

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias
Campus De Jaboticabal

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA GFP DE *Aequoria victoria* EM
Escherichia coli E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE**

JEOVANNA APARECIDA MARUCIO DE OLIVEIRA

JABOTICABAL - SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GFP DE *Aequoria victoria* EM *Escherichia coli* E
PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE**

JEOVANNA APARECIDA MARUCIO DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Dr^a Agda Paula Facincani

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

JABOTICABAL

1º Semestre/2026

O48e

Oliveira, Jeovanna Aparecida Marucio de

Expressão da proteína GFP de Aequoria victoria em Escherichia coli e purificação por cromatografia de afinidade / Jeovanna Aparecida Marucio de Oliveira. -- Jaboticabal, 2026

56 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Agda de Paula Facincani

1. Biotecnologia. 2. Proteínas recombinantes. 3. Purificação. 4. DNA Recombinante.

I. Título.

JEOVANNA APARECIDA MARUCIO DEOLIVEIRA

TÍTULO DO TRABALHO: Expressão heteróloga da proteína GFP de *Aequoria victoria* em *Escherichia coli* e purificação por cromatografia de afinidade

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador (se houver): Dr^a. Agda Paula Facincani

Data de defesa: 12 / 03 / 2026

(X)Aprovado

()Reprovado

Banca Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
JESUS APARECIDO FERRO
Data: 12/03/2026 17:19:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

 Documento assinado digitalmente
MARIANA CASTELETTI BERALDO MASSOLI
Data: 12/03/2026 20:40:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr^a. Mariana Casteleti Beraldo Massoli

ETEC Bento Carlos Botelho do Amaral – Guariba

 Documento assinado digitalmente
MURILO FERREIRA OTHONICAR
Data: 13/03/2026 16:27:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Me. Murilo Ferreira Othonicar

Universidade de São Paulo USP- Campus de Ribeirão Preto

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 16 / 03 / 2026

 Documento assinado digitalmente
HIRASILVA BORBA
Data: 16/03/2026 15:42:22-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dra. Hirasilva Borba
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio e incentivo à pesquisa científica no Brasil, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), seus docentes, pesquisadores, técnicos e demais funcionários por manterem a excelência do ensino e manutenção da universidade.

À minha família, por todo o suporte incondicional e por terem me proporcionado os meios emocionais, materiais e psicológicos necessários para percorrer esta trajetória. À minha mãe, Eliane Marucio, minha base inabalável, a quem devo grande parte de minhas conquistas. Ao meu irmão, Pedro Marucio, meu braço direito e cúmplice nas batalhas diárias e ao meu pai, Santino Rodrigues, por me tornar capaz.

Aos meus amigos próximos, que acompanharam cada etapa da minha jornada, oferecendo apoio, conselhos sinceros e motivação para que eu continuasse, mesmo diante das dificuldades e imprevistos deste ciclo acadêmico.

Aos meus colegas de turma, que se tornaram grandes amigos e fazem parte das melhores lembranças que levarei da graduação. Sou grato pelos momentos compartilhados, pelas risadas, pelo apoio mútuo e pelos aprendizados que contribuíram para minha evolução acadêmica e pessoal.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e CREBIO: Tamires, Luana, Mariana, Laura, Loren, Guilherme e Marilza pela parceria, bom humor, disposição em ajudar e a troca de conhecimentos que agregou à minha formação prática no laboratório.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela honra de poder integrar seu grupo, pela confiança depositada em meu trabalho, pela generosidade em compartilhar conhecimento e pela compreensão ao longo de todo o processo. Sua dedicação foi fundamental para minha formação científica.

À Dr^a Agda de Paula Facincani, por sua presença constante e atenciosa ao meu lado durante toda a trajetória. Agradeço profundamente pela orientação cuidadosa, pela ajuda nos experimentos e análises, pela paciência e gentileza que foram essenciais em cada etapa deste projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Proteínas recombinantes	14
3.2 Proteína GFP	16
3.3 Vantagens e desvantagens do uso de sistemas microbianos na produção de proteínas recombinantes.	19
3.3.1 Sistema de expressão gênica em <i>E. coli</i> .	20
3.4 Vetor pET-SUMO	22
3.5 Cromatografia de Afinidade	23
4. METODOLOGIA	24
4.1 Amplificação do gene <i>gfp</i> por PCR	24
4.1.1 Purificação dos fragmentos amplificados a partir da PCR	26
4.2 Construção do plasmídeo de expressão pET-SUMO contendo o gene <i>gfp</i>	27
4.2.1 Ligação do gene <i>gfp</i> ao vetor pET-SUMO	27
4.3 Obtenção de células de <i>E. coli</i> de linhagens DH10B e BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET-SUMO-GFP	27
4.3.1 Preparo de células de <i>E. coli</i> DH10B e <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS eletrocompetentes	27
4.3.2 Transformação do vetor plasmidial pET SUMO-GFP em células de <i>E. coli</i> DH10B por eletroporação	28
4.3.3 Extração do DNA plasmidial dos clones transformantes e confirmação por PCR e sequenciamento	28
4.3.4 Transformação bacteriana em células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	29
4.4 Expressão heteróloga de GFP em células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	29
4.4.1 Expressão em pequena escala	29
4.4.1.1 Análise por SDS-PAGE	30
4.4.2 Expressão em larga escala	31
4.5 Purificação da GFP por Cromatografia de afinidade (IMAC)	32
4.5.1 Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	32
4.5.2 Quantificação de proteína e digestão das proteínas de fusão His-SUMO-GFP	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Construção do plasmídeo de expressão pET-SUMO-GFP	34

5.1.1 Amplificação do gene <i>gfp</i>	34
5.2 Clonagem em células de <i>E. coli</i> contendo os plasmídeos recombinantes	35
5.2.1 Obtenção de <i>E. coli</i> DH10B e BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET-SUMO-GFP e confirmação das clonagens.....	35
5.3 Expressão heteróloga de GFP em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	39
5.3.1 Análise dos testes de mini indução e seleção das condições ideais de expressão	39
5.3.2 Expressão de His-SUMO-GFP em larga escala.....	41
5.4 Obtenção da proteína GFP purificada.....	44
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

APS – *Ammonius persulfate* (Persulfato de Amônio)

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CI – Corpos de Inclusão

CREBIO – Centro de Estudos em Reprodução e Biotecnologia

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DTT – *Dithiothreitol* (Ditiotreitol)

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

FRET – *Förster Resonance Energy Transfer* (Transferência de Energia por Ressonância Förster)

GFP – *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)

IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado)

IPTG – *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo)

LB – *Lysogeny Broth* (Meio LB)

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PIP-box – *Plant-Inducible Promoter box*

PR – Proteína Recombinante

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SOC – *Super Optimal broth with Catabolite repression* (Meio SOC)

TBE – Tampão Tris–Borato–EDTA

TEMED – *Tetramethylethylenediamine* (Tetrametiletilenodiamina)

RESUMO

As proteínas são amplamente utilizadas na ciência, se estendendo não somente a área da pesquisa, mas diversas outras, como saúde, produção de medicamentos ou mesmo na produção alimentícia. A expressão heteróloga de proteínas representa uma estratégia muito utilizada na biotecnologia para a produção de proteínas recombinantes, permitindo a síntese destas em organismos que não as expressam originalmente, incluindo bactérias, leveduras, microalgas, plantas e outros. Este trabalho teve como objetivo a clonagem, expressão e purificação da Proteína Fluorescente Verde (*Green fluorescent protein* - GFP), utilizando a bactéria *Escherichia coli* como hospedeiro. A sequência de nucleotídeos codificadora da proteína GFP foi clonada no vetor de expressão pET-SUMO e este vetor recombinante foi inserido em *E. coli* BL21(DE3) pLysS para indução da expressão. A proteína GFP, contendo uma cauda de histidina no seu N-terminal e a proteína SUMO (His-SUMO-GFP), foi purificada por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando coluna contendo níquel (Ni^{2+}) imobilizado e acoplada a um cromatógrafo líquido de baixa pressão. A absorbância a 280 nm das frações eluídas da coluna foi registrada e o perfil proteico foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). A presença da proteína GFP nas frações também foi visualizada pela fluorescência emitida sob excitação de luz ultravioleta. A cauda de histidina com a proteína SUMO foi removida por digestão com a SUMO protease e a proteína GFP pura foi obtida por nova cromatografia de afinidade IMAC. O sistema de expressão pET-SUMO e *E. coli* BL21(DE3) pLysS e a purificação por IMAC demonstraram serem eficientes para a expressão e purificação da proteína GFP, resultando em uma proteína solúvel, estável e em quantidade suficiente para aplicações em estudos futuros.

Palavras-chave: biotecnologia; proteína recombinante; expressão de proteína; purificação de proteínas.

ABSTRACT

Proteins play a central role in science and technology, extending beyond basic research to applications in health, pharmaceutical production, and the food industry. Heterologous

expression has become a key biotechnological strategy for producing recombinant proteins, enabling their synthesis in organisms that do not naturally express them, such as bacteria, yeasts, microalgae, and plants. This work aimed to clone, express, and purify the Green Fluorescent Protein (GFP) using *Escherichia coli* as a host system. The GFP coding sequence was cloned into the pET-SUMO expression vector, and the recombinant construct was transformed into *E. coli* BL21(DE3) pLysS for induced expression. The His-SUMO-GFP fusion protein, containing an N-terminal His-SUMO tag, was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a nickel (Ni^{2+}) column connected to a low-pressure liquid chromatography system. Protein elution was monitored by absorbance at 280 nm, and the purity was assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). GFP fluorescence was confirmed under ultraviolet excitation. The His-SUMO tag was removed by digestion with SUMO protease, and pure GFP was obtained through a second IMAC step. The pET-SUMO/*E. coli* BL21(DE3) pLysS system and IMAC purification proved highly efficient, yielding a soluble and stable GFP preparation suitable for future biochemical and biotechnological applications.

Keywords: biotechnology; recombinant protein; protein expression; protein purification

1. INTRODUÇÃO

A proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) é naturalmente produzida pela água-viva da espécie *Aequoria victoria* (ANTER; HUSSEINY; MOHAMMED, 2023). Esta proteína, assim como variantes, possui importantes aplicações em áreas como pesquisa, biologia celular e medicina. Quando excitada por luz UV, é capaz de emitir luz verde sem que haja a necessidade de reações enzimáticas, substratos específicos ou cofatores. Tem papel importante no monitoramento da eficácia da transferência gênica em embriões, plantas e animais transgênicos (CHEN *et al.*, 2023; PRASAD; MANJUNATH, 2016). Em peixes-zebra (*Danio rerio*), a GFP já demonstrou ser eficaz como repórter de expressão gênica por meio de um experimento no qual plasmídeos contendo GFP injetados em embriões de uma célula apresentaram fluorescência detectável por volta de 4 horas após a injeção e organismos transgênicos gerados com promotores específicos expressaram GFP

em tecidos como pele, músculo e diversos órgãos, conforme o promotor utilizado (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1995).

Por sua praticidade e versatilidade, o uso de GFP é bastante vantajoso como gene repórter em estudos para monitorar a expressão gênica em diversos tipos celulares, pois permite realizar o monitoramento em tempo real tanto *in vivo* quanto *in situ* (WEST *et al.*, 1999). Também pode ser combinada com outras proteínas fluorescentes, como a mCherry (proteína fluorescente vermelha), em experimentos de marcação dupla, nos quais fluoróforos distintos são usados como marcadores de diferentes genes, proteínas ou outras estruturas celulares, permitindo rastrear sua localização, dinâmica ou possíveis interações (DOHERTY; BAILEY; LEWIS, 2010). Em pesquisas envolvendo o estudo da interação hospedeiro-patógeno, a GFP é uma excelente ferramenta de marcação e rastreamento, por apresentar características que permitem o rastreo da dinâmica da infecção de forma não-invasiva em tempo real, como a baixa toxicidade da proteína, fácil quantificação e a síntese contínua na célula, mantendo o sinal de fluorescência mesmo após replicações celulares (CHALFIE *et al.*, 1996; HIRANO *et al.*, 2022).

Por meio da tecnologia do DNA (ácido desoxirribonucleico) recombinante, proteínas como a GFP podem ter a sequência codificadora inserida em vetores específicos, que otimizem sua expressão, para serem produzidas em uma quantidade significativa por meio de expressão heteróloga. Essa técnica consiste na inserção de sequências genéticas de um organismo em outro organismo hospedeiro que não a expressa naturalmente. Sua aplicação envolve o isolamento de um fragmento de interesse a partir do gene de um organismo que o apresente. O fragmento é ligado a um vetor otimizado para replicação e inserido em um outro organismo capaz de replicá-lo (FAKRUDDIN *et al.*, 2013; WALSH, 2007). Esta tecnologia está presente nas áreas da agricultura, saúde e pesquisa, incluindo a produção de medicamentos, vacinas, enzimas e proteínas específicas como hormônios e anticorpos (ORLANDELLI *et al.*, 2012; BRITTO; PANETO, 2021).

A escolha adequada do vetor de expressão, do organismo hospedeiro, de estratégias para redução da formação de corpos de inclusão e de parâmetros experimentais, como a temperatura, densidade celular, tempo e concentração de indutor, interferem diretamente na qualidade e quantidade de GFP obtida por meio de expressão heteróloga, podendo inclusive resultar em ausência de expressão significativa. Dessa forma, é de grande relevância o

desenvolvimento de um protocolo otimizado capaz de ser reproduzido (TEROL *et al.*, 2021) como precursor para a possível produção em larga-escala da proteína GFP purificada.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Obter a proteína GFP, pura e solúvel, utilizando o vetor de expressão pET-SUMO (Thermo Fisher Scientific) e, células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS como hospedeiras.

2.2 Específicos

2.2.1 Obter um bom treinamento em clonagem, expressão e purificação de proteínas heterólogas expressas em *E. coli*;

2.2.2 Amplificar por PCR a sequência nucleotídica do gene *gfp* e construir o plasmídeo de expressão pET-SUMO-GFP.

2.2.3 Obter células transformantes de *E. coli* das linhagens DH10B e BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET-SUMO-GFP.

2.2.4 Induzir a expressão heteróloga da proteína de fusão His-SUMO-GFP, utilizando as células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, em larga-escala.

2.2.5 Realizar a purificação da proteína de fusão His-SUMO-GFP por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC);

2.2.6 Remover a cauda His-SUMO por digestão com SUMO protease e obter a proteína GFP pura em quantidades suficientes para possíveis procedimentos laboratoriais futuros.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteínas recombinantes

Nas últimas décadas, a produção de proteínas recombinantes tornou-se uma ferramenta essencial na biotecnologia moderna, com amplas aplicações nas áreas da saúde, indústria e pesquisa científica. Proteínas recombinantes são moléculas produzidas por meio de expressão heteróloga (expressão de um gene de uma espécie em outra, que não o produz originalmente), utilizando engenharia genética. A técnica aplicada na produção de proteínas

recombinantes se trata da tecnologia do DNA recombinante. Nesta técnica, um gene responsável pela codificação de uma proteína de interesse pertencente a um organismo é clonado em um vetor de expressão e inserido em outro organismo hospedeiro, como células bacterianas ou leveduras, onde o gene será replicado e expresso (GARCIA, 2021), com o intento de produzir a molécula desejada em maior escala e de forma mais acessível. É possível modificar proteínas recombinantes para melhorar propriedades, como solubilidade, estabilidade ou a capacidade de interação com outros componentes biológicos (POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLOU, 2023).

