15 centrifugal filter devices with low-binding Ultracel® membranes, User Guide MILLIPORE modelo 10.000 MWCO). O material recolhido da membrana foi suspenso em água e nas quantidades de 25mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL, que foram aplicadas no gel da eletroforese.

2.2.2 PRECIPITAÇÃO

2.2.2.1 ÁCIDO TRICLORO ACÉTICO

Uma alíquota de 100mg do meio liofilizado foi pesada e solubilizada em água destilada, na proporção 1g de liofilizado para 50 mL de solução, e homogeneizado por 30 minutos em agitador magnético. A solução foi filtrada em papel de filtro, e foi adicionado uma quantidade de 2 mL de ácido tricloroacético 60%, e em seguida centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi resuspendido a um volume de 10 mL com NaOH 0,1N e em seguida houve o doseamento de proteínas totais pelo método de Lowry (1951).

Para a aplicação no gel de SDS-PAGE, 1 mL do resuspendido foi precipitado novamente com TCA 60% e centrifugado a 4000 rpm, 10 minutos, 0°C (Epperdorf Centrifuge 5415 R), o precipitado foi neutralizado com NaOH 3N (1 gota) e 100 uL de tampão de amostra foi aplicado no gel de eletroforese.

2.2.2.2 ETANOL

2.2.2.2.1 PRECIPITAÇÃO ÚNICA

Pesou-se duas alíquotas, 100mg e 200mg, ambas foram solubilizadas em solução de NaCl 0,5 mol/L, na proporção 1g para 50 mL de solução, e homogeneizadas em agitador magnético por 30 minutos. Após a completa solubilização, as alíquotas foram filtradas em papel de filtro. As alíquotas foram precipitadas com etanol gelado (1:3) para que a concentração final de NaCl chegasse a 0,05 mol/L, e foram centrifugados a 20000 rpm, por 20 minutos, a 0°C (Centrifuga HITACHI Himac CR22GII). A baixa temperatura e a baixa concentração de sal facilitam a etapa de precipitação

O precipitado obtido a partir da alíquota de 100 mg foi resuspendido a 25 mL com NaOH 0,1N. Já o precipitado da alíquota de 200mg foi resuspendido a 12 mL com tampão

fosfato de potássio 10mM pH 7,6 com 0,5 mol/L NaCl e 0,01% de azida sódica. Nas duas alíquotas houve doseamento de proteína pelo método de Lowry (1951).

A alíquota proveniente de 200 mg de liofilizado foi passada por uma coluna cromatográfica de Sepharose CL 6B, fluxo de 4,8mL por tubo (12 minutos/tubo). A coluna tem 100cm X 2,5 cm, e o tampão é de fosfato de potássio 10mM pH 7,5 com NaCl 0,5mol/L e azida sódica 0,01%. Os conteúdos dos tubos foram recolhidos da coluna foram avaliados a 280 nm.

2.2.2.2.2 DUPLA PRECIPITAÇÃO

Uma alíquota de 1g do material liofilizado solubilizada em 50 mL NaCl 0,5 mol/L, por 30 minutos. A solução foi filtrada em papel de filtro e precipitada com etanol gelado (1:3) e NaCl 0,05% de concentração final. Centrifugou-se a solução a 20000 rpm por 20 minutos, 0°C (Centrifuga HITACHI Himac CR22GII). O precipitado foi resuspendido em água e novamente precipitado com etanol gelado (1:3) e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O material foi aplicado em eletroforese SDS-PAGE.

2.2.2.3 SULFATO DE AMÔNIO

A quantidade de sulfato de amônio adicionada para a precipitação foi relativa a 95% da concentração, ou seja, 35,65g,. Esta quantidade de sulfato de amônio foi determinada após consulta em tabela de precipitação pelo método no laboratório de Bioquímica de Alimentos. Após a adição do sulfato de amônio, a alíquota foi centrifugada, a 20000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi resuspendido com tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,5 contendo NaCl 0,5mol/L e azida sódica 0,01%. A proteína foi dosada pelo método de Lowry (1951). A amostra foi aplicada numa coluna cromatográfica de Sepharose CL 6B. Os tubos da coluna que forneceram picos de leitura a 280nm foram reunidos e liofilizados.

Após a liofilização, todo o conteúdo liofilizado foi solubilizado na menor quantidade de água MiliQ possível (3mL) e houve um novo doseamento de proteínas. Em seguida a amostra foi aplicada no gel de SDS-PAGE.

2.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas totais foi feita com base no método de Lowry (1951) que utiliza uma curva padrão de Soro Albumina Bovina. A reação utiliza reagente de sulfato de cobre que se adere as cadeias laterais de proteínas, e o reagente de Follin que auxilia na visualização da coloração azul.

Os reagentes utilizados na determinação seguem no Anexo.

A figura 3 mostra a curva padrão de proteína.

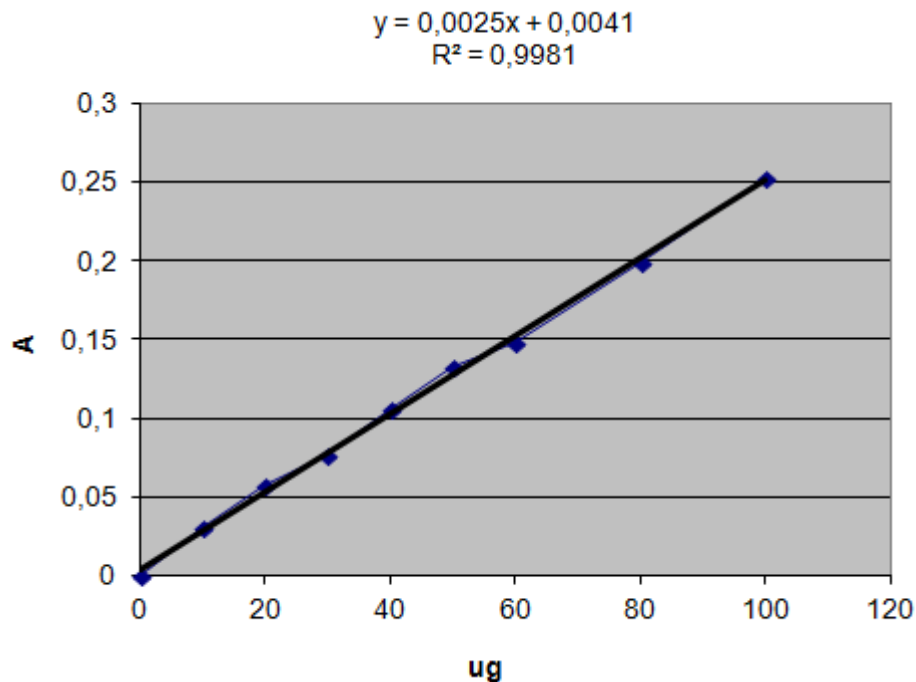


Figura 3. Curva padrão de proteína pelo método de Lowry (1951).