Atualmente, importantes aplicações das proteínas recombinantes estão presentes de forma ampla em diferentes áreas, como na área da ciência, em estudos de função de proteínas e mutagênese, como na saúde com a produção de medicamentos, citocinas, vacinas, hormônios e moduladores de enzimas, reduzindo o tempo e custo da produção. Além disso, o uso destes biofármacos tende a diminuir significativamente as possíveis reações imunológicas e infecções em um organismo, devido à similaridade apresentada com as proteínas presentes no organismo, enquanto medicamentos produzidos de forma sintética possuem menor especificidade, afetando o desempenho ao realizar o papel das proteínas de origem (ALMEIDA et al., 2018). Um exemplo de biofármaco de grande importância, obtido por meio da tecnologia do DNA recombinante é o hormônio insulina, produzido de forma heteróloga em *E. coli* pela primeira vez em 1982, pela empresa Genentech, em parceria com a Eli Lilly para a produção em larga escala (GURUNG et al., 2021).

Outras aplicações relevantes das proteínas recombinantes estão no meio ambiental, com a detecção de contaminantes por meio do uso de anticorpos monoclonais; na indústria alimentícia, com a otimização nos processos de produção de alimentos e na produção de conservantes, melhorando também a qualidade dos produtos; na produção de combustíveis, aplicando enzimas para a produção de biocombustíveis mais limpos originados de resíduos industriais ou agrícolas (SÁNCHEZ et al., 2021); e como aditivo na produção animal com a utilização de hormônios recombinantes para melhora da reprodução, enzimas na melhoria da eficiência alimentar e digestiva dos animais, assim como na manutenção da saúde animal, por meio da prevenção e combate de doenças infecciosas, contribuindo para a redução do uso de antibióticos (SCHIPPER, 2023; WALDO, 2017).

3.2 Proteína GFP

Nas últimas décadas, a proteína GFP, proveniente do cnidário da espécie *Aequoria victoria*, se tornou uma das proteínas de grande enfoque nos estudos da biologia molecular e biotecnologia. Ela e suas variantes têm sido amplamente utilizadas como uma ferramenta molecular essencial em várias áreas da pesquisa, incluindo biologia celular e medicina. A proteína GFP tem sido utilizada como gene repórter em experimentos para detecção de expressão gênica em diversos tipos celulares devido a sua capacidade de emitir fluorescência dentro do espectro da luz visível sem a necessidade de substratos específicos, reações enzimáticas ou cofatores adicionais. Isto a torna uma potente ferramenta no monitoramento da eficácia da transferência gênica em embriões, plantas e animais transgênicos (CHEN et al., 2023; PRASAD; MANJUNATH, 2016).

O estudo de interações hospedeiro-patógeno foi revolucionado pelo uso da GFP, devido à sua baixa toxicidade, síntese contínua na célula, reduzindo o risco de diluição do sinal de fluorescência com as replicações celulares, e a fácil quantificação. Essas características conferem a esta proteína a capacidade de permitir o rastreo da dinâmica da infecção em tempo real de forma não-invasiva em células vivas, por meio de procedimentos como a microscopia de fluorescência, microscopia confocal de varredura a laser, citometria de fluxo e outros (CHALFIE *et al.*, 1996; HIRANO *et al.*, 2022).

O monitoramento em tempo real da dinâmica de infecções bacterianas, por exemplo, pode ser realizado por meio da clonagem de regiões do DNA genômico do patógeno em vetores que direcionem a expressão de genes fusionados à GFP, permitindo a identificação de genes diferencialmente expressos durante a infecção intracelular, como demonstrado por Valdivia e Falkow (1997). Também se destaca o sucesso de *gfp* como gene-repórter, demonstrado por Amistá (2024), por meio da análise da força de expressão de promotores PIP-box (Plant-Inducible Promoter box) presentes no genoma de *Xanthomonas citri subsp. citri*, utilizando a proteína como marcador. Além das aplicações já mencionadas, a GFP pode ser utilizada em experimentos de localização e monitoramento de proteínas atuando como proteína de fusão, ou por meio de Transferência de Energia por Ressonância Förster (FRET), sendo também utilizada na localização e monitoramento da ligação iônica e no estudo da interação entre proteínas no interior de células vivas (SANCHEZ; RAMIREZ; HODGSON, 2025).

Além das aplicações como marcador genético, a GFP como proteína purificada possui importantes papéis em diversas áreas. Esta é amplamente utilizada em bioquímica e

biotecnologia como padrão fluorescente em ensaios de calibração, quantificação de proteínas fluorescentes e validação de sistemas ópticos, devido à sua fotofísica bem caracterizada (Patterson *et al.*, 1997). Em estudos de dinâmica molecular, a GFP purificada é aplicada como sonda para analisar processos de dobramento, estabilidade proteica e interações intermoleculares, uma vez que modificações estruturais podem gerar alterações na emissão da fluorescência desta proteína (Brejc *et al.*, 1997).

Por ser altamente estável e de baixa toxicidade, a GFP purificada também é explorada no desenvolvimento de biossensores fluorescentes, em que a emissão pode ser modulada por mudanças ambientais, como a presença de íons metálicos, alteração do pH ou interação com moléculas específicas (Heim & Tsien, 1996). Desse modo, a proteína GFP em sua forma purificada se apresenta também como uma ferramenta versátil para estudos biofísicos, calibradores ópticos e desenvolvimento de nanodispositivos, sendo amplamente empregada em diferentes áreas da ciência biomolecular.

A estrutura cristalina da GFP, essencial na capacidade de emissão de sua fluorescência, foi descrita em 1996 como portadora de formato cilíndrico, composta por 11 folhas β (beta) plissadas, formando a estrutura terciária com aspecto de barril (barril- β), a qual protege um cromóforo central, envolto por estruturas α -hélice também localizadas na parte central do barril (SCHEICH *et al.*, 2002; SMITH, 2009). A estrutura da proteína pode ser visualizada na Figura 1. O cromóforo é o responsável por conferir a fluorescência verde a esta proteína, sem a necessidade de cofatores ou enzimas externas e apresenta máxima emissão de fluorescência em um pico de absorbância de aproximadamente 509 nm. Este grupo funcional é formado espontaneamente por uma tríade de aminoácidos (serina-65, tirosina-66 e glicina-67) por meio de etapas pós-traducionais de ciclização, desidratação e oxidação (SMITH, 2009). Devido à presença de extremidades N-terminal e C-terminal localizadas na parte externas da estrutura, a proteína é capaz de ser fusionada a outras sem que haja comprometimento da emissão de fluorescência desta (SMITH, 2009).

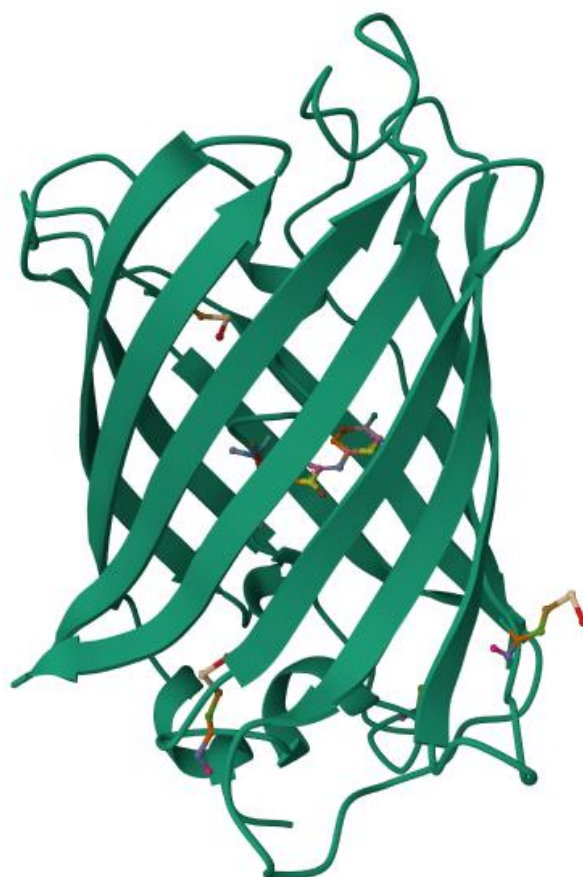


Figura 1. Estrutura barril-beta (β -barrel) da *Green Fluorescent Protein* (GFP). As 11 folhas β se entrelaçam ao redor do cromóforo, formando um arranjo cilíndrico. PDB (*Protein Data Bank*) ID: 1EMA. **Fonte:** RCSB PDB (rcsb.org).

Apesar dos avanços e facilitações provenientes da utilização de GFP em uma diversidade de procedimentos experimentais, ainda existem algumas limitações referentes à aplicação desta proteína. Entre elas estão a possibilidade de fototoxicidade, capaz de danificar células vivas, ou fotobranqueamento, causado pela destruição do fluoróforo (perda de fluorescência), após incidência prolongada de iluminação intensa. Outro fator limitante se trata da toxicidade celular que a proteína apresenta que, apesar de ser considerada baixa, a sua superexpressão pode causar um acúmulo capaz de levar ao estresse celular, além da possibilidade do aumento da formação de agregados (KASPRZYCKA *et al.*, 2024; SANTOS; LUDVIKOVA *et al.*, 2024). Em alguns casos, é possível que a fusão com GFP cause interferência na função da proteína-alvo (LIPPINCOTT-SCHWARTZ; PATTERSON, 2003).

3.3 Vantagens e desvantagens do uso de sistemas microbianos na produção de proteínas recombinantes.

Por meio da tecnologia do DNA recombinante é possível a utilização de diferentes tipos de células hospedeiras na produção de proteínas. A escolha do tipo de célula mais adequada para as necessidades e objetivos do experimento a ser realizado deve levar em consideração diversos fatores, como a complexidade da proteína, custo da produção, escala e necessidade de modificações pós-traducionais. Estas proteínas podem ser produzidas em organismos desde células procarióticas, como bactérias; em organismos eucarióticos unicelulares, como leveduras e fungos filamentosos, ou em células eucarióticas de insetos e mamíferos, podendo até mesmo serem produzidas em um organismo multicelular, como plantas e animais transgênicos (JONASSON et al., 2002).

Apesar da ampla disponibilidade de sistemas, cada um exibe peculiaridades, com vantagens e desvantagens. O uso de sistemas eucarióticos, como células de mamíferos, costuma apresentar maior vantagem em se tratando da realização de mais modificações pós-traducionais, melhor dobramento da proteína e produção de proteínas de maior complexidade em comparação a sistemas procarióticos. Dessa forma apresentam características mais adequadas para a obtenção de proteínas que dependam de processos pós-traducionais, como a glicosilação, para seu funcionamento adequado (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; GARCIA, 2021).

No entanto, o processo de produção neste tipo de sistema pode apresentar um custo elevado, baixo rendimento, pouca flexibilidade e maior lentidão em comparação com sistemas procariontes. Algumas vantagens do uso de sistemas procarióticos para a produção de proteínas recombinantes são o baixo custo de produção (meio de cultura e outros materiais), rápido desenvolvimento das colônias, rendimento elevado, e facilidade em executar manipulações genéticas (FURLAN; PADILLA, 2022). Estas células, em contrapartida, oferecem menor capacidade de realizar modificações pós-traducionais, maior risco de produção de proteínas com endotoxinas e de formação de corpos de inclusão (CI) (LIMA, 2013; INCIR; KAPLAN, 2024). Apesar de haver desvantagens significativas, organismos como a bactéria *E. coli* e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* são muito utilizados na produção de proteínas recombinantes de menor complexidade (INCIR; KAPLAN, 2024).

3.3.1 Sistema de expressão gênica em *E. coli*

Uma das plataformas mais utilizadas para expressão gênica em biotecnologia e biologia molecular, especialmente na produção de proteínas recombinantes, é o sistema baseado em *Escherichia coli* (ROSANO; CECCARELLI, 2014). As vantagens, já amplamente exploradas, de utilizar o sistema bacteriano de *E. coli* para a produção de proteínas recombinantes incluem a capacidade de produção em larga escala, baixo custo de cultivo, rápido crescimento, alta eficiência na transformação com DNA exógeno, facilidade de manipulação genética (ROSANO; CECCARELLI, 2014), além do amplo conhecimento do seu genoma e fisiologia (ZHANG *et al.*, 2022). O uso de sistemas de expressão como o de *E. coli* permite customizar o processo de expressão da proteína desejada conforme a necessidade, por meio da escolha criteriosa dos componentes do sistema. A escolha do vetor de expressão ideal depende de diversos fatores, como o nível de expressão desejado, número de cópias, tamanho e as características da proteína-alvo, além da presença ou ausência de modificações pós-traducionais, as quais *E. coli* não realiza adequadamente (ROSANO; CECCARELLI, 2014; ZHANG *et al.*, 2022).

Em alguns casos específicos, pode ser necessário utilizar vetores maiores, como cosmídeos ou bacteriófagos, embora na maioria das aplicações em *E. coli* sejam utilizados plasmídeos convencionais (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Vetores de expressão em *E. coli* são geralmente plasmídeos, como pET, pBAD, pGEX, entre outros. A seleção do plasmídeo mais adequado envolve a escolha da origem de replicação apropriada, do marcador de seleção (por exemplo, resistência ao antibiótico ampicilina ou canamicina), de um promotor forte e regulável (por exemplo, promotores *T7*, *trc* ou *lac*), bem como a presença de tags de afinidade (*affinity tags*) e tags de fusão (*fusion tags*) para facilitar a purificação e a detecção da proteína recombinante, conforme as características do gene a ser clonado e da proteína que se busca expressar (TEROL, *et al.*, 2021; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A seleção do indutor de expressão e da linhagem hospedeira mais adequadas aos objetivos e necessidades do produto de interesse é crucial na produção de proteínas recombinantes (PRs). A escolha do indutor ideal está intrinsecamente relacionada à seleção do promotor e ao mecanismo regulatório associado. O sistema de expressão T7 é um dos mais utilizados na expressão de proteínas recombinantes, especialmente em *E. coli*. Neste sistema, utiliza-se comumente o indutor IPTG (*isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo*) um indutor artificial que atua sobre o promotor *lac*, componente regulatório fundamental do

sistema T7. O IPTG funciona como um análogo da alolactose, ligando-se ao repressor LacI, que normalmente se encontra associado ao operador lac, impedindo a transcrição do gene da RNA polimerase T7 (GARCÍA, 2012). Quando o IPTG é adicionado, ele se liga ao repressor LacI, promovendo uma mudança conformacional que impede a sua ligação ao operador. Isso libera a transcrição do gene da T7 RNA polimerase, resultando na síntese da enzima. A RNA polimerase T7, então, reconhece e se liga ao promotor T7 presente no plasmídeo de expressão, iniciando a transcrição do gene de interesse, que será subsequentemente traduzido na proteína recombinante (TEROL *et al.*, 2021).

A escolha da linhagem de células hospedeiras pode também ser ajustada conforme as necessidades específicas da proteína a ser expressa. Por exemplo, as linhagens Origami e AD494 são indicadas quando se busca uma maior formação de pontes dissulfeto no citoplasma. Já as linhagens K-12 e BL21(DE3) são amplamente utilizadas para a otimização da expressão de uma ampla variedade de proteínas recombinantes (POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLOU, 2023; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A *E. coli* BL21(DE3), em combinação com o sistema de expressão pET, é considerada um dos sistemas de referência para a expressão de proteínas recombinantes, devido à presença da RNA polimerase T7 codificada no genoma da linhagem. Esse gene é originário do prófago λ inserido no cromossomo da BL21(DE3) e está sob o controle do promotor lacUV5 (P_{lacUV5}), uma variante do promotor lac com maior eficiência de transcrição (GARCÍA, 2012). O promotor T7 presente nos plasmídeos da série pET é reconhecido pela RNA polimerase T7 da BL21(DE3), permitindo uma taxa de transcrição até oito vezes superior à promovida pela RNA polimerase nativa de *E. coli* (ZHANG *et al.*, 2022). Essa elevada eficiência pode resultar em uma acumulação excessiva de proteínas recombinantes, podendo causar prejuízos, especialmente no caso de proteínas com toxicidade para a célula hospedeira. Nesses casos, é recomendada a utilização de linhagens como a BL21(DE3)pLysS, que expressam uma quantidade basal da lisozima T7, capaz de inibir parcialmente a atividade da RNA polimerase T7, reduzindo assim a intensidade da expressão e minimizando os efeitos tóxicos decorrentes da superexpressão (GARCÍA, 2012).