2.4 ELETROFORESE

2.4.1 – PREPARO DO GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

As placas de vidro foram devidamente limpas e secas com a finalidade de remover qualquer tipo de gordura que possa interferir na análise. As placas foram colocadas entre os espaçadores para formar o espaço onde a solução de poliacrilamida seria adicionada, com o cuidado de tanto as placas quanto os espaçadores estivessem no mesmo nível. Colocam-se os pentes e marca-se a placa de vidro cerca de 1 a 1,5 cm a baixo do pente. Foram preparados 2 géis (6,5cm e 10 cm no gel de resolução).

As concentrações de géis de resolução seguem descritas nas tabela 1 e 2, sendo a para o gel de 6,5 cm a concentração utilizada foi de 10% T e para o de 10 cm, 12% T. O gel de resolução para ser utilizado em uma eletroforese desnaturante é adicionado 70 μ L de SDS. As soluções de géis de resolução foram devidamente misturadas antes da adição do TEMED e persulfato de amônio. Os géis foram transferidos para o “sanduiche” formado pelas placas de vidro e os espaçadores até a marca dos 1,5cm do pente.

Tabela 1 – Concentrações para gel de resolução, 9 mL, para duas placas de 6,5 cm

| Tampão Tris- | | | | | |
|---------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | Acrilamida | HCl pH 8,9 10 | H₂O | Persulfato de | TEMED |
| % T | 30% (mL) | x (mL) | (mL) | Amônia 10% (μL) | (μL) |
| 8,0 | 2,4 | 0,9 | 5,60 | 70 | 10 |
| 9,0 | 2,7 | 0,9 | 5,30 | 70 | 10 |
| 10,0 | 3 | 0,9 | 5 | 70 | 10 |
| 11,0 | 3,3 | 0,9 | 4,7 | 70 | 10 |

Tabela 2. Concentrações para gel de resolução, 7 mL, uma placa de 10 cm

| Tampão Tris- | | | | | |
|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|--------------|
| | Acrilamida | HCl pH 8,9 | H₂O | Persulfato de | TEMED |
| % T | 30% (mL) | (mL) | (mL) | Amônia 10% (µL) | (µL) |
| 7,0 | 1,64 | 1,75 | 3,57 | 35 | 10 |
| 10,0 | 2,34 | 1,75 | 2,87 | 35 | 10 |
| 12,0 | 2,8 | 1,75 | 2,4 | 35 | 10 |

Uma quantidade de solução saturada de n-butanol ou água foi adicionada depois dos géis de resolução para impedir que a superfície fique irregular. Depois da polimerização estar completa, cerca de 10 minutos, a água ou n-butanol foram retiradas, e no caso da última houve a lavagem do gel e secagem com papel de filtro.

Para o gel de empacotamento, a concentração utilizada foi a de 4% T segundo a Tabela 3. O gel após preparado foi adicionado sobre os géis de resolução até a altura da placa e, antes da polimerização estar completa, o pente de teflon foi inserido no gel, certificando a ausência de bolhas de ar sob os dentes do pente.

Tabela 3 – Concentrações para gel de Empacotamento, para gel de 6,5 e 10 cm

| % T | Solução | Tris HCl 10x | H₂O (mL) | Persulfato de | TEMED |
|------------|-------------------|---------------------|----------------------------|----------------------|--------------|
| | Acrilamida | pH 6,8 | | Amônia 10% | (mL) |
| | 30% (mL) | | | (mL) | |
| 3 | 0,503 | 0,5 | 3,99 | 0,05 | 0,01 |
| 4 | 0,67 | 0,5 | 3,83 | 0,05 | 0,01 |
| 5 | 0,838 | 0,5 | 3,60 | 0,05 | 0,01 |

Para qualquer concentração de gel se adiciona 0,070 mL de solução SDS 10%

2.4.1.1 – PREPARO DAS AMOSTRAS E APLICAÇÃO NO GEL

Os pentes foram cuidadosamente removidos para manter a integridade do poço. O reservatório superior foi completado com tampão de corrida, assegurando que os poços estivessem totalmente completos com o tampão. Após isso se encheu o tanque inferior com o tampão de corrida. Para a aplicação das amostras no gel, as mesmas foram diluídas segundo a tabela 4 para a definir qual era a melhor concentração para visualizar a proteína.

Tabela 4. Diluições das amostras para aplicação no gel de eletroforese.

| Diluição | Quantidade de | Tampão de | Água (mL) |
|-----------------|----------------------|---------------------|------------------|
| | Amostra (mL) | Amostra (mL) | |
| 2x | 0,1 | 0,1 | - |
| 4x | 0,05 | 0,1 | 0,05 |
| 10x | 0,02 | 0,1 | 0,08 |

As amostras, depois de diluídas, foram aquecidas a 95°C, por 2 minutos para desnaturar as proteínas e assegurar a quantidade máxima de SDS a ligação às proteínas. As

amostras foram resfriadas, em seguida, até à temperatura ambiente. Foram aplicadas 20 μ L de cada amostra.

3.4.1.2 – CONDIÇÕES DA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

A voltagem utilizada foi de 200 V, até que a banda de azul de bromofenol atingisse o fundo do gel. As placas foram removidas e cuidadosamente retiradas do espaçador e transferidas a uma cuba. O gel foi corado com um método sensível e apropriado.

2.4.2 – COLORAÇÃO POR COMASSIE BLUE

O gel foi acomodado em um de recipiente plástico ou vidro, e a solução de coloração foi adicionada até cobrir o gel completamente. O gel permaneceu coberto por um período “overnight” para garantir a coloração. A solução foi retirada e o gel descolorado com de solução descolorante e mantido sob agitação até a definição das bandas de proteína. O gel foi armazenado em ácido acético 5%.

2.4.3 – REVELAÇÃO POR PRATA

2.4.3.1 – METODOLOGIA I

Colocou-se o gel num recipiente plástico e o gel colocado em presença de uma solução fixadora suficiente para cobrir o gel. O tempo mínimo de agitação é 20 minutos até “overnight” com agitação suave. Retirada a solução fixadora e adicionado uma quantidade suficiente de metanol 50 % para cobrir o gel com agitação suave por 10 minutos.

Removeu-se a solução de metanol e lavou-se o gel com água deionizada por 10 minutos. Em seguida, embebeu-se o gel em solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto e o gel foi lavado duas vezes com água deionizada, e cada lavagem por 1 minuto.

Submergiu-se o gel em solução de nitrato de prata 0,1% gelado por 20 minutos e após esta etapa o gel foi lavado duas vezes com água deionizada e novamente cada lavagem por 1 minuto.

Em seguida, o gel foi embebido na solução de desenvolvimento e agitado vigorosamente até o aparecimento da cor das bandas. Neste caso, se a solução ficar de cor amarelada, a mesma deve ser substituída por uma nova, já que a solução deve ficar transparente.

Após a coloração desejada, retirou-se a solução de desenvolvimento e adicionou a solução de parada (ácido acético 5%). Armazenou-se o gel corado com prata em solução de ácido acético 1%.

2.4.3.2 – METODOLOGIA II

O gel foi incubado na solução 1 (metanol e ácido acético) por 30 minutos ou até overnight. Incubou-se o gel na solução 2 (7 mL da solução 1 em 60 mL de água deionizada) por 15 minutos, sob agitação.

O gel foi lavado com água deionizada três vezes e cada vez por 5 minutos. O gel foi submergido em solução de tiosulfato de sódio 0,02%. Lavou-se o gel com água deionizada por 30 segundos, três vezes. Adicionou-se a solução de nitrato de prata 0,2% e formaldeído 40 μ L, sob refrigeração e abrigo de luz por 20 minutos.

Lavou-se com água deionizada, por três vezes por 20 segundos cada. O gel foi submergido na solução 5 (Solução carbonato de sódio 6%, formaldeído 30 μ L e 1,2 mL da solução de tiosulfato de sódio) até atingir a coloração desejada. Sob refrigeração e abrigo de luz. Após a coloração atingida, a coloração foi parada com solução de 5% ácido acético e o gel foi conservado em solução de glicerina 11,7%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FERMENTAÇÃO DA *Pichia pastoris*

Como descrito no item 2.1, a levedura foi primeiramente plaqueada em meio YPD Ágar com a finalidade de rejuvenescimento e obter colônias a serem inoculadas em meio BMGY. O resultado é observado na Figura 4. Notou-se o isolamento de colônias e ausência de contaminação por microscopia.



Figura 4. Semeadura da levedura *Pichia pastoris* em meio YPD Ágar

Para o inóculo da *Pichia pastoris* do meio BMGY para o BMMY, uma alíquota do meio BMGY foi diluída a 100x e feita à leitura a 570nm (Espectrofotômetro Vis 200), que resultou em uma absorbância de 0,356. Segundo AIZEMBERG (2011), para determinar a mg/mL de células usa-se a seguinte fórmula:

$$mg/mL = F * \Delta A_{570nm} * diluição$$

O Fator (F) utilizado para o cálculo foi o mesmo descrito por AIZEMBERG (2011) por ser a mesma levedura nas mesmas condições, sendo $F = 0,28$ retirado da curva de

crescimento. Dessa forma, o cálculo utilizando a absorvância da densidade optica a quantidade foi de 9,968 mg/mL.

O melhor inóculo para *Pichia pastoris* é de 0,1 mg/mL, descrito por AIZEMBERG (2011) que observou que para esta quantidade de inóculo a atividade enzimática atinge o seu pico máximo e a biomassa se mantem constante mesmo com valores maiores que 0,1 mg/mL.

Portanto, a quantidade inoculada em cada 50 mL meio BMMY foi de 0,502 mL da suspensão feita pela biomassa do meio BMGY. Para certificar que não houve contaminação durante a fermentação no meio BMGY, foi plaqueado a suspensão no meio YPD Ágar que pode ser observado na Figura 5.



Figura 5. Levedura *Pichia pastoris* semeado do crescimento no meio BMGY.

3.2 ELETROFORESE

A eletroforese foi feita seguindo as quantidades padrões já utilizadas nos laboratórios, de Biotecnologia de Alimentos e Bioquímica de Alimentos. As concentrações utilizadas para cada gel, em cada laboratório segue na tabela 4.

Tabela 5. Concentrações de géis de poliacrílimida utilizadas

| Tamanho da Placa (cm) | Tamanho do gel de Resolução (cm) | % T Gel Concentrador | % T Gel Resolução |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------|
| 8 | 6,5 | 4 | 10 |
| 12 | 10 | 4 | 12 |

3.2.1 – ULTRAFILTRAÇÃO

O padrão da enzima glicerol quinase utilizado foi de *Escherichia coli* (SIGMA) para avaliar se houve a produção da glicerol quinase pela *Pichia pastoris*.

Na figura 6 podemos observar o gel de eletroforese com as amostras obtidas da purificação por Ultrafiltração com MILLIPORE 10.000 MWCO, que a porção retida na membrana foi resuspendida para posterior aplicação.

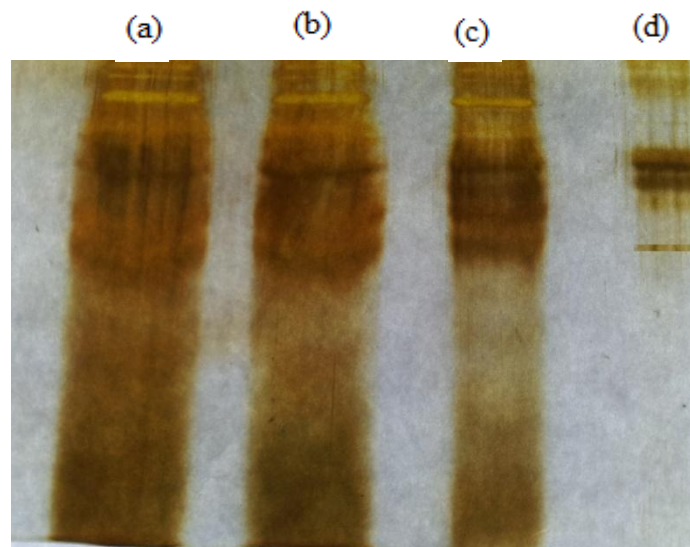


Figura 6. Eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturalante 10% (gel de 6,5 cm) com coloração de prata I (2.3.3.2.1). a) 100mg do meio BMMY liofilizado e centrifugado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; b) 50 mg do meio BMMY liofilizado e centrifugado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; c) 25 mg de meio BMMY liofilizado e

centrigado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; d) padrão de glicerol quinase (SIGMA). Cada amostra foi diluída 2X conforme item (2.3.1.1) e aplicado 20 μ L de amostra em cada poço.

Como observado na figura 6 , houve a produção da enzima glicerol quinase, mas a centrifugação utilizando a membrana MILLIPORE 10.000 MWCO foi ineficiente para retirar o meio de cultura, se mostrando um método de purificação pouco eficaz. Dessa forma, foram feitas novas tentativas de tentar melhorar a visualização do gel e retirar as proteínas que não interessam. Podemos observar também, uma proteína na parte superior do gel que não revela pelo método da prata, mas que é altamente repetitiva e conservada.