Vários fatores podem influenciar a eficiência de expressão em *E. coli*, como a temperatura do cultivo e indução, toxicidade da proteína-alvo, condições de cultura, além de concentração e tempo de indução com IPTG. Tais variáveis podem gerar maior ou menor formação de corpos de inclusão, interferência na capacidade de crescimento da

cultura e podem intensificar ou reduzir o rendimento da proteína desejada. Portanto, a experimentação prévia em diferentes condições de temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução é essencial para seleção do protocolo mais otimizado antes da efetiva produção da proteína recombinante (AGRAWAL *et al.*, 2024).

3.4 Vetor pET-SUMO

A produção de proteínas recombinantes pode apresentar diversos desafios. A escolha do vetor de expressão adequado, alinhado às necessidades e limitações do hospedeiro e da proteína que se busca expressar pode auxiliar na minimização destes. O vetor pET-SUMO (Invitrogen) (Figura 2), por exemplo, pode ser uma ferramenta essencial na expressão de proteínas pouco solúveis e de difícil expressão, especialmente em sistemas baseados na bactéria *E. coli*.

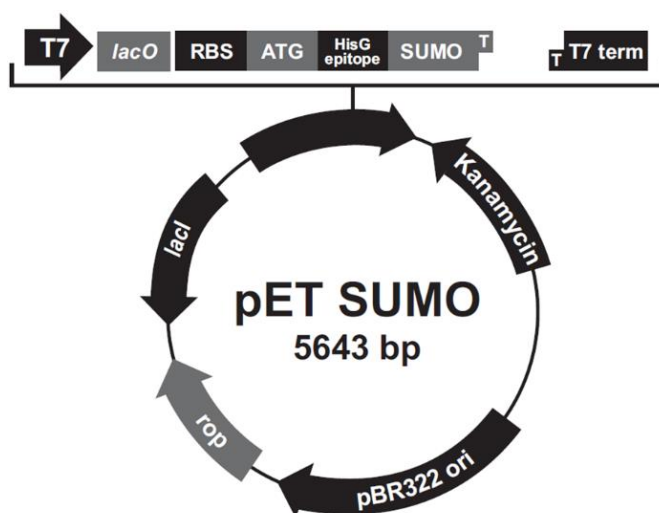


Figura 2. Mapa do vetor de expressão pET SUMO. O vetor apresenta resistência ao antibiótico Canamicina (https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/petsumo_man.pdf).

Portador do sistema de expressão T7, o vetor pET-SUMO confere elevada eficiência de transcrição na produção de proteínas recombinantes. Além disso, o vetor expressa proteínas de fusão contendo uma cauda N-terminal com 6 histidinas (6xHIS), a proteína SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) e a proteína de interesse (Figura 3). Apresenta também um sítio de clivagem para a enzima SUMO protease (TAN *et al.*, 2020).

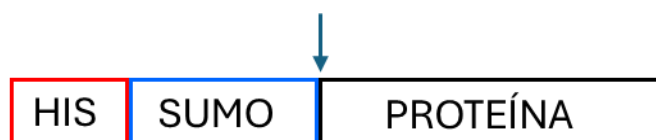


Figura 3. Esquema geral da proteína de fusão produzida pelo vetor de expressão pET-SUMO. A seta indica a presença do sítio de clivagem da SUMO protease.

A cauda HIS possui a função de facilitar a purificação da proteína em coluna de afinidade contendo níquel imobilizado. A função da proteína SUMO auxiliar no enovelamento tridimensional da proteína de fusão ao se ligar na proteína-alvo, evitando interações hidrofóbicas incorretas e reduzindo, dessa forma, a formação de corpúsculos de inclusão, resultando em aumento da quantidade de proteína solúvel obtida (BUTT, T. R. *et al.*, 2005; LAW *et al.*, 2025). A presença do sítio de clivagem pela protease Ulp1, localizado entre a SUMO e a proteína de interesse permite, após a purificação, obter a proteína sem estar ligada à cauda HIS e à proteína SUMO (BUTT *et al.*, 2005).

Corpos de inclusão são agregados de substâncias, formados no citoplasma ou periplasma da célula. Sua formação impede a obtenção da substância-alvo no interior do agregado e gerando, no caso de proteínas recombinantes, a necessidade de etapas de desnaturação da estrutura, capazes de inviabilizar a função desta a depender da eficiência da renaturação (RAMASAMY; WHELAN, 2009). No contexto da expressão recombinante de proteínas, células bacterianas, como *E. coli*, podem formar corpos de inclusão como uma reação ao acúmulo excessivo de proteínas agregadas, devido a superexpressão, mal dobramento, baixa solubilidade, estresse celular e outros. Diferentes métodos podem ser aplicados para reduzir a formação de corpos de inclusão durante a expressão de proteínas recombinantes, por exemplo, a diminuição da temperatura de crescimento celular, uso de chaperonas moleculares para auxiliar no dobramento correto e a fusão com *tags* solúveis, como é o caso da proteína SUMO (POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLU, 2023).

3.5 Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade é uma técnica de separação altamente específica, baseada na interação precisa entre uma molécula-alvo e um ligante imobilizado na matriz sólida, podendo ocorrer entre anticorpos por meio de interação antígeno-anticorpo, ou enzimas por substrato. Este método pode ser aplicado na purificação de proteínas, como A ou G na Cromatografia de Afinidade Imunológica, ou por Afinidade de Íons Metálicos

Imobilizados (IMAC), como Ni^{2+} ou CO^{2+} , para proteínas fusionadas a *his-tag* (HAGE, 1999; LORTIE, 2023).

Além das técnicas mencionadas, existem outros tipos de cromatografia de afinidade disponíveis para serem aplicados conforme a necessidade. A cromatografia de afinidade com lectinas utiliza a interação entre lectinas e carboidratos para a purificação de glicoproteínas. A cromatografia com ligantes de ácido nucleico utiliza sequências de DNA ou RNA para capturar proteínas que interagem com esses ácidos. Por fim, a cromatografia com ligantes de pequenas moléculas emprega compostos específicos para purificar determinadas proteínas (RODRIGUEZ *et al.*, 2020).

4. METODOLOGIA

4.1 Amplificação do gene *gfp* por PCR

A amplificação da sequência nucleotídica codificadora da proteína GFP foi realizada por meio de técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (MULLIS; FALOONA, 1987) utilizando 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (POL-100S – Cellco), 60 ng de DNA, 200 μM dNTPs, 10X Taq *Reaction Buffer* e 10 pmols de cada um dos respectivos *primers Forward* e *Reverse*, apresentados na Tabela 1, para uma reação com volume final de 20 μL . Foi utilizado como molde para a amplificação do gene *gfp*, o DNA do plasmídeo pRMF-GFP (Figura 4), cuja construção foi realizada pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro na UNESP (Universidade Estadual Paulista), Câmpus Jaboticabal (AMISTÁ *et al.*, 2025). A reação de amplificação ocorreu em Termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler - Applied Biosystems) com gradiente de temperatura de anelamento com 5 graus de variação (45°C a 50°C) a fim de encontrar a temperatura ideal de amplificação do gene *gfp*. A temperatura de anelamento dos *primers* utilizada foi obtida através da ferramenta “*Tm Calculator*”, versão 1.16.6 (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) (New England Biolabs). Desse modo, a amplificação foi realizada utilizando um programa com a desnaturação inicial de 2 minutos a 98°C, seguida de 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, anelamento a 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C e 50°C por 15 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos; e um ciclo de 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indefinido.

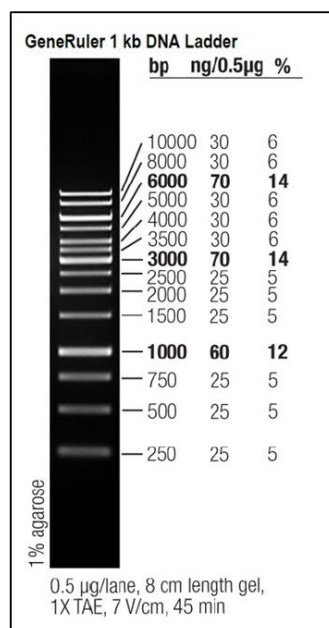


Figura 5. Padrão de Peso Molecular GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, SM0312 (Thermo Fisher Scientific)

4.1.1 Purificação dos fragmentos amplificados a partir da PCR

Após confirmação do tamanho do fragmento amplificado de *gfp* e a seleção da temperatura de anelamento mais adequada, uma nova amplificação do fragmento foi realizada utilizando apenas a temperatura de anelamento ideal (47°C). O produto da PCR foi purificado utilizando o kit PCR Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (A8292 - Promega), segundo as recomendações do fabricante. As amostras purificadas tiveram suas concentrações e pureza analisadas no espectrofotômetro Nanodrop® (Software ND-1000 V3 3.0, Thermo Fisher Scientific).

A confirmação da sequência do gene foi realizada por sequenciamento no laboratório CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) por meio da metodologia de Sanger (SANGER, F. *et al.*, 1977), utilizando o sequenciador automático ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, CA).

4.2 Construção do plasmídeo de expressão pET-SUMO contendo o gene *gfp*

4.2.1 Ligação do gene *gfp* ao vetor pET-SUMO

A sequência nucleotídica do gene *gfp* amplificada e purificada foi clonada no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen), utilizando a proporção molar de 3 de inserto para 1 de vetor (50 ng do inserto para 20 ng do vetor), 1 µL de enzima T4 DNA Ligase, (M0202S - New England Biolabs), 2 µL de 10X T4 DNA Ligase buffer, num volume final de 20 µL e mantidas em termociclador a 16°C por 16 horas; 65°C por 10 minutos para a inativação da enzima e a 4°C para a conservação da ligação. O produto ligado foi usado para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B.

4.3 Obtenção de células de *E. coli* de linhagens DH10B e BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET-SUMO-GFP

4.3.1 Preparo de células de *E. coli* DH10B e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS eletrocompetentes

Para o preparo de células eletrocompetentes, foram utilizadas células de *E. coli* DH10B recém cultivadas em Placa de Petri contendo meio LB-ágar (extrato de levedura a 5 g/L, triptona a 10 g/L, NaCl a 10 g/L, pH 7,5, concentração 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico) acrescido do antibiótico canamicina (40 µg/mL). Um pequeno volume de célula bacteriana foi espalhado pela placa, utilizando a técnica de semeadura por esgotamento, e esta foi incubada à 37°C por cerca de 16 horas em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, uma colônia isolada foi selecionada da placa para a preparação de pré-inóculo. O pré-inóculo foi realizado em 10 mL de meio LB líquido, contendo canamicina, e mantido em constante agitação em Shaker a 250 rpm, 37°C, por 16 horas. Após esse período, 5 mL do volume da cultura foram inoculados em 500 mL de meio LB, acrescido de canamicina, em um erlenmeyer de 2 litros. A cultura permaneceu em agitação constante de 250 rpm a 37°C até que a Densidade Óptica a 600 nm atingisse 0,5 ($DO_{600nm} = 0,5$) e então o erlenmeyer foi imediatamente colocado em gelo e mantido por 30 minutos. Posteriormente a cultura foi centrifugada a 9660 xg, por 15 minutos, a 4°C, em centrífuga CR22GIII (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 250 mL de glicerol 10% gelado e centrifugado novamente a 9660 xg por 15 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado mais duas vezes com 250 mL de glicerol 10% gelado e, ao final, ressuspendido em 2 mL de glicerol 10% gelado. Aliquotas de 50 µL da

solução bacteriana final foram adicionadas a microtubos de microcentrífuga de 1,5 mL, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento de sua utilização (JÚNIOR, 2019).

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção de células eletrocompetentes de *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pLysS, utilizando para isso, o antibiótico cloranfenicol (25 µg/mL), resistência essa presente no plasmídeo pLysS (EGUIA F. A. P. *et al.*, 2015).

4.3.2 Transformação do vetor plasmidial pET SUMO-GFP em células de *E. coli* DH10B por eletroporação

A transformação foi realizada utilizando 50 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, que estavam armazenadas a -80°C, e 2 µL da reação de ligação em um Eletroporador GenePulser II (Bio-Rad), utilizando os parâmetros de 1,5 KV; 50 µF; 200Ω e cubeta de 2 mm. Após a eletroporação, as células foram transferidas para um Tubo Falcon de 15 mL, estéril, e adicionou-se 1 mL de meio SOC (2% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 0,05% de cloreto de sódio; 2,5 mM de cloreto de potássio; 100 mM de cloreto de magnésio; 20 mM de glicose – pH 7,5). As células foram então submetidas a agitação constante de 250 rpm a 37°C por 1 hora, para recuperação. Aliquotas de 100 µL e 200 µL da cultura de transformantes foram espalhadas em Placas de Petri com meio LB-ágar suplementado com canamicina (40 µg/mL) e em seguida incubadas a 37°C por 16 horas. Colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em 5 mL de meio LB líquido com canamicina sob agitação de 250 rpm, a 37°C por 16 horas. Em seguida, 3 mL das culturas foram centrifugados a 16.000 xg, durante 1 minuto em microcentrífuga Eppendorf 5415R e tiveram seu DNA plasmidial extraído. Aliquotas de 800 µL destas culturas foram guardadas em tubos criogênicos, acrescidas de 20% de glicerol e estocadas a -80°C.

4.3.3 Extração do DNA plasmidial dos clones transformantes e confirmação por PCR e sequenciamento

O DNA plasmidial das culturas transformantes contendo a construção pET-SUMO-GFP foi extraído utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA teve sua qualidade e concentração analisados no Nanodrop®.

A confirmação da construção do plasmídeo foi realizada por PCR, utilizando os

pares de *primers* do vetor pET-SUMO, sendo estes: *primer* SUMO Forward (*primer forward*) 5'- AGATTCTTGTACGACGGTATTAG - 3' e *primer* T7 Reverse (*primer reverse*) 5'- TAGTTATTGCTCAGCGGTGG - 3'. Para a reação foram utilizados 10 pmoles dos *primers* Forward e Reverse, 1,25 U da Enzima Taq DNA polimerase (POL-100S - Cellco), 60 ng de DNA pET-SUMO-GFP e 10X *Taq Reaction Buffer* para volume final de 20 µL. O programa utilizado consistiu em uma temperatura de desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos, seguido de 25 ciclos de 98°C por 10 segundos; temperatura de anelamento a 59°C por 15 segundos; 72°C por 30 segundos, extensão final de 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indefinido. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1%, como já descrito no item 4.1. Confirmadas as identidades dos transformantes, os DNAs plasmidiais foram sequenciados com a finalidade de verificar se os insertos do gene *gfp* se ligaram ao vetor na orientação correta, ou seja, na fase de leitura correta para que o gene seja traduzido e certificar que não houve qualquer tipo de mutação na sequência do gene. O DNA plasmidial dos clones que apresentaram a orientação e sequenciamento corretos do inserto foi utilizado na transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

4.3.4 Transformação bacteriana em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Para a transformação de 50 µL de célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS eletrocompetente foram utilizados 2 µL de DNA plasmidial (360 ng). As condições de eletroporação, recuperação, cultivo dos transformantes, extração de DNA plasmidial, confirmação por PCR e armazenamento dos clones confirmados foram realizados como descrito no item 4.3.2.