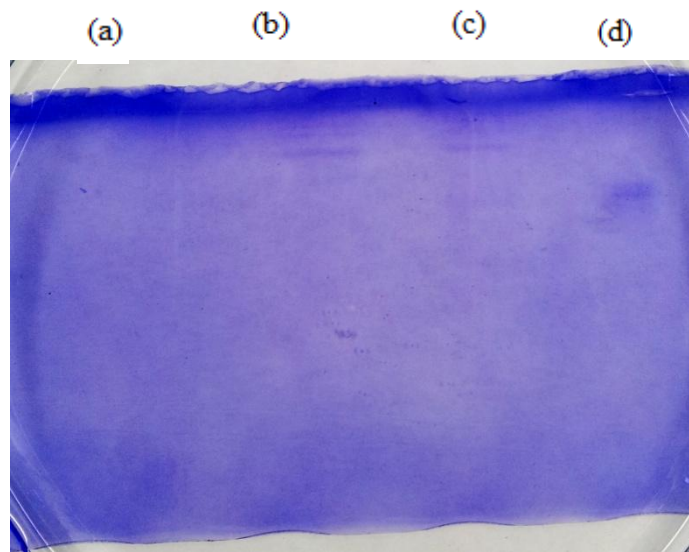


Figura 7. Eletroforese de gel de poliacrilamina desnaturalante a 10% (gel de 6,5 cm) com coloração Comassie Blue (2.3.3.1). a) 100mg do meio BMMY liofilizado e centrifugado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; b) 50 mg do meio BMMY liofilizado e centrifugado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; c) 25 mg de meio BMMY liofilizado e centrifugado com membrana MILLIPORE 10.000 MWCO; d) padrão de glicerol quinase (SIGMA). Cada amostra foi diluída 2X como consta no Desenvolvimento (2.3.1.1) e aplicado 20 μ L em cada poço.

Na figura 7, podemos observar que a coloração de Comassie não é eficaz para a concentração de proteínas presentes. No poço d) aparece apenas o padrão em tonalidade muito clara. Na mesma altura não há proteínas nos demais poços. A mesma proteína que não era corada com prata na figura 5 apresenta coloração em Comassie Blue.

3.2.2 – PRECIPITAÇÃO

3.2.2.1 – ÁCIDO TRICLOROACÉTICO E PRECIPITAÇÃO ÚNICA POR ETANOL

As quantidades de proteínas obtidas na etapa de precipitação podem ser visualizados na tabela 5. Para melhorar a aplicabilidade, ou seja, maior quantidade de proteínas aplicadas no gel, 1 mL da solução precipitada com TCA e com Etanol (100mg) foram novamente precipitadas com TCA 60%. Mesmo após a segunda precipitação a não foi visualizada nenhuma banda no gel de eletroforese.

Tabela 6. Comparação dos teores de proteínas obtidas nas diferentes etapas de precipitação

| Método de Precipitação | Quantidade pesada (mg) | Quantidade de Proteína ($\mu\text{g/mL}$) | Volume final (mL) |
|-------------------------------|-------------------------------|---|--------------------------|
| TCA | 100 | 82,6 | 10 |
| Etanol | 100 | 42,8 | 25 |
| Etanol | 200 | 1727 | 12 |

3.2.2.2 – PRECIPITAÇÃO ÚNICA POR ETANOL

O material proveniente de 200mg do meio liofilizado foi adicionado na coluna de SEPHAROSE CL 6B, como mostra à figura 8, a leitura dos tubos recolhidos, a 280nm.

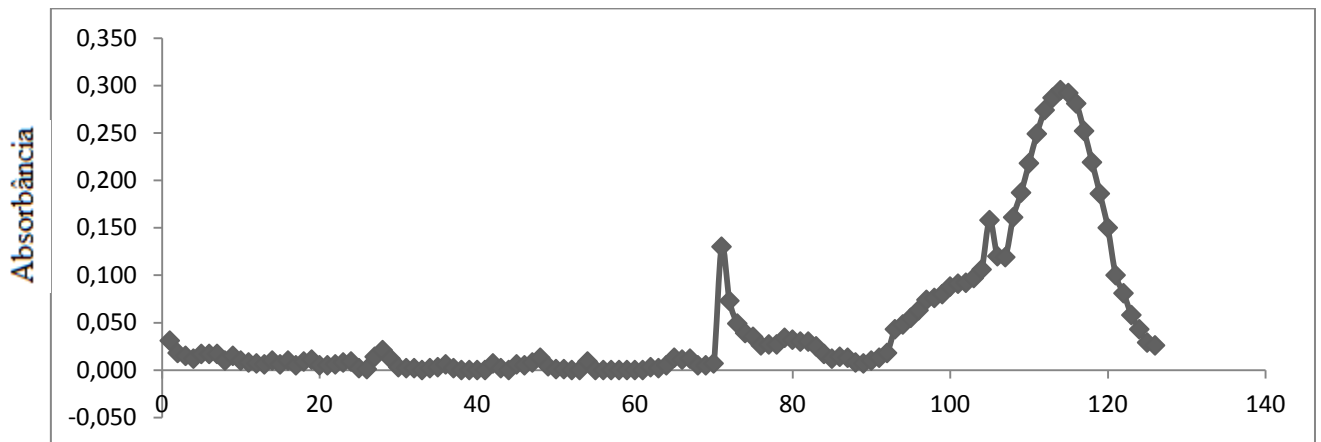


Figura 8. Absorbância a 280 nm de cada tubo obtido da coleta da coluna de Sepharose CL 6B. Aplicação de 12 mL do extrato obtido a partir de 200mg de meio liofilizado da levedura *Pichia pastoris* em BMMY.

Na figura 8 visualizamos 3 picos, correspondentes as leituras dos tubos 71, 105 e 114. O conteúdo dos tubos 114 ao 119 foram acumulados em um único frasco. Considerando a baixa quantidade de absorbância obtida na leitura dos tubos, precipitações sucessivas de cada tubo coletado foram realizadas para concentrar a maior quantidade de proteínas.

Para esta precipitação utilizou-se TCA 60% e após as precipitações as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida. Não houve aparecimento de bandas no gel. Outro fato que deve ser ressaltado é que no tubo 71 e 105 houve a queda de energia e foi coletado um volume maior que 4,8 mL.

3.2.2.3. – SULFATO DE AMÔNIO

O outro material que passou pela coluna de SEPHAROSE foi o precipitado por sulfato de amônio, e a figura 9 mostra, os resultados das leituras das absorvâncias em 280nm.

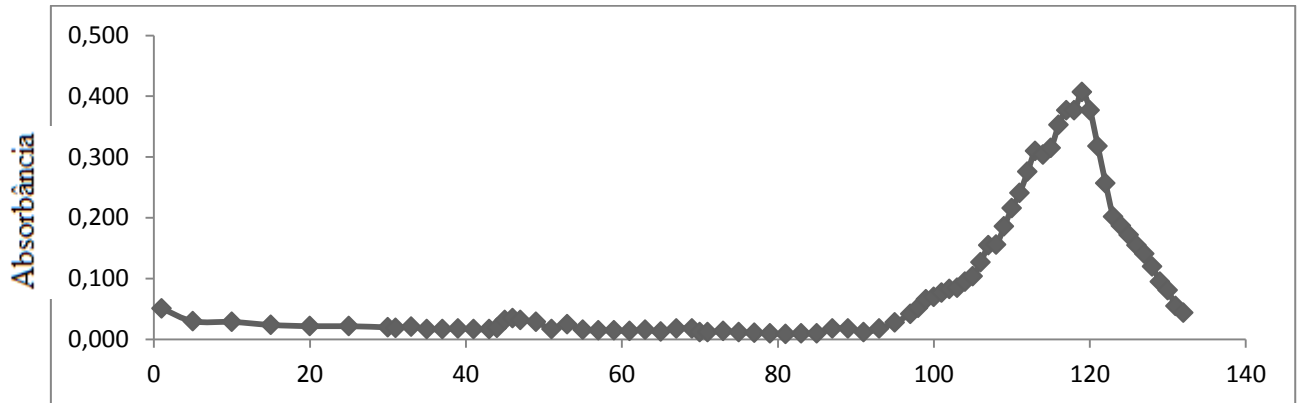


Figura 9. Absorbância a 280 nm de cada tubo obtido da coleta da coluna de Sepharose CL 6B. Aplicação de 12 mL do extrato obtido a partir de 1g de meio liofilizado da levedura *Pichia pastoris* em BMMY.

Pela figura 9, podemos observar que não há um pico no tubo 71 e 105 como demonstrado na figura 8. Esta diferença de resultado pode ter sido pela queda de energia durante o ensaio, e conseqüentemente houve aumento do volume nos tubos. Os tubos 116 a 122 foram coletados e liofilizados. Após a liofilização, todo conteúdo foi resuspenso em 3 mL de água MiliQ. Foi determinada a quantidade de proteínas e a média foi de 1,32 mg/mL de proteína.

Este pico e o material proveniente da precipitação dupla, que desnaturou, foram aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, como consta na figura 10.

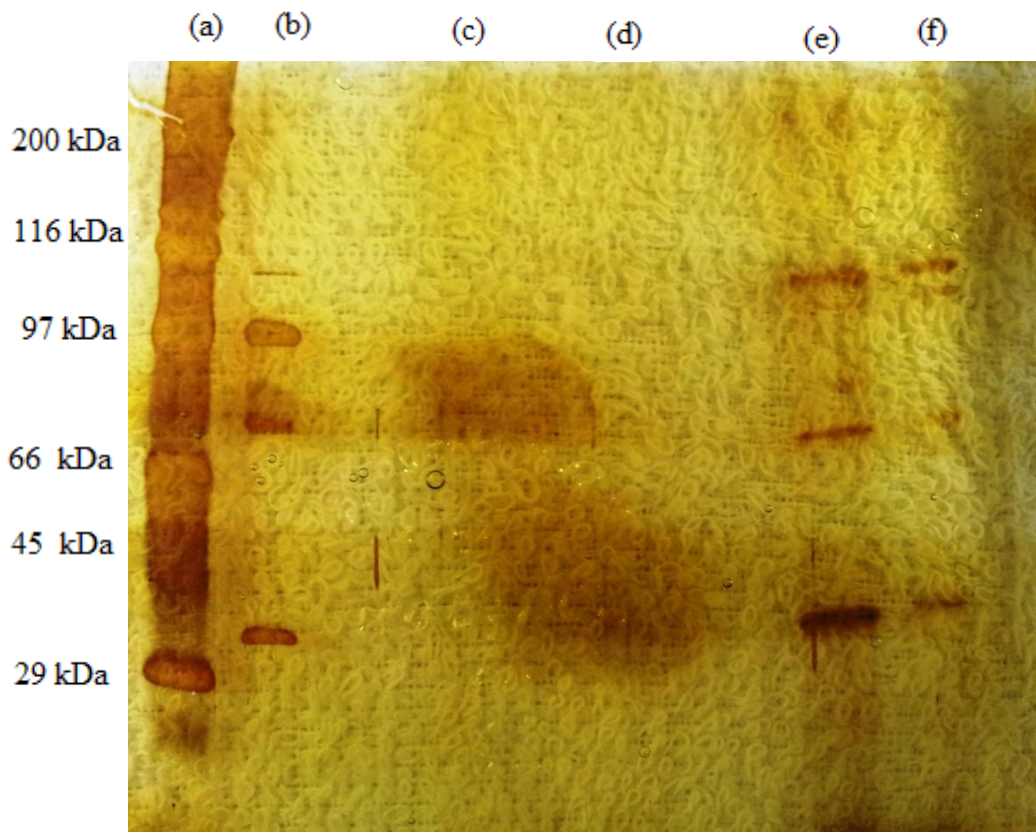


Figura 10. Eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante, 12% (gel de 10 cm) Coloração com Prata II (2.3.3.2.2). a) Padrão de peso molecular (SIGMA 30000-200000 Da), aplicação de 5 μ L; (b) Padrão de glicerol quinase de *E. coli* (SIGMA), aplicação de 20 μ L; (c) Enzima precipitada com sulfato de amônio e liofilizada, aplicação de 15,2 μ L (10 μ g) ; (d) Enzima precipitada com sulfato de amônio e liofilizada, aplicação de 22,7 μ L (15 μ g); (e) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 20 μ L; (f) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 10 μ L.

A figura 10 mostra os resultados da eletroforese utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE para as amostras precipitadas com sulfato de amônio (aplicação de 10 e 15 μ g de proteína) poços c e d, respectivamente (obtidas do pico da figura 9), e amostras obtidas da dupla precipitação com etanol (20 e 10 μ L), corridas nos poços e e f, respectivamente. Pela altura corresponde ao padrão sigma (poço b) pode-se notar a presença da enzima glicerol

quinase nas amostras aplicadas nos poços e e f. A maior subunidade de GK apresentou peso molecular aproximado de 100kDa, conforme figura 10.

A não definição das bandas da GK nos poços c e d podem ser devido a presença de sulfato de amônio nas amostras. Para minimizar os interferentes foi realizado diálise “overnight” contra água.

A tabela 7 mostra os resultados da concentração de proteínas presente na amostra, antes e depois da diálise. Devido a queda acentuada na concentração proteica, não foi possível a aplicação da no gel, e portanto, a purificação da amostra utilizando sulfato de amônio é menos efetiva, necessitando uma quantidade maior de proteínas na purificação.

Tabela 7. Comparação da quantidade de proteínas antes e depois do processo de diálise.

| Antes | | | Depois | | |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Volume da alíquota (µL) | Absorbância | Quantidade de proteína (mg/mL) | Volume da alíquota (µL) | Absorbância | Quantidade de proteína (mg/mL) |
| 25 | 0,097 | 1486,4 | 50 | 0,035 | 247,2 |
| 50 | 0,147 | 1143,2 | 100 | 0,072 | 271,6 |

A diálise diminui a quantidade de proteínas, e não foi possível aplicar no gel de poliacrilamida SDS-PAGE, pois como vimos em outras alíquotas da amostra, a precipitação para após aplicação, poderia não gerar um gel com quantidade de proteínas.