4.4 Expressão heteróloga de GFP em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

4.4.1 Expressão em pequena escala

Os clones selecionados de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo recombinante pET-SUMO-GFP foram cultivados em meio LB-ágar, suplementado com canamicina (40 µg/mL) à temperatura de 37°C por 16 horas. As colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB com canamicina e submetidas a agitação constante de 250 rpm à temperatura de 37°C até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,6 a 0,8. Uma alíquota de 1 mL foi separada (amostra não-induzida), marcando o tempo zero de indução, e mantida a -20°C. Para a indução das culturas restantes foram adicionados 0,4 mM e 1mM do indutor β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubou-se por 4 horas nas mesmas

condições (SOMMER *et. al*, 2003 - adaptado). Em seguida, uma alíquota de 1 mL de cada concentração de IPTG foram retiradas (amostras induzidas). As três alíquotas (tempo zero e indução com 0,4 e 1,0 mM de IPTG) foram centrifugadas a 16.000 xg por 6 minutos a 4°C e ressuspensas em 100 µL (amostras induzidas) e 50 µL (amostra não-induzida) de água estéril e preparadas para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

4.4.1.1 Análise por SDS-PAGE

Aos 50 µL da amostra não-induzida e aos 100 µL das amostras induzidas, foram adicionados respectivamente 25 µL e 50 µL de Tampão da amostra 3x concentrado [187,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS (m/v), 30% glicerol, 16% β-mercaptoetanol, 0,006% azul de bromofenol (m/v)]. As amostras foram fervidas por 10 minutos em banho-maria (cuba metálica aquecida por resistência com controle termostático, contendo água e azida de sódio, onde se imergem recipientes de amostra), centrifugadas a 16.000 xg em microcentrífuga Eppendorf 5415R, a 4°C e mantidas em gelo até aplicação em gel SDS-PAGE (LAEMMLI U.K., 1970). A separação das proteínas foi realizada em um gel de concentração a 6% (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS, 30% solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED) e gel de separação a 12% (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS, 30% solução de acrilamida, 0,1% de APS e 0,1% de TEMED). A eletroforese foi realizada utilizando o Sistema *Mini-PROTEAN Tetra System* (Bio-Rad) em voltagem constante de 200V por aproximadamente 45 minutos. Para a eletroforese foi utilizado Tampão de Corrida 1X, [Tris Base dissódico (MW = 121,14) 25 mM, Glicina (MW = 75,07) 321 mM, 0,2% SDS (m/v), Azida de sódio 0,001% (m/v)]. As proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie (50% de metanol; 7,5% de ácido acético; 0,5% de Coomassie Brilliant Blue R-250) durante 15 minutos e o excesso de corante foi removido utilizando solução descorante (50% de metanol; 7,5% de ácido acético), sob agitação em agitador orbital, com lavagens sequenciais até que as bandas se tornassem bem visíveis no gel. O gel foi analisado e documentado em Fotodocumentador Molecular Imager™ Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad). Como padrão de peso molecular de proteínas, foi utilizado o *Spectra™ multicolor broad range protein ladder* – Thermo Fisher Scientific, que pode ser observado na Figura 6.

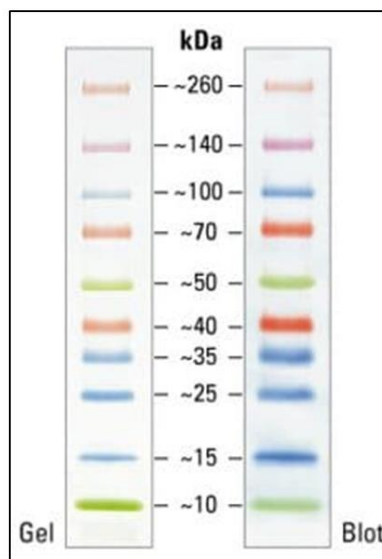


Figura 6. Padrão Molecular de 10 a 260 kDa *Spectra™ multicolor broad range protein ladder* (26634) – Thermo Fisher Scientific.

4.4.2 Expressão em larga escala

Após a escolha do clone e verificação em pequena escala da expressão da proteína recombinante em *E. coli*, foi realizada a expressão em larga escala da proteína GFP. Foi preparado um pré-inóculo de 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina (40 mg/ mL) e 250 μ L dos transformantes selecionados, que estavam armazenados em glicerol 20% a -80°C. O pré-inóculo foi mantido sob agitação a 250 rpm, 37°C, por 16 horas. A seguir, os 5 mL do pré-inóculo foram adicionados a 500 mL de meio LB líquido, acrescido de canamicina (40 mg/ mL), em um Erlenmeyer de 2 L. O inóculo foi incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até uma $OD_{600nm} = 0,6 \sim 0,8$. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi reservada (amostra não-induzida) e ao restante do inóculo foi adicionado o indutor IPTG, para uma concentração final de 1mM e incubado por mais 4 horas a 37°C e sob agitação a 250 rpm.

As culturas induzidas foram resfriadas em gelo e centrifugadas a 9660 xg, por 15 minutos, à 4°C em centrífuga CR22GIII, (Hitachi). O precipitado foi ressuscitado em 30 mL de Solução de Lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5% glicerol, 0,5% Tween 20; 0,1% azida de sódio - Filtrado em membrana de 0,45 μ). E as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo, em 15 ciclos de pulsos ultrassônicos com intervalos de 15 segundos cada, utilizando o sonicador Branson Sonifier 250 (output 5 - 80%; Duty Cycle 25). Ao lisado foram adicionadas 200U de DNase I (Thermo Fisher

Scientific) para a digestão do DNA presente, para diminuir a viscosidade da solução. A digestão ocorreu a 37°C por 1 hora. O produto digerido foi centrifugado a 15000 xg, durante 30 minutos, à 4°C em centrífuga CR22GIII (Hitachi). O precipitado resultante foi ressuspenso em 15 mL da Solução de Lise e armazenado a 4°C, juntamente com o sobrenadante. Tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram analisados por SDS-PAGE.

4.5 Purificação da GFP por Cromatografia de afinidade (IMAC)

A purificação das proteínas foi realizada pelo método de cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados, como realizado por VIEIRA (2014) e SOMMER *et al* (2003), com adaptações. Para isso utilizou-se o cromatógrafo Akta Prime Plus FPLC System (GE, Amersham) e a coluna de Ni-Sepharose® His-Trap Chelating de 5 mL (GE, Amersham). A coluna foi equilibrada com 50 mL do Tampão de ligação A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 30 mM imidazol) e carregada com 30 mL da amostra, diluída em 15 mL de Tampão A. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 50 mL do Tampão A para eluir moléculas que não estavam aderidas a coluna. A eluição das proteínas ligadas à coluna foi realizada por um gradiente linear de 0 a 100% de Tampão de Eluição (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 5% glicerol, 500 mM imidazol). O fluxo do tampão foi de 2,0 mL/min e frações foram coletadas a cada minuto (2,0 mL cada). Todas as soluções e amostras utilizadas na IMAC foram filtradas em membrana de 0,45µm. As frações coletadas tiveram sua absorbância a 280 nm registradas e plotadas em gráfico para melhor visualização de quais continham a proteína e, em seguida, as frações escolhidas foram visualizadas em gel de SDS-PAGE. Além das frações proteicas, também foram visualizadas em gel as frações dos descartes (*Flowthrough*) da cromatografia antes e após injeção da amostra na coluna.

4.5.1 Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄)

As frações coletadas no pico de absorbância a 280 nm, ou seja, que continham a proteína de fusão purificada foram reunidas, o volume total mensurado (15 mL) e o complexo proteico precipitado com 70% de Sulfato de Amônio. Para o cálculo da quantidade de sulfato e amônio a ser adicionado na solução, foi utilizada a ferramenta “*Ammonium Sulfate Calculator*”, presente no site da EnCor Biotechnology Inc. (www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm). Aos 15 mL foram adicionados 6,75 g do

Sulfato de Amônio. O sulfato de amônio foi macerado e adicionado lentamente à solução em banho de gelo a 4°C sob agitação, por aproximadamente 1 hora. Após a precipitação da proteína de fusão His-SUMO-GFP, a solução foi centrifugada a 10.000 xg, durante 30 minutos, a 4°C em centrífuga CR22GIII (Hitachi) e o sobrenadante foi guardado a 4°C. O precipitado, foi ressuspensionado em 3 mL de Tampão A2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5% glicerol, 30 mM imidazol, 1mM DTT) e armazenado a 4°C.

4.5.2 Quantificação de proteína e digestão das proteínas de fusão His-SUMO-GFP

A proteína de fusão His-SUMO-GFP obtida pela precipitação com Sulfato de Amônio foi quantificada pelo método de Bradford (1976) através do uso do kit Protein Assay Dye Reagent (Cat. #500-0006 - Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância das soluções (amostra + reagente), em um volume final de 210 µL, foram determinadas no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad). Para a construção da curva padrão foi utilizada a proteína BSA (Albumina Sérica Bovina - #B9001S) nas concentrações de 0 (branco); 0,0625; 0,125; 0,250 e 0,500 mg/mL.

A digestão da proteína de fusão, visando a remoção da cauda de His-SUMO da proteína GFP, foi realizada com a enzima SUMO protease. Foram realizados, primeiramente, testes com mini digestões em um período de 6h, a 25°C, havendo coletas de alíquotas de 50 µL a cada 2 horas. A digestão teste do complexo His-SUMO da proteína GFP foi realizada utilizando 50 µL da amostra, 130 µL de Tampão A2 e 20 µL de SUMO protease. O resultado das digestões foi visualizado em SDS-PAGE 12% e a condição que apresentou o melhor perfil de digestão (4 h) foi selecionada para dar segmento à digestão da amostra total. Para a reação de digestão foram utilizados 100 µL de enzima, 2 mL de Tampão A2 e 3 mL da amostra proteica. A amostra digerida passou novamente pela purificação por meio da cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados para obtenção da proteína pura. A preparação da coluna ocorreu como descrito no item 4.5. A coluna foi carregada 3 mL da amostra proteica digerida e 12 mL de Tampão A2 e em seguida, lavada com Tampão A2 até a 29ª fração. A partir da 30ª fração foi iniciada a injeção do Tampão B até 100% do gradiente para eluição do complexo His-SUMO ligado à coluna.

As frações coletadas tiveram sua absorbância a 280 nm registradas e plotadas em gráfico e as escolhidas foram visualizadas em gel de SDS-PAGE. Ao volume total das frações escolhidas (25mL) foi adicionado 11,26 g de sulfato de amônio e a proteína GFP precipitada como descrito no item 4.5.1 e quantificada como descrito no item 4.5.2.

As atividades envolvendo manipulação de organismos geneticamente modificados foram conduzidas conforme as normas de biossegurança vigentes e aprovadas pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, sob o parecer nº 001/2025.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do plasmídeo de expressão pET-SUMO-GFP

5.1.1 Amplificação do gene *gfp*

A amplificação do gene *gfp* foi realizada usando seis temperaturas de anelamento diferentes (45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C e 50°C) a fim de revelar qual a melhor condição para o produto amplificado. O resultado visualizado em gel de agarose 1% apresentou bandas únicas de tamanho esperado a 714 pb (tamanho do *gfp* utilizado neste estudo) em todas as temperaturas utilizadas, como pode ser observado na Figura 8. Apesar de todas as temperaturas de anelamento utilizadas apresentarem amplificações satisfatórias, foi escolhida a temperatura de 47°C como condição padrão para as amplificações subsequentes.

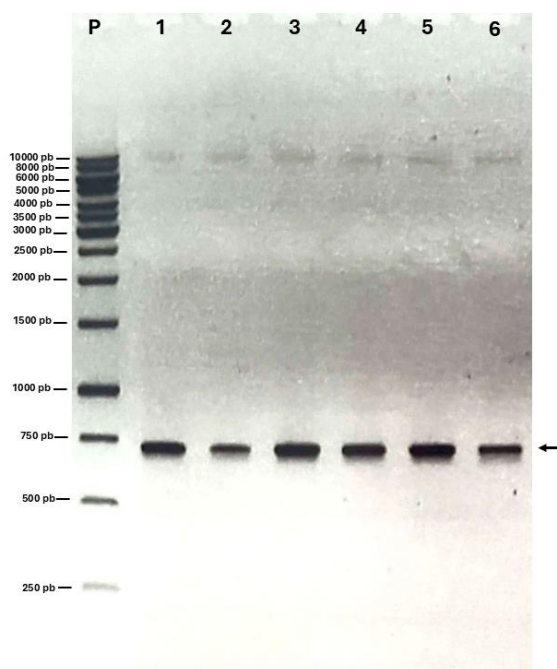


Figura 8. Gel de agarose 1% do gene *gfp* amplificado utilizando as seguintes temperaturas de anelamento: 1) 45°C; 2) 46°C; 3) 47°C; 4) 48°C; 5) 49°C; 6) 50°C. **P** = Padrão Molecular GeneRuler 1 Kb DNA *Ladder*. A seta indica a banda amplificada de GFP (714pb). pb- pares de bases. Eletroforese realizada em Tampão 1 x TBE por 1 hora e 40 minutos a 90 V e o gel foi corado com Brometo de Etídio. Foram aplicados 8µL de cada amostra e 15µL de Padrão Molecular.

O tamanho do fragmento é compatível com o esperado para o gene *gfp* do plasmídeo pRMF-GFP utilizado como DNA molde, confirmando assim a sua integridade. A análise dos fragmentos por gel de agarose apresentou bandas nítidas, sem amplificações inespecíficas, indicando alta especificidade dos *primers* utilizados e aumentando a confiabilidade das etapas de clonagem posteriores. O fragmento amplificado e purificado apresentou, em sua quantificação, a concentração de 30,1 ng/µL. A razão 260/280 foi de 1,95, valor dentro da faixa esperada para DNA puro, indicando boa purificação e baixa contaminação por proteínas. A razão 260/230 apresentou valor de 1,94, também dentro da faixa, que sugere a ausência de contaminantes oriundos do processo de purificação. Os resultados da quantificação e parâmetros de qualidade apresentam o produto obtido como adequado para a ligação ao vetor pET-SUMO, otimizando a eficiência da clonagem.

5.2 Clonagem em células de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes

5.2.1 Obtenção de *E. coli* DH10B e BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET-SUMO-GFP e confirmação das clonagens

O gene *gfp* amplificado foi ligado ao vetor de expressão pET-SUMO e transformado em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes. As colônias transformadas exibiram um crescimento ótimo em meio LB suplementado com canamicina, confirmando assim a presença do plasmídeo pET-SUMO-GFP, uma vez que a resistência a este antibiótico é uma característica proveniente do vetor (Figura 2), enquanto a resistência de *E. coli* DH10B, portando o plasmídeo pRMF-GFP, se trata apenas de resistência à gentamicina (Figura 4). O DNA plasmidial extraído de dez colônias transformantes e amplificado por PCR com *primers* específicos do vetor (pET-SUMO), visualizado em gel de agarose 1%, apresentou bandas nítidas próximas à faixa de 1000 pb, compatível com o tamanho esperado do gene *gfp* (714 pb), associado a um fragmento adicional amplificado do vetor (~250 pb), confirmando assim a presença do gene de interesse (Figura 9). Não houve diferença significativa entre as colônias transformantes visualizadas em gel de agarose. Uma banda de peso molecular próximo de 10000 pb foi observada em todas as amostras, podendo tratar-se de DNA genômico bacteriano ou DNA plasmidial residual. A baixa intensidade de

tais bandas e a obtenção destacada do fragmento esperado indicam que esse produto não comprometeu as análises subsequentes.