3.2.2.4. – DUPLA PRECIPITAÇÃO POR ETANOL

Na tentativa de melhorar a revelação das bandas e avaliar a proteína sem o interferente do sulfato de amônio, um novo gel foi feito como mostra a figura 11. A coloração do gel foi feita com Comassie blue, em seguida descolorido para o aparecimento das bandas. Após a descoloração, o mesmo gel foi submetido a coloração de prata II, conforme figura 12.

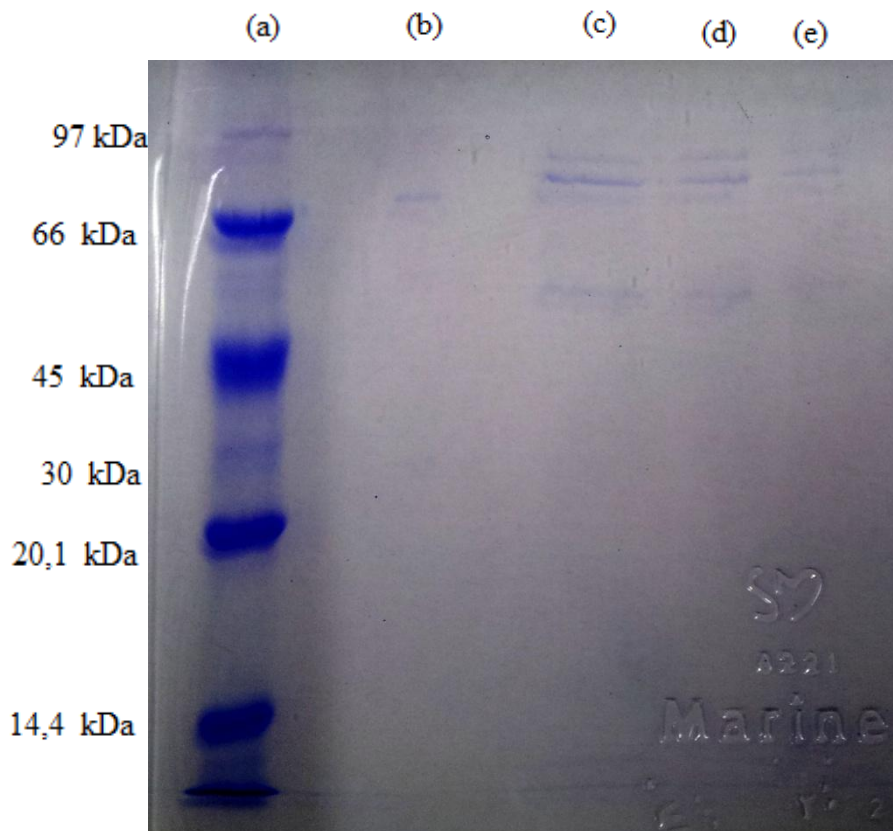


Figura 11. Eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante, 12% (gel 10 cm) coloração de Comassie Blue. (a) Padrão de Peso Molecular (97kDa – 14,4 kDa) 5µL; (b) Padrão da enzima glicérol kinase (SIGMA) 15 µL; (c) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 40 µL; (d) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 20 µL; (e) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 10 µL.

Novamente, a coloração de Comassie Blue mostrou não ser sensível o suficiente para a quantidade de proteína aplicada, mas é possível visualizar a melhora na qualidade das bandas, pelo método de purificação, conforme figura 11.

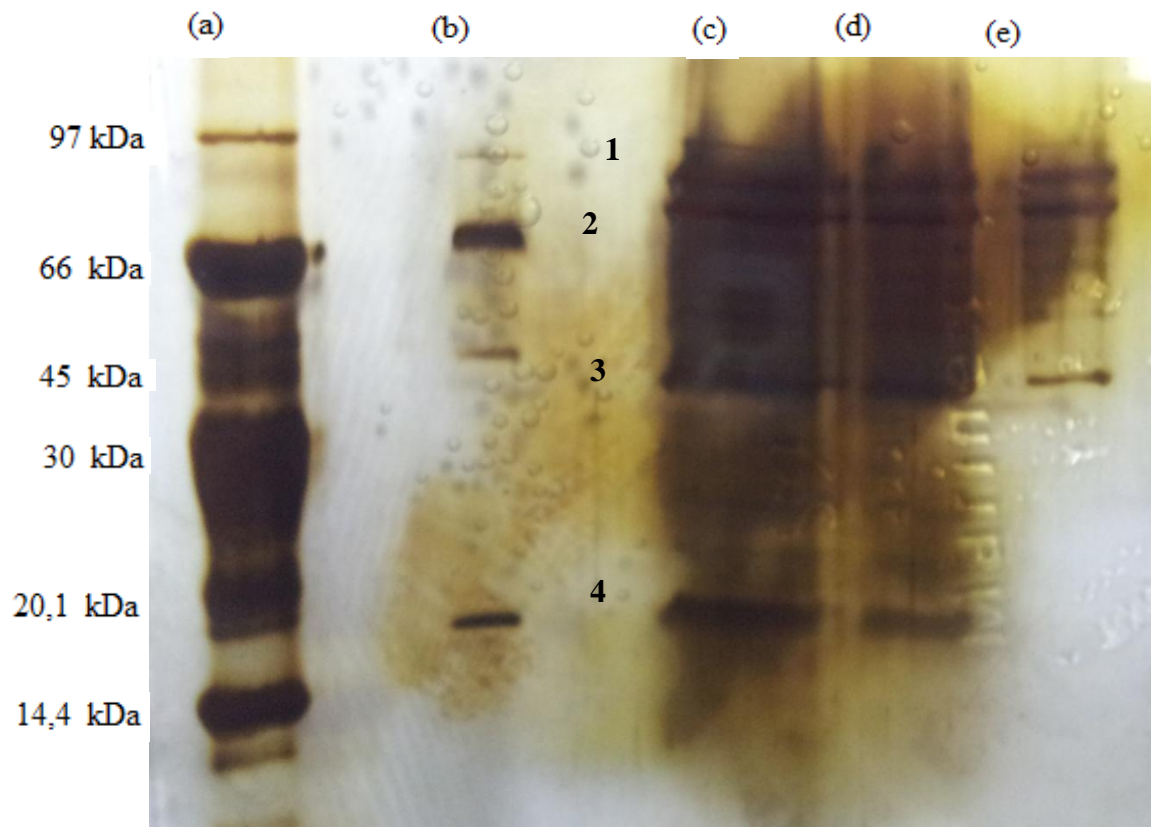


Figura 12. Eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante, 12% (gel 10 cm) coloração de prata II. (a) Padrão de Peso Molecular (97kDa – 14,4 kDa) 5µL; (b) Padrão da enzima glicerol kinase (SIGMA) 15 µL; (c) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 40 µL; (d) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 20 µL; (e) Enzima precipitada duas vezes com etanol, aplicação de 10 µL.

Na figura 12, podemos visualizar as 4 bandas da enzima glicerol quinase padrão (SIGMA) e a proximidade das bandas da amostra com a do padrão. O peso das bandas do padrão e da amostra podem ser visualizadas na tabela 7.

Tabela 8. Comparação dos pesos das bandas do Padrão da glicerol quinase com a amostra fermentada.

| | Banda 1 (kDa) | Banda 2 (kDa) | Banda 3 (kDa) | Banda 4 (kDa) |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Padrão GK | 97-66 | 97-66 | 66-45 | 20,1 |
| Amostra | 97-66 | 97-66 | 45-30 | 20,1 |

As semelhanças observadas nos pesos das bandas da amostra e do padrão mostram a dissociação da enzima nas suas quatro subunidades. O padrão da glicerol quinase utilizado é proveniente de *Escherichia coli* e o nossa amostra foi obtida da clonagem do gene de *Sacharomyces cerevisiae* em *Pichia pastoris*.

4. CONCLUSÃO

As técnicas de purificação aplicadas a amostra para melhorar a visibilidade do gel de eletroforese com SDS foram de ultrafiltração e precipitação. As precipitações foram feitas com Ácido Tricloro Acético, Etanol gelado e Sulfato de Amônio.

A melhor técnica de purificação utilizada foi com dupla precipitação com etanol gelado. A precipitação dupla com etanol gelado interfere na configuração da proteína, levando a desnaturação.

Entretanto, podemos comparar a precipitação dupla com Etanol gelado e sulfato de amônio, partindo da mesma quantidade de amostra, 1g. Cada uma apresentou um problema para a enzima, a primeira, como já citado, precipitou a glicerol quinase em temperatura ambiente pela desnaturação excessiva. Já a precipitação com sulfato de amônio acarretou em uma grande quantidade de sal, que interferiu na eletroforese e formou um arraste na coloração.

A revelação mais eficiente para a proteína foi a Prata, independente da metodologia, e a coloração com Comassie Blue não foi sensível. A revelação do gel mostrou 4 subunidades da enzima glicerol quinase e foi compatível com o padrão Sigma utilizado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEMBERG, R. Produção de Glicerol quinase em *Pichia pastoris*. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia Bioquímica) – Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ANDREWS, A.T. Electrophoresis. **Oxford Science Publications**, 2 Ed. London. 1985.

CEREGHINO, G.P.L.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol 13. P 329–332. 2002

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews** **24**, Vol 12. p 44-46. 2000

CHANG, P.Y.; FONG, M.Y.; NISSAPATORN, V.; LAU, Y.L. Evaluation of *Pichia pastoris* – Expressed Recombinant Rhoptry protein 2 of *Toxoplasma gondii* for Its Application in Diagnosis of Toxoplasmosis. **by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol 85. Ed 3. P 485-489. 2011

CRANS, C.D.; WHITESIDES, G.M. Glycerol Kinase: Substrate Specificity. **Journal of the American Chemical Society**. Vol 107. p 7008-7018. 1985.

DATAMONITOR (2007). The Pharmaceutical Industry: the key trends and strategic issues shaping the industry. Reference Code: **DMHC2272**. Fevereiro de 2007.

GLOBAL BIOECONOMY CONSULTING LLC. **Global Hubs and Global Nodes of Biotechnology: an international scan of biotechnology strategies, initiatives and institutional capacity**. Ed 3, 2007.

HUANG, H.; YOSHIDA, T.; KABASHIMA, T.; ITO, K.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and Characterization of Thermostable Glycerol Kinase from *Thermus flavus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Vol 83, No. 4, p. 328 – 332. 1997

JUDICE, V.M.M. Competências em Internacionalização e inovação em Biotecnologia no Brasil. **Journal of Technology Management & Innovation**. Vol 1, p. 95-106, 2006.

KENWRICK, S. PETERSON, M. SPEER, A. FISCHBECK, K. DAVIES, K. Molecular Analysis of the Duchene Muscular Dystrophy Region Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. **Cell Press**. Vol 48. p 351-357. 1987

KOGA, Y.; MORIKAWA, M.; HARUKI, M.; NAKAMURA, H.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Engineering**, Vol. 11, No. 12, p 1219-1227, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. Vol 22. p 249-270. 2005.

MIZUTANI, K.; HASHIMOTO, K.; TAKAHASHI, N.; HIROSE, M. AIBARA, S.; MIKAMI, B. Structural and Functional Characterization of Recombinant Human Serum Transferrin Secreted from *Pichia pastoris*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Vol 74 (2). p 309-315. 2010.

STEPANIAN, S.V.; HUYN, S.T.; MCCABE, E.R.B.; DIPPLEA, K.M. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4a binding site and evidence for transcriptional activation. **Molecular Genetic and Metabolism**. Vol 80. p 412-418. 2003

THORNER, J.W.; PAULUS, H. Catalytic and Allosteric Properties of Glycerol Kinase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 248, p. 3922-3932, 1973.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in Practice**..4 Ed. Hoboken: Wiley-VCH, 2005. 1v.

WU, D.; CHU, J.; HAO, Y.Y.; WANG, Y.H.; ZHUANG, Y.P., ZHANG, S.L. High efficient production of recombinant human consensus interferon mutant in high cell density culture of *Pichia pastoris* using two phases methanol control. **Process Biochemistry**. Vol 46. p 1663-1669. 2011.

ANEXO TÉCNICO

1. MEIOS DE CULTURA

1.1. YPDA

Para a manutenção e propagação inicial do micro-organismo foi utilizado o meio

YPDA na seguinte constituição:

| | |
|---------------------------|----------|
| Extrato de levedura | 1% (p/v) |
| Peptona..... | 2% (p/v) |
| Glicose..... | 2% (p/v) |
| Agar | 2% (p/v) |

Para o preparo de um litro do meio YPDA, dissolveu-se 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona e 20 g de glicose em 900 mL de água destilada. Adicionou-se 20 g de Agar e completou-se o volume para um litro. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos e distribuiu-se em placas de Petri estéreis. As culturas foram conservadas nesse meio, em geladeira a 4°C, através de transferências, seguidas de crescimento em meio novo (repicagem) a cada experimento.

1.2. BMGY

O meio BMGY foi utilizado para o crescimento no inoculo e é constituído por:

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Extrato de levedura..... | 1% (p/v) |
| Peptona..... | 2% (p/v) |
| Tampão fosfato de potássio | 100 mmol/L com pH 6,0 (v/v) |
| YNB | 1,34% (p/v) |

| | |
|---------------|------------------------------|
| Biotina..... | 4 x 10 ⁻⁵ % (p/v) |
| Glicerol..... | 1% (v/v) |

Preparo das soluções estoques:

Tampão fosfato de potássio 1mol/L, pH 6,0: foi adicionado 13,2 mL de KH₂PO₄ 1 mol/L a 86,8 mL de K₂HPO₄ 1 mol/L, se necessário, ajustou-se o pH com NaOH para pH 6,0. Esterilizou-se em autoclave a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. O tempo de estabilidade é maior que um ano quando conservado a 4°C.