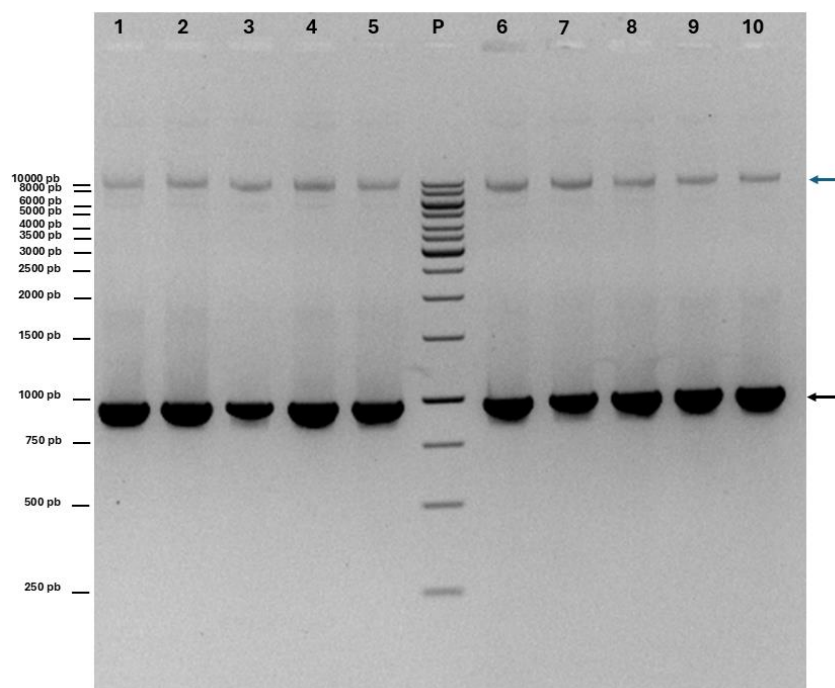


Figura 9. Gel de agarose 1% de PCRs de DNA plasmidial dos clones de *E. coli* DH10B transformados. Os poços 1 a 10 indicam cada uma das amplificações com o DNA das 10 colônias. **P** = Padrão Molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder. A seta em coloração preta indica a faixa de altura onde se encontra a amplificação do fragmento *gfp* + fragmento do vetor (~1000pb). A seta em azul indica a formação de bandas inespecíficas. pb – pares de bases. Eletroforese realizada em Tampão 1 x TBE por 1 hora e 40 minutos a 90 V. Gel corado com Brometo de Etídio. Foram aplicados 8µL de cada amostra e 15µL de Padrão Molecular.

O sequenciamento dos clones 1 a 4 pelo método de Sanger e subsequente comparação com as sequências presentes no National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando a ferramenta online BLAST, mostrou que os clones 2 e 3 continham o plasmídeo recombinante, mas apenas o clone 3 continha o inserto *gfp* integrado na orientação correta e sem mutações de bases (Figura 10), sendo então escolhido para as etapas seguintes de expressão. O Blastx dessa sequência no site do NCBI revelou que ela codifica a proteína GFP (Figura 11). Os resultados evidenciam a importância do sequenciamento para validação, uma vez que inserções invertidas ou mutações podem comprometer a expressão das proteínas (JONASSON *et al.*, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2024). Também estão em concordância com trabalhos anteriores, que destacam o uso de

antibióticos como marcadores de seleção prévia, mas ainda apresentam a necessidade de confirmação por outras análises moleculares, a fim de garantir a integridade do plasmídeo construído (ROSANO & CECCARELLI, 2014; GURUNG *et al.*, 2021).

Vector pAH05_PsodB-100-GFPova_RhyB2-10-BFP_mCh, complete sequence

Sequence ID: [OQ979407.1](#) Length: 7404 Number of Matches: 1

Range 1: 5361 to 6078

Alignment statistics for match # 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1296 bits(1436)	0.0	718/718(100%)	0/718(0%)	Plus/Plus
Query 36	TATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCTGCTGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGG			95
Sbjct 5361	TATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCTGCTGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGG			5420
Query 96	TGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGCTGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACCG			155
Sbjct 5421	TGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGCTGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACCG			5480
Query 156	AAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCTACTGGAACCTACCTGTTCCATGGCCAACT			215
Sbjct 5481	AAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCTACTGGAACCTACCTGTTCCATGGCCAACT			5540
Query 216	TGTCCTACTTTTCGCGTATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACA			275
Sbjct 5541	TGTCCTACTTTTCGCGTATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACA			5600
Query 276	GCATGACTTTTTCAGAGTGCCATGCCGGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTT			335
Sbjct 5601	GCATGACTTTTTCAGAGTGCCATGCCGGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTT			5660
Query 336	CAAAGATGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGT			395
Sbjct 5661	CAAAGATGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGT			5720
Query 396	TAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAA			455
Sbjct 5721	TAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAA			5780
Query 456	ATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGG			515
Sbjct 5781	ATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGG			5840
Query 516	AATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGA			575
Sbjct 5841	AATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGA			5900
Query 576	CCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTA			635
Sbjct 5901	CCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTA			5960
Query 636	CCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCT			695
Sbjct 5961	CCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCT			6020
Query 696	TCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATATACAAAGAA			753
Sbjct 6021	TCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATATACAAAGAA			6078

Figura 10. Resultado do primeiro hit do Blastn da sequência nucleotídica do clone 3 (Query). A identidade de bases entre a Query e a sequência presente no NCBI (Sbjct) é de 100 %. Essa sequência faz parte de vários plasmídeos que contém o gene *gfp* clonado. Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram os *primers* SUMO Forward (5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3') e T7 Reverse (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'), que se anelam no vetor pET-SUMO.

Dessa forma, o clone selecionado para dar sequência aos ensaios foi o clone 3, sendo este o único a apresentar o inserto sem mutações e integrado na fase de leitura correta para tradução do gene fusionado à cauda His-SUMO. Os demais clones (5 a 10), cujo DNA não foi sequenciado, foram mantidos em Ultrafreezer a -80 °C.

A transformação das células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com o plasmídeo pET-SUMO contendo o gene *gfp*, anteriormente extraído do clone 3, foi bem-sucedida, como evidenciado pelo bom crescimento das colônias em meio LB suplementado com canamicina. A obtenção deste resultado sugere a integração do vetor recombinante nas células, devido a esta linhagem não possuir resistência ao antibiótico utilizado, possuindo apenas resistência a cloranfenicol. A confirmação foi obtida por meio de PCR com os *primers* específicos do vetor, cujo produto apresentou o tamanho esperado (~1000 pb) (Figura 11), validando a presença de *gfp* na construção.

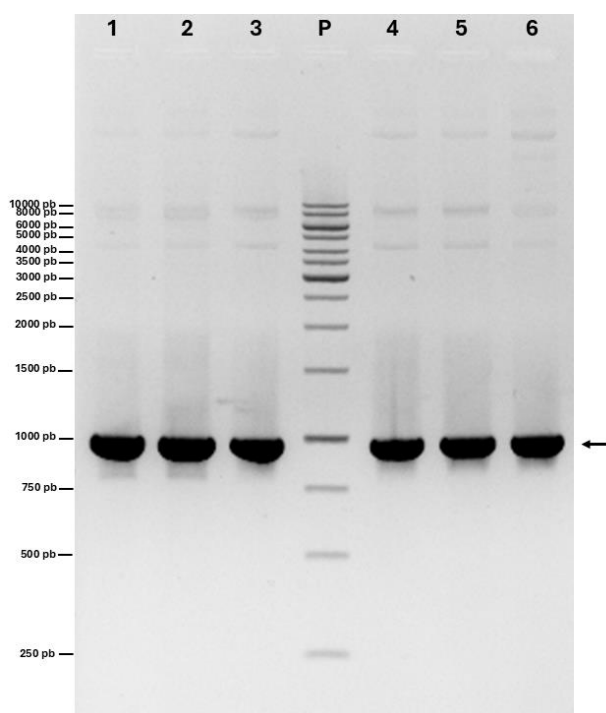


Figura 11. Gel de agarose a 1% exibindo o resultado da PCR de confirmação da presença de pET-SUMO+GFP em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Poços enumerados de 1 a 6 apresentam o resultado para cada um dos clones cultivados. **P** = Padrão de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder. A seta em coloração preta indica a faixa de altura onde se encontra a amplificação do fragmento *gfp* + fragmento do vetor (~1000pb). pb – pares de bases. Eletroforese realizada em Tampão 1 x TBE por 1 hora e 40 minutos a 90 V. Gel corado com Brometo de Etídio. Foram aplicados 8µL de cada amostra e 15µL de Padrão Molecular.

Além da confirmação da presença do vetor recombinante, os resultados obtidos indicam que o sistema pET-SUMO se manteve funcional e estável em BL21 (DE3) pLysS,

como esperado para essa linhagem e fundamental para a etapa subsequente de indução da expressão. Essa funcionalidade se dá devido à capacidade do vetor pET-SUMO de ser corretamente transcrito e traduzido em células BL21 (DE3), que possuem a RNA polimerase T7 necessária para a expressão do gene de interesse. A manutenção da estabilidade é evidenciada pelo crescimento das colônias em meio seletivo e pela confirmação da presença do produto esperado por PCR, confirmando a integridade do plasmídeo durante a replicação. Em estudos anteriores, se observa que tal linhagem é amplamente utilizada devido a sua alta eficiência na expressão heteróloga e baixa degradação proteica, características que elevam a probabilidade de obter proteínas solúveis e funcionais (ROSANO; CECCARELLI, 2014; INCIR; KAPLAN, 2024).

5.3 Expressão heteróloga de GFP em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

5.3.1 Análise dos testes de mini indução e seleção das condições ideais de expressão

A proteína GFP foi expressa em pequena escala para a seleção das melhores condições de indução, comparando duas concentrações de IPTG, 0,4 mM e 1 mM, ambas sob as mesmas condições (37 °C durante 4 horas). A análise por SDS-PAGE 12% das proteínas presentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS antes e após a indução, mostrou a presença de uma banda de aproximadamente 40 kDa nas amostras induzidas, correspondente ao peso molecular esperado para a fusão da proteína GFP (26,99 kDa) com a cauda His-SUMO (13,4 kDa), confirmando a expressão da proteína nas condições testadas. Entre as duas concentrações testadas, observaram-se diferenças sutis na intensidade das bandas, com maior intensidade para as expressas com 1 mM de IPTG (Figuras 12 e 13). Os clones avaliados no teste de concentração a 0,4 mM não tiveram grande variação entre si. Desse modo, o clone 2, único utilizado no teste de concentração a 1 mM, foi selecionado para dar seguimento à expressão em larga escala.

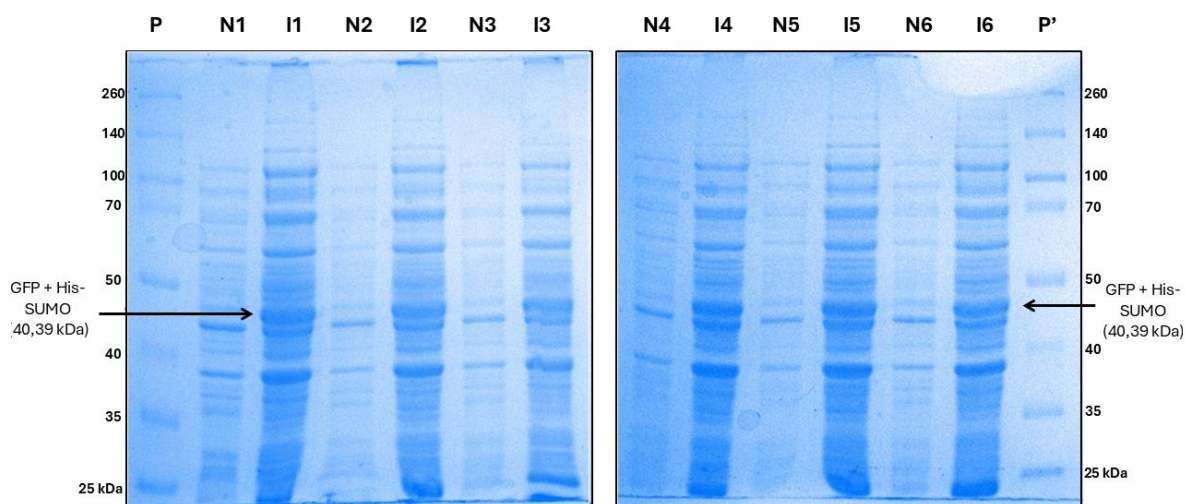


Figura 12. Análise da eletroforese em SDS-PAGE 12% das mini-induções realizadas com os clones portadores de pET-SUMO + GFP, induzidos sob concentração de 0,4 mM de IPTG. Disposição dos poços: **P** = Padrão de peso molecular *Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder*; **N1** = Clone 1 Não-Induzido; **I1** = Clone 1 Induzido; **N2** = Clone 2 Não-Induzido; **I2** = Clone 2 Induzido; **N3** = Clone 3 Não-Induzido; **I3** = Clone 3 Induzido; **N4** = Clone 4 Não-Induzido; **I4** = Clone 4 Induzido; **N5** = Clone 5 Não-Induzido; **I5** = Clone 5 Induzido; **N6** = Clone 6 Não-Induzido; **I6** = Clone 6 Induzido. A seta indica a altura esperada para a proteína de fusão His-SUMO-GFP. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra e 10 μ L de padrão molecular. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

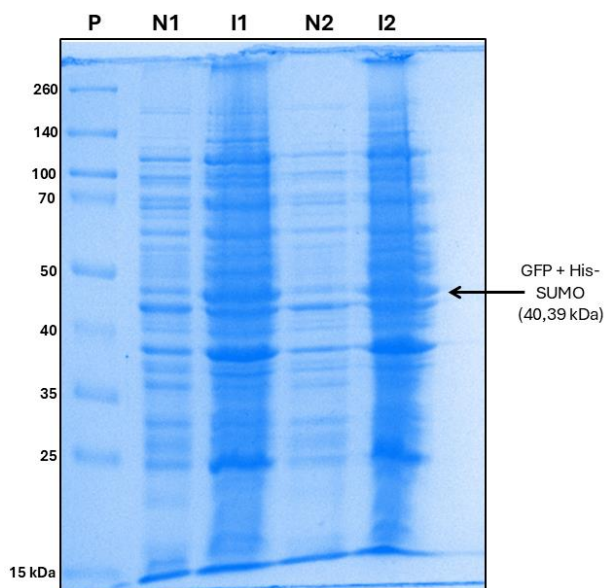


Figura 13. Análise da eletroforese em SDS-PAGE 12% das mini induções realizadas com os clones portadores de pET-SUMO + GFP, induzidos sob concentração de 1 mM de IPTG. Disposição dos poços: **P** = Padrão de peso molecular *Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder*; **N1** = Clone 1 Não-Induzido; **I1** = Clone 1 Induzido; **N2** = Clone 2 Não-Induzido; **I2** = Clone 2 Induzido; A seta indica a altura esperada para a proteína de fusão His-SUMO-GFP. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra e 10 μ L de padrão molecular. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

As bandas indicativas da proteína GFP expressa migraram levemente acima da massa molecular esperada, o que pode ser explicado pelo fato de o valor estimado ter como

base a massa média dos aminoácidos, estando sujeito a variações, a depender dos aminoácidos constituintes da proteína (SAMBROOK; MANIATIS; FRITSCH, 1989). As bandas na altura esperada podem ser identificadas como His-SUMO-GFP uma vez que surgem apenas nas amostras induzidas com IPTG, exatamente na massa esperada (~40 kDa) para tal proteína recombinante. Para uma confirmação mais assertiva, poderia ter sido realizado um Western blot anti-His/anti-GFP. No entanto o comportamento observado no gel é consistente com a identidade da proteína.