Solução de YNB 13,4%: foi dissolvido 13,4 g de YNB (Yeast Nitrogen Base) em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22 µm). A solução se mantém estável por um ano quando conservado a 4°C.

Solução de biotina 0,02%: dissolveu-se 20 mg de biotina em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22µm). A solução se mantém estável aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Glicerol concentrado: autoclavou-se uma quantidade suficiente de glicerol, a 121°C, 1 atm de pressão durante 15 minutos.

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMGY dissolveu-se 10 g de extrato de levedo e 20 g de peptona em 790 mL de água destilada. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 m mol/litro pH 6,0, 100 mL de YNB (10X), 2 mL de biotina 0,02% e 10 mL de glicerol concentrado.

1.3. BMMY

O meio BMMY foi utilizado para a expressão da atividade da enzima, e é constituído por:

| | |
|----------------------------------|------------------------------|
| Extrato de levedura..... | 1% (p/v) |
| Peptona..... | 2% (p/v) |
| Tampão fosfato de potássio | 100 mmol/L com pH 6,0 (v/v) |
| YNB | 1,34% (p/v) |
| Biotina..... | 4 x 10 ⁻⁵ % (p/v) |
| Metanol | 0,5 ou 1% (v/v) |

Preparo das soluções estoques:

As soluções de tampão fosfato de potássio 1 mol/L, pH 6,0, YNB e biotina foram preparadas como descrito anteriormente.

Solução de metanol 5%: adicionou-se 5 mL de metanol em 95 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22µm). A solução se mantém estável a aproximadamente dois meses quando conservado a 4°C.

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMMY dissolveu-se 10 g de extrato de levedo e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada. Autoclavou-se a 121°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 6,0, 100 mL de YNB (10X), 2 mL de biotina 0,02% e 100 mL de metanol 5%.

3. SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado pelo método LOWRY et. al, (1951), tendo soroalbumina bovina como padrão e utilizando as seguintes soluções:

- Reagente A: solução de Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1N
- Reagente B: solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% e citrato de sódio 1%
- Reagente C: no momento de usar, misturar 50 mL do reagente A + 1 mL do reagente B
- Reagente D: reagente de Folin Ciocalteau (Imbralab), diluído com água destilada a 1:1
- Solução padrão de albumina de soro bovino (BSA)

5 mg de albumina em 50 mL de NaOH 0,1N

4. SOLUÇÕES PARA SDS-PAGE

Solução estoque de acrilamida para gel de corrida: pesou-se 29,2g de acrilamida (p/v) e 0,8 de bis-acrilamida, para um concentração final de 30%. Completou-se com água até 100 mL, agitou por 10 minutos. Armazenar resfriado em frasco escuro.

Solução tampão de corrida 10 X: pesou-se 63,2g de Tris e 39,9g de glicina. A solução foi adicionada de água e em agitação o pH foi ajustado com HCl até o pH de 8,9. Completar o volume para 1L, filtrar e armazenar em geladeira. No momento do uso diluir a solução 1:10.

Solução tampão para o gel concentrador Tris-HCl pH 6,8: pesou-se 7,457g de Tris e adicionou-se água. Sob agitação o pH foi medido e ajustado com HCl até o pH 6,8. A solução foi completada a 100 mL e armazenada em temperatura ambiente.

Solução tampão para gel separador Tris HCl pH 8,9: pesou-se 45,75g de Tris, que foi diluído em 70 mL de água aquecida, resfriada e titulada com HCl até pH 8,9. Completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar em temperatura ambiente.

Tampão de Amostra não desnaturante :

| | |
|---|--------|
| Glicerol..... | 1,0 mL |
| Solução tampão do gel concentrador..... | 0,5 mL |
| Azul de Bromofenol..... | 0,5 mg |
| Água q.s.p. | 5,0 mL |

Armazenar a solução a – 20°C.

Solução estoque de SDS 10%: pesou-se 10g de SDS e solubilizou em q.s.p. para 100 mL de água.

Solução de persulfato de amônia 10%: pesou-se 0,05g de persulfato de amônia e solubilizou em 0,50 mL de água. Preparada no momento do uso.

Solução tampão para amostra desnaturante:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Solução tampão de amostra | 1,00 mL |
| 2- mercaptoetanol..... | 0,02mL |
| SDS 10% | 0,20 mL |

5. SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE COMASSIE BLUE

Solução Colorante:

| | |
|--------------------------|------|
| Comassie Blue R-250..... | 0,3% |
| Metanol | 50% |
| Ácido Acético | 10% |
| Água q.s.p. | 1L |

Solução descolorante:

| | |
|---------------------|-----|
| Metanol | 30% |
| Ácido Acético | 7% |
| Água q.s.p. | 1L |

6. SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO POR PRATA I

Solução de Armazenamento 1%: 1mL de ácido acético glacial em 100 mL de água deionizada.

Solução de desenvolvimento: 2g de carbonato de sódio m/v com 40 μ L de formaldeído e completar a 100 mL com água deionizada.

Solução fixadora: 40 mL de etanol com 10 mL de ácido acético glacial, completado a 100 mL com água deionizada.

Metanol 50%: 50 mL de metanol completado a 100 mL com água deionizada

Nitrato de prata 0,1%: 100 mg de nitrato de prata completado a 100 mL com água deionizada gelada.

Tiosulfato de sódio 0,02%: 20 mg de tiosulfato completado a 100 mL com água deionizada.

Solução de parada: 5 mL de ácido acético glacial completado a 100 mL com água deionizada.

7. SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO POR PRATA II

Solução Etanol 50% e Ácido Acético (10%): 35 mL de Etanol adicionados de 7 mL de ácido acético e completado até 70 mL com água deionizada.

Solução de Lavagem: 7 mL da solução de Etanol 50% e Ácido Acético (10%) e 53 mL de água deionizada.

Solução de tiosulfato de sódio 0,02%: pesou-se 12 mg de tiosulfato de sódio e completar para 60 mL de água deionizada.

Solução de nitrato de prata 0,2%: pesou-se 0,12 mg de nitrato de prata, completar para 60 mL com água deionizada e 45 µL de formaldeído. Conservar em geladeira e preparar no momento do uso.

Solução de desenvolvimento: pesou-se 3,6 mg de carbonato de sódio em 48 mL de água deionizada, e então adicionar 30 µL de formaldeído e 1,2 mL da solução de tiosulfato de sódio. Completar o volume para 60 mL. Conservar em geladeira e preparar no momento do uso.

Solução Ácido Acético 5% - solução de parada: 3 mL de ácido acético em 53mL de água deionizada.

Solução de armazenamento – glicerina: 7 mL de glicerina completada para 60 mL com água deionizada.