Os resultados indicam também que as condições de temperatura (37°C) e tempo (4 horas) escolhidas foram adequadas e satisfatórias para a boa expressão da proteína. Dessa forma, as condições adotadas para a expressão em larga escala foram de 37°C por 4 horas, induzidas com 1 mM de IPTG.

5.3.2 Expressão de His-SUMO-GFP em larga escala

A indução da expressão em larga escala da proteína de fusão His-SUMO-GFP, realizada com o clone 2 de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS, portador da construção pET-SUMO-GFP, apresentou alterações visíveis na cultura bacteriana. Após quatro horas de indução com IPTG a 1 mM, a cultura apresentou coloração amarelo-esverdeada, tanto na suspensão celular (sobrenadante) quanto no precipitado, obtido após a centrifugação (Figura 14). A alteração de cor sugere previamente o sucesso da expressão, visto que a GFP apresenta tal coloração como característica e, como marcador, este resultado sinaliza o sucesso da expressão gênica (CHALFIE *et al.*, 1996; ANTER; HUSSEINY; MOHAMMED, 2023). Resultados semelhantes são observados em sistemas de expressão recombinante com *E. coli*, demonstrando a eficiência da indução por IPTG na obtenção de elevadas quantidades de proteína fluorescente (AGRAWAL *et al.*, 2024; GURUNG *et al.*, 2021).



Figura 14. Cultura de células BL21 portando o plasmídeo pET-SUMO + GFP suspensa em Tampão de Lise após 4 horas de indução sob ação do indutor IPTG a 1 mM.

Após a lise celular por sonicação, a amostra apresentou alta viscosidade, indicando significativa presença de DNA genômico. Essa ocorrência poderia comprometer a análise em eletroforese e os processos de purificação da proteína, devido a possível interferência dos ácidos nucleicos na mobilidade em gel de SDS-PAGE, dificultando as leituras, e causando obstrução das colunas durante a cromatografia (BRITTO; PANETO, 2021; POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLOU, 2023). Dessa forma, foi necessária a digestão da amostra com DNase I. Após a digestão, foi possível observar diminuição da viscosidade e dar continuidade às análises.

As amostras obtidas foram então analisadas por SDS-PAGE (Figura 15). De acordo com o resultado observado, é possível notar que a proteína de fusão His-SUMO-GFP foi altamente expressa, em comparação com a amostra não-induzida, a qual não apresentou banda de altura correspondente que pudesse ser claramente identificada no gel. Na amostra do precipitado celular é possível observar uma banda bem destacada, no entanto esta não se trata da proteína de fusão His-SUMO-GFP, apesar da proximidade de tamanho (~40 kDa). A banda referente a proteína de fusão apresentou-se com intensidade no sobrenadante, como uma banda também destacada entre 40 e 50 kDa. Este resultado sugere que a proteína foi obtida em sua forma solúvel. Esse perfil é ideal, significando que o sistema de expressão não permitiu a formação de corpos de inclusão, possibilitando o processo de purificação e evitando também a provável diminuição de rendimento (LOZANO TEROL *et*

al., 2021; ROSANO; CECCARELLI, 2014). A presença da proteína de fusão His-SUMO-GFP na fração solúvel é altamente relevante, pois proteínas recombinantes podem se acumular na célula bacteriana, formando corpos de inclusão/agregados insolúveis. Nesses casos, seria necessário realizar uma etapa de solubilização com agentes desnaturantes, como ureia ou guanidina, seguida de renaturação (FAKRUDDIN *et al.*, 2013; SINGH; UPADHYAY; PANDA, 2008; ZHANG *et al.*, 2022). No entanto, esse processo geralmente resulta em perdas significativas, pois nem todas as moléculas recuperam a estrutura nativa e podem perder sua funcionalidade biológica (ROSANO; CECCARELLI, 2014; POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLOU, 2023).

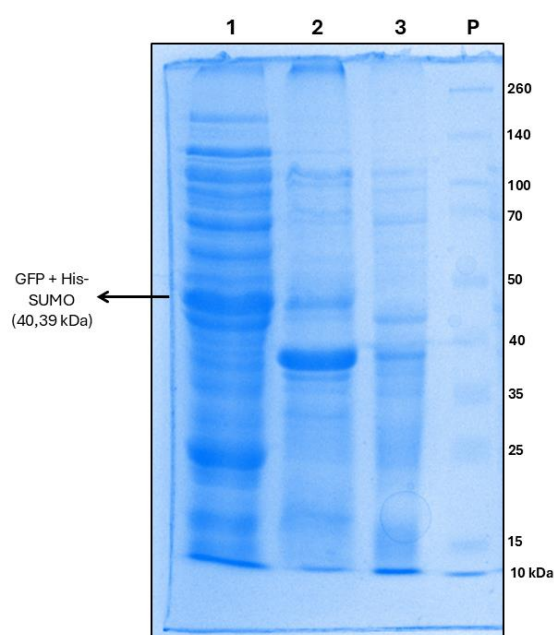


Figura 15. Análise em gel de SDS-PAGE 12% da indução da expressão de GFP em larga-escala após lise das células e centrifugação. Disposição dos poços no gel: **1** = Amostra do sobrenadante; **2** = Amostra do precipitado após ressuspensão; **3** = Amostra não induzida; **P** = Padrão Molecular *Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder*. A seta indica a faixa de altura da construção GFP + His-SUMO. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V. Foram aplicados 30 µL da amostra do sobrenadante, 15 µL da Amostra do precipitado após ressuspensão, 15 µL da amostra não induzida e 5 µL de padrão molecular. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Desse modo, os resultados confirmam que as condições de indução aplicadas foram eficazes para a expressão da proteína de fusão His-SUMO-GFP em grande quantidade e em sua forma solúvel, bem como a eficácia do tratamento com DNase I para otimizar a preparação da amostra. Essa condição experimental apresentou vantagem para as etapas seguintes de purificação por IMAC e quantificação.

5.4 Obtenção da proteína GFP purificada

5.4.1 Primeira purificação: GFP fusionada a His-SUMO (His-SUMO-GFP)

O sobrenadante obtido após lise e centrifugação das células induzidas em larga escala (15 mL) foi submetido à técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) para purificação da proteína de fusão His-SUMO-GFP. Nesse método, a His-tag da proteína se liga ao Ni^{2+} presente na coluna, retendo a proteína de interesse enquanto contaminantes, como DNA, RNA e proteínas sem afinidade por Ni^{2+} , são eluídos (BRESOLIN *et al.*, 2009; SMITH, 2009).

O gradiente de eluição teve variação de 0% a 100% de tampão de eluição concentrado em imidazol (Tampão B). A eluição da proteína de fusão iniciou-se por volta de 30% do gradiente, atingindo seu pico próximo a 39%, conforme evidenciado no Gráfico 1. As frações correspondentes aos tubos 76 a 83 apresentaram fluorescência na coloração verde característica da GFP, após exposição à luz UV, destacando-se a fração 80 como a mais intensa (Figura 16), demonstrando que a ligação à coluna, a retenção da proteína de fusão e a eluição foram eficientes.

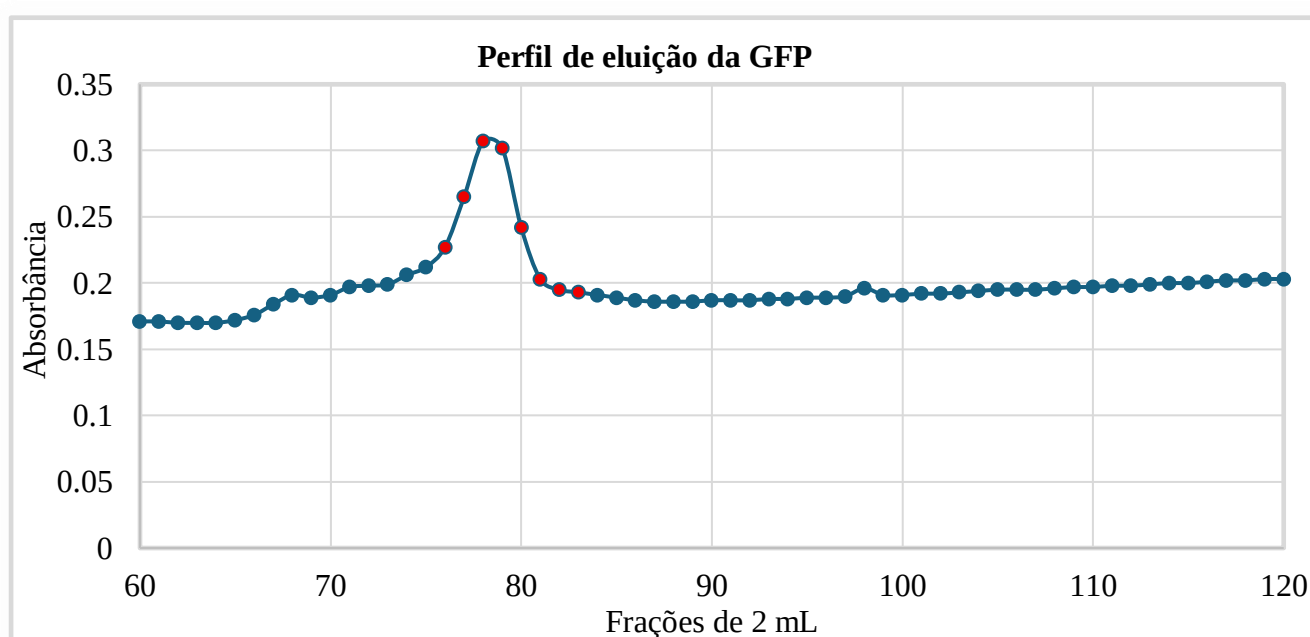


Gráfico 1 - Perfil da eluição da proteína de fusão His-SUMO-GFP em função do gradiente de Tampão de Eluição. A coluna foi carregada com 30 mL da amostra. Em vermelho estão destacadas as frações referentes aos tubos 76 a 83 que foram coletadas.

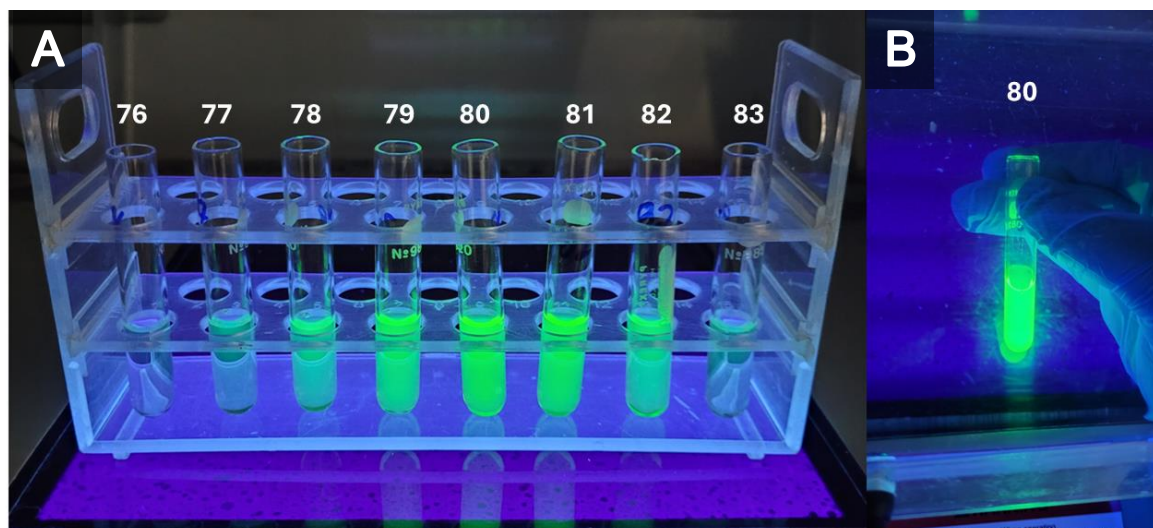


Figura 16. A- Frações 76 a 83 da eluição de His-SUMO-GFP após purificação por Cromatografia de Afinidade, exibindo fluorescência sob a incidência de luz UV. B- Fração 80 exibida isoladamente, mostrando a fluorescência mais intensa das frações coletadas.

Foi realizada análise por SDS-PAGE das frações eluídas (tubos 67, 75, 76, 78, 80 e 83) em comparação às amostras dos descartes antes e após aplicação do complexo proteico no sistema. A análise demonstrou que não houve perda significativa de proteína após eluição (Figura 17). As frações 78 a 83 foram as que apresentaram maior concentração da proteína de fusão His-SUMO-GFP, além de algumas bandas de baixa massa molecular com contaminantes. A pureza observada nas bandas indica sucesso da primeira purificação.

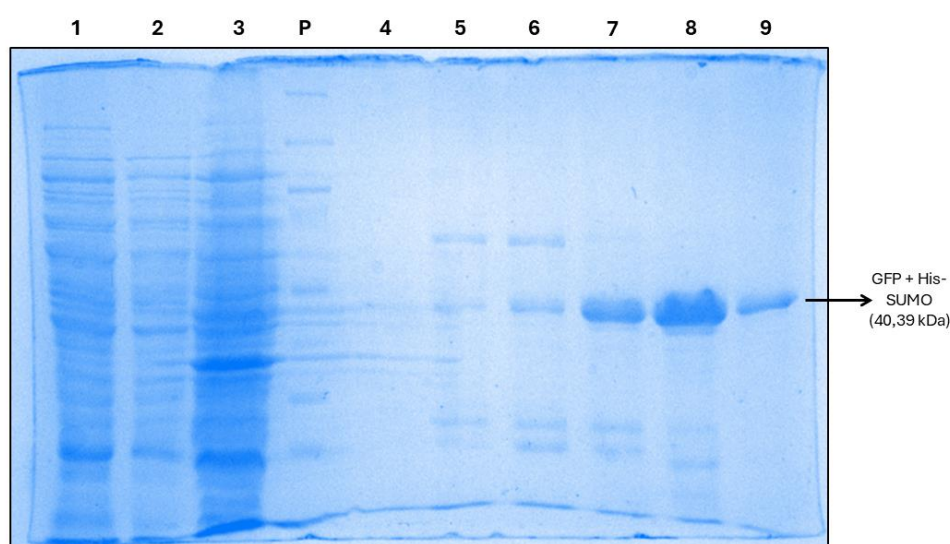


Figura 17. Perfil das amostras eluídas de GFP e descartes após a primeira purificação pelo método de cromatografia de afinidade. 1 = Descarte da amostra (fração não retida na coluna após aplicação do lisado celular) ; 2 = Descarte do lavado (proteínas removidas na etapa de lavagem da coluna); 3 = Amostra de GFP induzido; P = Padrão Molecular *Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder*; 4 = Fração 67 da eluição de GFP; 5 = Fração 75 da eluição de GFP; 6 = Fração 76 da eluição de GFP; 7 = Fração 78 da eluição de

GFP; **8** = Fração 80 da eluição de GFP; **9** = Fração 83 da eluição de GFP. A seta indica a esperada para a proteína de fusão His-SUMO-GFP. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V. Foram aplicados 25 μ L de cada amostra e 5 μ L de padrão molecular. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Após a coleta e unificação das frações selecionadas (15 mL), as proteínas foram precipitadas com 70% de saturação de sulfato de amônio, ressuspendidas em Tampão A2 e quantificadas, apresentando valor de concentração de 3,4 mg/mL. A digestão da proteína de fusão His-SUMO-GFP (3 mL) com a enzima SUMO-protease foi testada em diferentes tempos (2, 4 e 6 horas) e todos os períodos analisados demonstraram digestão eficiente, liberando a GFP (~26,99 kDa) e a cauda His-SUMO (~13,4 kDa) como evidenciado por SDS-PAGE (Figura 18). Para a digestão em larga escala, foi escolhido o tempo de 4 horas, resultando em um perfil de digestão total satisfatório da proteína de fusão (Figura 19), semelhante ao anterior, obtido na digestão em pequena escala.

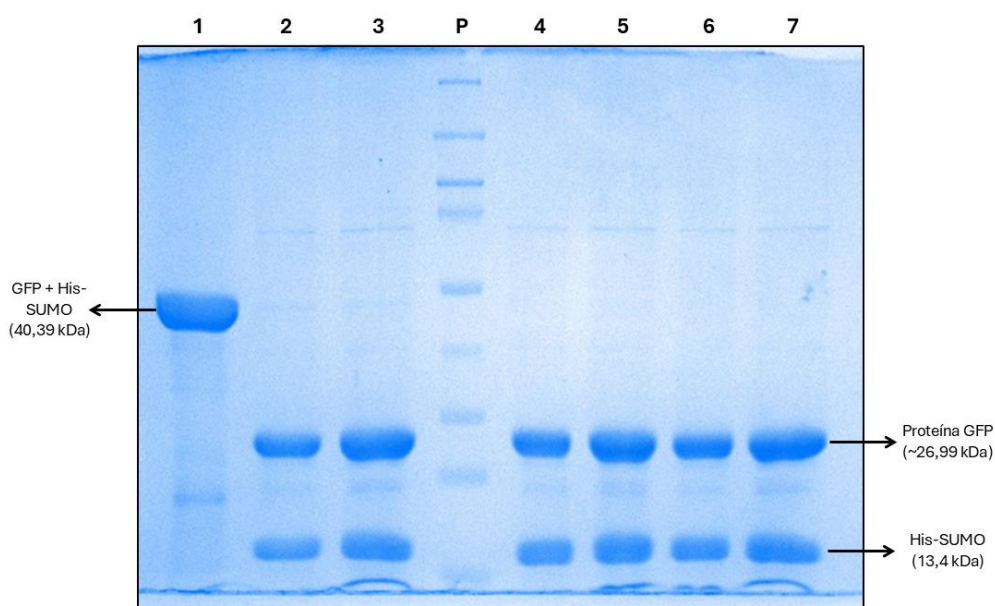


Figura 18. Perfil de digestão da proteína de fusão His-SUMO-GFP com a enzima SUMO protease em diferentes tempos. **1** = Proteína de fusão His-SUMO-GFP não-digerida (10 μ L); **2** = Digestão da proteína de fusão por 2 horas (10 μ L); **3** = Digestão da proteína de fusão por 2 horas (20 μ L); **P** = Padrão de peso molecular *SpectraTM multicolor Broad Range Protein Ladder* (5 μ L); **4** = Digestão da proteína de fusão por 4 horas (10 μ L); **5** = Digestão da proteína de fusão por 4 horas (20 μ L); **6** = Digestão da proteína de fusão por 6 horas (10 μ L); **7** = Digestão da proteína de fusão por 6 horas (20 μ L); As setas indicam a migração das bandas correspondentes à proteína de fusão His-SUMO-GFP, proteína GFP e cauda His-SUMO liberadas pela digestão com Sumo protease. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

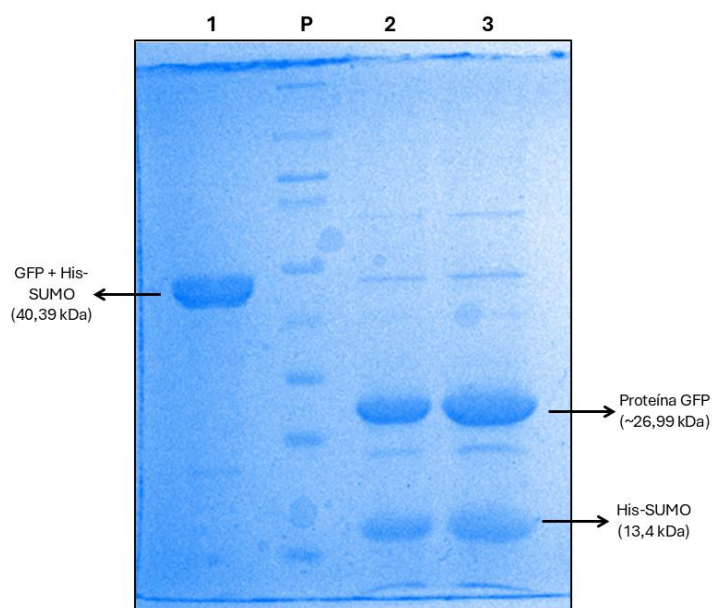


Figura 19. Digestão em larga escala da amostra total da proteína de fusão His-SUMO-GFP purificada pelo método de cromatografia por afinidade. **1** = Fração de HisSUMO-GFP purificado e não digerido (5 µL); **P** = Padrão Molecular *SpectraTM multicolor Broad Range Protein Ladder* (5 µL); **2** = Digestão da proteína de fusão por 4 horas (10 µL); **3** = Digestão da proteína de fusão por 4 horas (20 µL). As setas indicam a migração das bandas correspondentes à proteína de fusão His-SUMO-GFP, proteína GFP e cauda His-Sumo liberadas pela digestão com Sumo protease. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.4.2 Segunda purificação: GFP livre de His-SUMO

Após a digestão no tampão A2, a amostra foi submetida novamente à cromatografia de afinidade. O complexo His-SUMO, agora separado da proteína, se ligou à coluna e a GFP passou livremente, permitindo a coleta das frações purificadas. Como apresentado pelo Gráfico 2, a eluição da GFP ocorreu entre as frações 10 a 24 (30 mL). A partir da fração 29 iniciou-se a injeção do Tampão B para a eluição da cauda His-SUMO ligada à coluna, o que ocorreu entre as frações 37 a 41 (10 mL) (Gráfico 2).

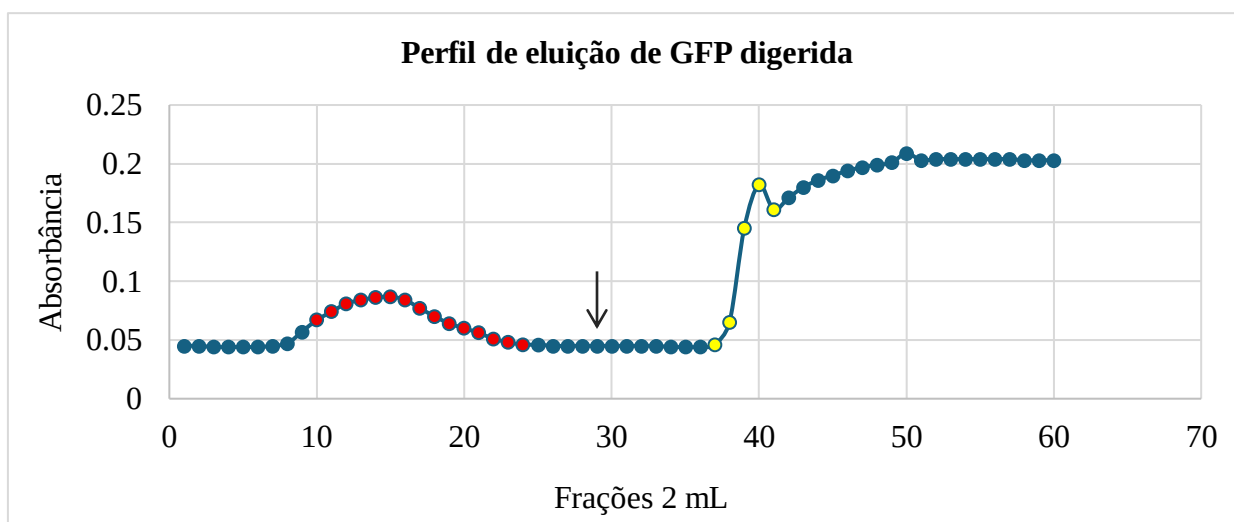


Gráfico 2 - Perfil de eluição da proteína GFP e da cauda His-SUMO, após a digestão com enzima SUMO protease. A coluna foi carregada com 15 mL da amostra. Em vermelho estão destacadas as frações referentes aos tubos 10 a 24 com a eluição de GFP e em amarelo estão as frações da eluição de His-SUMO (tubos 37 a 41). A seta na fração 29 indica o início da eluição com o Tampão B.

A análise da SDS-PAGE das frações coletadas (Figura 20) confirma a separação satisfatória da proteína GFP da cauda His-SUMO e outros contaminantes. As frações selecionadas (10 a 24) foram juntadas e precipitadas com 70% de saturação de sulfato de amônio, resultando em 1 mL de GFP purificada com concentração final de 3,5 mg/mL. O perfil global do processo de expressão e purificação está resumido na Figura 21.

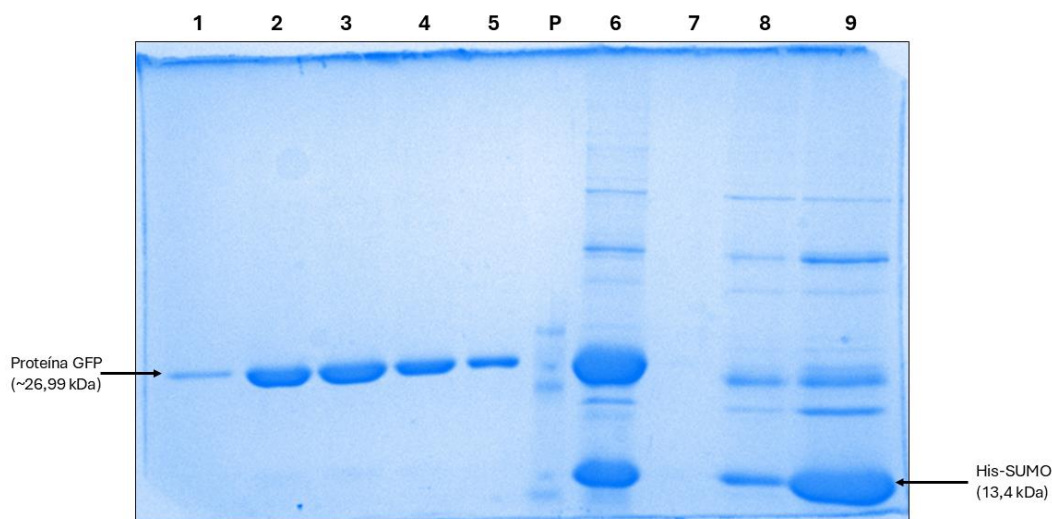


Figura 20. Gel de SDS-PAGE 12% apresentando o perfil das amostras obtidas da purificação em cromatografia de afinidade após digestão com SUMO protease. 1 = Fração 9 da eluição de GFP; 2 = Fração 15 da eluição de GFP; 3 = Fração 18 da eluição de GFP; 4 = Fração 20 da eluição de GFP; 5 = Fração 22 da eluição de GFP; P = Padrão de peso molecular Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder; 6 = Amostra da digestão de GFP; 7 = Fração 38 da eluição de His-SUMO; 8 = Fração 40 da eluição de His-SUMO; 9 = Fração 41 da eluição de His-SUMO. Foram aplicados 30 µL de cada amostra e 5 µL de Padrão Molecular; As setas indicam a migração das bandas correspondentes à proteína GFP e cauda His-SUMO

liberadas pela digestão com SUMO protease. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

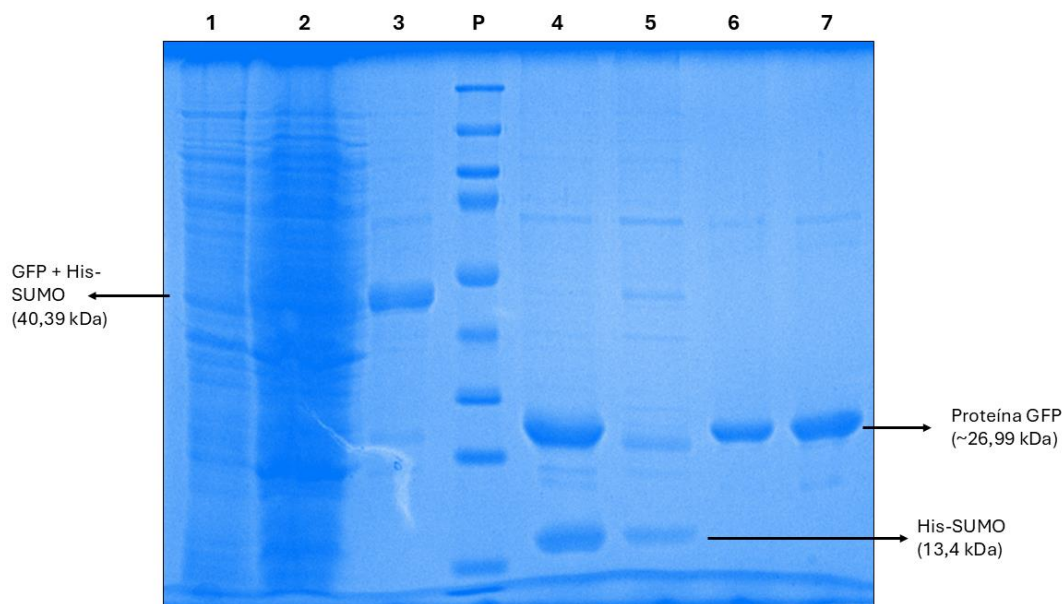


Figura 21. Eletroforese em SDS-PAGE 15% apresentando todas as fases do processo de expressão e purificação da proteína GFP na forma de proteína de fusão. **1** = Amostra não-induzida; **2** = Amostra após indução por 4 horas, com 1 mM de IPTG; **3** = Fração 78 da eluição da proteína de fusão His-SUMO-GFP após primeira purificação por meio de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados; **P** = Padrão de peso molecular de 10 a 260 kDa *Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder*; **4** = Digestão de His-SUMO-GFP com a enzima SUMO Protease; **5** = Fração 40 da eluição de His-SUMO após digestão; **6** = Perfil da amostra de GFP (1 µL) após purificação final por cromatografia de afinidade; **7** = Perfil da amostra de GFP (2 µL) após purificação final por cromatografia de afinidade. As setas indicam o tamanho esperado das bandas proteicas. Foram aplicados 30 µL de cada amostra e 10 µL de Padrão de peso molecular. A eletroforese procedeu-se por 45 minutos a 200 V e o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Os resultados obtidos demonstram que a proteína GFP pode ser expressa e purificada de forma eficiente utilizando o sistema de fusão His-SUMO em *E. coli* BL21 (DE3), em concordância com demonstrações anteriores da alta solubilidade e pureza obtida com a aplicação deste sistema de fusão (BUTT *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2020; WALDO, 2017). A análise por SDS-PAGE e a exibição de fluorescência confirmaram a integridade e funcionalidade da proteína GFP após purificação.

A eluição da proteína de fusão em gradiente de imidazol mostrou-se condizente com dados da literatura referentes a IMAC (BRESOLIN *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2020; LORTIE, 2023), confirmando que a faixa de 30–39% do gradiente é adequada para eluir a proteína sem perdas significativas. A digestão com SUMO-protease ocorreu conforme esperado, liberando a GFP sem sinais de degradação aparente e permitindo a obtenção da

GFP com elevada pureza após a segunda purificação, compatível com os protocolos de purificação de proteínas recombinantes de qualidade (SMITH, 2009; ANTER *et al.*, 2023).

Os perfis de SDS-PAGE e a visualização da fluorescência indicam que a integridade das características estruturais e funcionais da proteína foram mantidas, aspecto concordante com observações de estudos que destacam a estabilidade da GFP (CHALFIE *et al.*, 1996; HIRANO *et al.*, 2022; KASPRZYCKA *et al.*, 2024). O rendimento final e a pureza alcançados sugerem que este método é adequado para produção em escala laboratorial de proteínas recombinantes fluorescentes.

6. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho demonstrou com sucesso a expressão e purificação de proteínas recombinantes em linhagens de *Escherichia coli*, utilizando vetor de expressão pET-SUMO, portador de cauda de histidina (His-tag) e domínio de fusão SUMO. As técnicas aplicadas e as estratégias adotadas para a produção de células eletrocompetentes, transformação bacteriana, cultivo e seleção de transformantes, indução com IPTG e cromatografia de afinidade em coluna de Ni^{2+} mostraram-se eficientes em todo o processo de obtenção da proteína de interesse e plenamente reprodutíveis.

A presença do domínio SUMO, originário do vetor, contribuiu significativamente para a solubilidade da proteína de interesse, favorecendo a expressão em conformação funcional.

Os perfis de SDS-PAGE e a visualização da fluorescência indicaram que a integridade das características estruturais e funcionais da proteína foram mantidas. Os resultados obtidos evidenciaram a relevância do vetor de expressão escolhido, das linhagens hospedeiras e das condições experimentais aplicadas, para otimização da produção da proteína recombinante.

Este trabalho reforça o potencial da bactéria *E. coli* e do sistema de expressão T7, presente em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, como forte ferramenta para a expressão de proteínas heterólogas e estabelece um protocolo replicável para aplicações futuras em estudos ou processos biotecnológicos.

A elevada pureza da proteína GFP obtida e a indicação de sua estabilidade e funcionalidade, permitem que esta seja utilizada em futuras aplicações, como na calibração fluorescente, desenvolvimento de biossensores fluorescentes, como sonda em estudos de

dinâmica molecular e outras aplicações avançadas em biofísica e nanotecnologia.

7. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. L.; MAHMUD, S.; AGRAWAL, R.; KUMAR, R.; DAS, D.; DUTTA, S. Insights from *E. coli* BL21(DE3) strains for enhanced heterologous protein expression. *Microbial Cell Factories*, v. 23, art. 249, 2024.

ALMEIDA, P. A. S. P. L. de et al. Recombinant drugs-on-a-chip: The usage of capillary electrophoresis microchips in recombinant drug analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1532, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.04.019.

AMISTÁ, L. C. *et al.* Functional validation of putative PIP-box promoters of *Xanthomonas citri subsp. citri* using GFP as a reporter. *Molecular biology reports*, v. 52, n. 1, p. 224, 2025.

AMISTÁ, L. C. - Análise da força de expressão de promotores pip-box de *Xanthomonas citri subsp. citri* - 2024, 116f - Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2024.

AMSTERDAM, A.; LIN, S.; HOPKINS, N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental Biology*, v. 171, p. 123–129, 1995. doi: 10.1006/dbio.1995.1265.

ANTER, H.; HUSSEINY, S. M.; MOHAMMED, F. A. Green Fluorescent Protein: discover, structure, purification, applications, and future prospects. *Journal of Scientific Research in Science*, v. 40, n. 2, p. 53–71, 2023. DOI: 10.21608/jsrs.2023.331815.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BREJC, K.; SIXMA, T. K.; KITTS, P. A.; KAIN, S. R.; TSIEN, R. Y.; ORMÖ, M.; REMINGTON, S. J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 6, p. 2306–2311, 1997.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Química nova*, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

BRITTO, K. B.; PANETO, G. G. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS. Em: *Avanços metodológicos em biologia molecular e biotecnologia*. [s.l.] Atena Editora, 2021. p. 69–84.

BUTT, T. R. *et al.* SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2005. *New England Biolabs, Tm Calculator*, Disponível em: <<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>>. Acesso em: 27 nov. 2024.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Gene*, v. 173, n. 1, p. 33–38, 1996. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00706-7.

CHEN *et al.*, 2023 ("The Recent Advances in the Functional Applications of Green Fluorescent Protein-Based Biosensors", *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, p. 4307, DOI: 10.3390/ijms24054307

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.

DOHERTY, G. P.; BAILEY, K.; LEWIS, P. J. Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation In *Bacillus Subtilis*. *BMC Research Notes*, v. 3, n. 1, 2010.

EGUIA, F. A. P. *et al.* Avaliação de um novo vetor de expressão de genes heterólogos em *Escherichia coli*: estabilidade do plasmídeo e produção do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante. *Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Campinas - SP, Brazil: Galoá, 2015.

FAKRUDDIN, M. *et al.* Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnology*, v. 2013, p. 590587, 2013.

FURLAN, R. L. A.; PADILLA, G. Plataformas microbianas para produção de biofármacos. In: *BIOTECNOLOGIA MICROBIANA - VOLUME 1*. São Paulo: Editora Científica Digital, 2022. p. 11–24. DOI: 10.37885/230111831.

GARCIA, P. H. D. Sistemas de expressão de proteínas recombinantes – biofármacos. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021. Disponível em: <https://bdta.abcd.usp.br/directbitstream/39ee4402-8b42-4364-9214-43de8f0b3528/TCC%20-%20Pedro%20Henrique%20Daibert%20Garcia%20com%20avalia%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 11 maio 2025.

GURUNG, R.; MAHMUD, S.; AGRAWAL, S.; KUMAR, R.; DAS, D.; DUTTA, S. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Microbial Cell Factories*, v. 20, n. 1, p. 1-23, 2021. DOI: 10.1186/s12934-021-01596-0.

HAGE, David S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 593–615, 1999. DOI: 10.1093/clinchem/45.5.593.

HEIM, R.; TSIEN, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, v. 6, n. 2, p. 178–182, 1996. doi:10.1016/S0960-9822(02)00450-5.

HIRANO, M. *et al.* A highly photostable and bright green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 2022. DOI: 10.1038/s41587-022-01278-2.

INCIR, İ.; KAPLAN, Ö. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expression and Purification*, v. 219, p. 106463, 2024. DOI: 10.1016/j.pep.2024.106463.

JONASSON, P. *et al.* Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 35, n. 2, p. 91–105, 2002. DOI: 10.1042/ba20010099.

JÚNIOR, M. de O. B. Clonagem e expressão da enzima β -glucuronidase obtida de uma biblioteca metagenômica de terra preta de índio, 2019.

KASPRZYCKA, W.; SZUMIGRAJ, W.; WACHULAK, P.; TRAFNY, E. A. New approaches for low phototoxicity imaging of living cells and tissues. *BioEssays*, v. 46, n. 5, e2300122, 2024. DOI: 10.1002/bies.202300122.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970). *Nature* 227(5259):6, 1970.

LAW, J. D.; GAO, Y.; WYSOCKI, V. H.; GOPALAN, V. Design of a yeast SUMO tag to eliminate internal translation initiation. *Protein Science*, [S. l.], v. 34, n. 1, e5256, jan. 2025. DOI: 10.1002/pro.5256.

LIMA, S. D. F. Produção de proteínas recombinantes através de um novo sistema de fusão em *Escherichia coli*. 2013. 1 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2013. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/99768169c72675f8120dfea1b54405a9>. Acesso em: 12 mai 2025.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; PATTERSON, G. H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, v. 300, n. 5616, p. 87–91, 2003. DOI: 10.1126/science.1082520.

LORTIE, R. Recent advances in affinity chromatography techniques. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, v. 14, n. 2, art. 509, 2023. DOI: 10.35248/2157-7064.23.14.509

LOZANO TEROL, G.; GALLEGU-JARA, J.; SOLA MARTÍNEZ, R. A.; MARTÍNEZ VIVANCOS, A.; CÁNOVAS DÍAZ, M.; DE DIEGO PUENTE, T. Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology, Lausanne*, v. 12, Art. 682001, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682001

LUDVIKOVA, L. *et al.* Near-infrared co-illumination of fluorescent proteins reduces photobleaching and phototoxicity. *Nature Communications*, v. 15, p. 5032, 2024. DOI: 10.1038/s41587-023-01893-7.

MULLIS, Kary B.; FALOONA, Fred A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, [S. l.], v. 155, p. 335–350, 1987. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.

National Center for Biotechnology Information, BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, *National Library of Medicine*. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome> . Acesso em: 12 nov. 2024

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Revista Saúde e Biol.* n.3, v.7, 2012. p. 97 – 109.

PATTERSON, G. H.; KNOBEL, S. M.; SHARIF, W. D.; KAIN, S. R.; PISTON, D. W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, v. 73, n. 5, p. 2782–2790, 1997.

POURESMAEIL, MAHIN; AZIZI-DARGAHLU, Shahnám. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Archives of Microbiology*, v. 205, n. 5, p. 212, 2023. DOI: 10.1007/s00203-023-03541-9.

PRASAD, M. P.; MANJUNATH, K. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications and Protocols. *Journal of Research in Engineering and Applied Sciences*, v. 1, n. 1, p. 48–52, 2016.

VILLAVERDE, Antonio; CARAMÉS, Beatriz. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1385–1395, 2003. DOI: 10.1023/A:1025046605274.

RCSB PROTEIN DATA BANK. Green fluorescent protein (GFP). Entry 1EMA. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1EMA>. Acesso em: 12 ago. 2025.

RODRIGUEZ, Elliott L. et al. Affinity chromatography: a review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1157, art. 122332, 2020. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122332.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 172, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

SÁNCHEZ, C.; RAMIREZ, A.; HODGSON, L. Unravelling molecular dynamics in living cells: Fluorescent protein biosensors for cell biology. *Journal of Microscopy*, v. 298, n. 2, p. 123–184, 2025 (online em 2024). DOI: 10.1111/jmi.13270

SÁNCHEZ, E. M.; RAMÍREZ, M. A.; GONZÁLEZ, R. E.; HERNÁNDEZ, J. L. Purification strategies for recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnia*, v. 23, n. 2, p. 45-55, 2021.

SANGER, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, v.265, n.5596, p. 687-695, 1977.

SCHEICH, C. *et al.* Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. *Chemical Reviews*, v. 102, n. 2, p. 321–349, 2002. DOI: 10.1021/cr010142r.

SCHIPPER, R. Trends in animal production's utilisation of recombinant proteins. *Pharmaceutical Bioprocessing*, v. 11, n. 1, p. 10–12, 2023. DOI: 10.37532/2048-9145.2023.11(1).10-12.

SCIENTIFIC, Thermo-Fisher. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br> Acesso em: 15 nov. 2024.

SINGH, S. M.; UPADHYAY, A. K.; PANDA, A. K. Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *Journal of chemical technology and biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), v. 83, n. 8, p. 1126–1134, 2008.

SOMMER, C. A., SILVA, F. H., NOVO, M. T. M. Teaching Molecular Biology to Undergraduate Biology Students. 2003.

SMITH, D. B. Purification of recombinant proteins: affinity chromatography methods. *Methods in Enzymology*, v. 463, p. 635–652, 2009. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)61946-9.

TAN, Michelle Siying; TEH, Yuan Han; HO, Kok Lian; JOHNSON, Stanslas. An application of pET SUMO protein expression system in *Escherichia coli*: cloning, expression, purification, and characterisation of native Kras4B^{G12V} oncoprotein. *The Protein Journal*, v. 39, n. 1, p. 54–61, 2020. DOI: 10.1007/s10930-019-09872-1.

VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* (New York, N.Y.), v. 277, n. 5334, p. 2007–2011, 1997.

VIEIRA, F. C. F. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA XAC1201 ENVOLVIDA NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. subsp. *citri*, 2014.

WALDO, G. S. Recent advances in recombinant protein expression: *Escherichia coli* and beyond. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017. DOI: 10.1186/s12934-017-0654-4.

WALSH, G. Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications. *England: John Wiley & Sons Ltd*, 2007.

WEST, P. *et al.* Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *FEMS microbiology letters*, v. 178, p. 71–80, 1999.

ZHANG, Zi-Xu *et al.* Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microbial Cell Factories*, v. 21, n. 1, p. 191, 2022. DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de Aprovação da CIBio

	Comissão Interna de Biossegurança	
	FORMULÁRIO DE PARECER PROCESSO CIBio No. 001/2025	

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS - UNESP
Campus de Jaboticabal

13. Os procedimentos de limpeza, desinfecção, descontaminação e descarte de material/resíduos propostos estão em conformidade com as normas de biossegurança exigidas pela CTNBio?

☒ Sim	☐ Não
---	------------------------------

Parecer:

O proponente, prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, solicita autorização da CIBio para o desenvolvimento do projeto intitulado " Expressão heteróloga das proteínas GFP, GUS e mCherry em células de *Escherichia coli*", para obter a expressão dessas proteínas em *E. coli* na forma solúvel e purificada. As proteínas em questão, GFP (proteína fluorescente verde), GUS (β -Glucuronidase) e mCherry (proteína fluorescente vermelha) são codificadas em vetores otimizados para expressá-las em grandes quantidades. A enzima β -glucuronidase (GUS) é usada como gene repórter em estudos de expressão gênica, especialmente em plantas transgênicas, devido à sua robustez, simplicidade nos ensaios e ampla disponibilidade de substratos, como o X-Gluc (5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-glucuronideo). A produção endógena de GUS é rara em muitos organismos, permitindo quantificações precisas. A GFP, proteína fluorescente verde da água-viva *Aequoria victoria*, também é usada como gene repórter, assim como GUS. Sua fluorescência verde sob luz UV não exige reações enzimáticas, possibilitando o monitoramento em tempo real, *in vivo* e *in situ*, tornando-a altamente versátil e vantajosa. A proteína mCherry, isolada originariamente do coral *Discosoma sp.* (ZHANG *et al.*, 2015), exibe uma coloração dentro do espectro do vermelho na luz visível quando expressa. Assim como GFP, mCherry apresenta fluorescência e é capaz de exibir tais propriedades sem a necessidade de induções enzimáticas, podendo ser utilizada em combinação com GFP em experimentos de rotulagem dupla de proteínas. O presente projeto visa a expressão em *E. coli* das proteínas GUS, GFP e mCherry e sua purificação para uso em estudos posteriores do laboratório. No projeto enviado, encontram-se as informações detalhadas das operações laboratoriais e dos mecanismos de segurança adotados.

	Comissão Interna de Biossegurança	
	FORMULÁRIO DE PARECER PROCESSO CIBio No. 001/2025	

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS - UNESP
Campus de Jaboticabal

O laboratório onde os experimentos serão desenvolvidos tem extensão de CQB para Nível de Biossegurança 1 (NB-1). O pesquisador responsável declara que as dependências dispõem de infraestrutura adequada e pessoal técnico capaz de gerir o risco associado à atividade proposta. Os protocolos experimentais e as demais medidas de biossegurança propostas atendem às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, pelo que recomendamos à CIBio o DEFERIMENTO da solicitação.


 Documento assinado digitalmente
 ANGELO BERCHIERI JUNIOR
 Data: 10/02/2025 14:17:29-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Da. Angelo Berchieri Junior
Membro da CIBio

14. Deliberação CIBio: ☒ Aprovado ☐ Reprovado

Data: 10/02/2025

Assinatura do Presidente da CIBio:


 Documento assinado digitalmente
 LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHAO
 Data: 10/02/2025 15:20:33-0300
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão