

ESTUDO DA CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E NANOPARTÍCULAS DE OURO – ETAPA CRÍTICA DA CONSTRUÇÃO DE IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO

Marlene de Barros Coelho^{1*}, Liange Diehl¹, Nathalie Rossini², Valdir Souza Ferreira²

¹Embrapa Gado de Corte, ²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

E-mail: marlene.coelho@embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: PA4

Resumo

A construção de imunossensor para detecção de proteínas fundamentado em impedância e nanopartículas metálicas ancoradas sobre eletrodo impresso de ouro depende da imobilização de proteínas recombinantes com ouro coloidal. A interação de proteínas e ouro deveria ser espontânea e facilitada pela presença de grupos sulfídricos na sua composição. Nesse trabalho discute-se, preliminarmente o que está sendo feito para verificar a interação entre proteínas recombinantes, para diagnóstico de tuberculose e anaplasmoses, em presença de SDS e nanopartículas de ouro.

Palavras-chave: ouro coloidal; espectrometria de massas; quantificação de proteínas

Introdução

A construção de imunossensor para detecção de proteínas fundamentado em impedância e nanopartículas metálicas ancoradas sobre eletrodo impresso de ouro depende indispensavelmente da imobilização de proteínas recombinantes com ouro coloidal. A literatura afirma que a interação de proteínas e ouro é espontânea e facilitada pela presença de radicais sulfídricos na sua composição (TANG et al., 2006). Porém, isso não é observado para todas as proteínas recombinantes, antígenos produzidos artificialmente a partir de genes clonados para testes diagnósticos baseados no método ELISA indireto, que temos disponíveis para o diagnóstico laboratorial de algumas doenças em bovinos, como a tuberculose e anaplasmoses. Além disso, o protocolo de síntese das proteínas recombinantes resulta em suspensões insolúveis e é utilizado SDS (2%) para melhorar a solubilidade e, assim, tornar possível o uso das proteínas no ensaio ELISA. Portanto, são necessários estudos específicos para as proteínas que temos disponíveis para o desenvolvimento de imunossensores. Estão sendo aplicadas técnicas simples, desde observação visual a espectrometria de massas (JU e YEO, 2012) e microbalança de cristal de quartzo (BREWER et al. 2005), para a determinação do comportamento das suspensões de proteínas recombinantes e interação com nanopartículas de ouro, sintetizadas pela redução de cloreto áurico com citrato de sódio.

Materiais e métodos

A) Concentração de proteína para a estabilização da suspensão coloidal de ouro: observação visual

Os ensaios desenvolvidos para a avaliação da conjugação das nanopartículas de ouro (NPAu) com proteínas foram feitos utilizando 1mL de uma suspensão coloidal de ouro (17-20nm) na concentração de 1,66nmol/L e pH 6. Usando frascos eppendorf, adicionaram-se diferentes quantidades (0 a 100µg) da proteína albumina bovina (BSA, do inglês, bovine serum albumin) e durante 15min foram deixados em repouso a temperatura ambiente, sendo homogeneizados a cada 2min utilizando um agitador vórtex (Lab Dancer, IKA). Posteriormente, foi feita a adição de 100µL de uma solução de NaCl 10% (m/v). Foi avaliada também, a influência do pH (4 ou 8) da suspensão nessa conjugação.

A BSA (66,5kDa e ponto isoelétrico 4,6) é uma proteína que está sendo utilizada como referência para as proteínas recombinantes que serão posteriormente estudadas. Estas proteínas recombinantes estão disponíveis em uma solução contendo, aproximadamente, 2% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS). Desta forma, foi estudada a influência do surfactante na conjugação das NPAu com a proteína por meio de um ensaio em que a BSA foi preparada em uma solução com 2% de SDS antes de ser adicionada a suspensão coloidal de ouro.

A primeira proteína recombinante avaliada foi a MSP5 (*Anaplasma marginale*), cujo peso molecular é 23kDa e ponto isoelétrico 6,4. Nesse caso, o volume da suspensão coloidal foi de 200µL e a quantidade de proteína adicionada variou de 0 a 8,25µg e os ensaios foram realizados em frascos de vidro devido a aderência do conjugado formado entre a NP Au e a proteína ao polipropileno.

B) Eletroforese em gel de agarose

Uma avaliação preliminar da conjugação das NP Au com proteína em diferentes concentrações foi feita utilizando a eletroforese em gel de agarose. Assim, após a conjugação das NP Au com proteína, as suspensões foram pré-concentradas através da centrifugação por 20min a 12000rpm e da remoção do sobrenadante. A concentração do gel de agarose foi de 1%, sendo aplicada uma tensão de 120V por 1h e 20min. Cabe ressaltar que estes ensaios foram feitos com a suspensão coloidal em pH 6 e 8 para a conjugação com a proteína BSA, com e sem SDS.

C) Espectrometria de massas

Essa técnica foi utilizada com o objetivo de determinar a quantidade de proteína conjugada na superfície das NP Au (JU e YEO, 2012). Inicialmente, foi feita a conjugação da proteína BSA com as NP Au, conforme descrito no item A, com exceção da quantidade de proteína adicionada que variou de 0 a 150µg e volume de NP Au de 500µL. Posteriormente, as suspensões contendo NP Au e proteína foram lavadas com NH₄HCO₃ 50mmol/L e pré-concentradas através da centrifugação por 20min a 12000rpm e remoção do sobrenadante. As proteínas conjugadas as NP Au foram digeridas por tripsina, de acordo com as seguintes etapas: i) adição de ditiotretol (10mmol/L), ii) incubação por 2h a 72°C, iii) adição de iodoacetamida (50mmol/L), iv) incubação por 1h a 37°C, v) adição de tripsina (proporção 20 proteína: 1 tripsina), vi) incubação por 12h a 37°C e vii) adição de ácido fórmico (2,5%). Para a remoção das NP Au, a suspensão final foi centrifugada por 10min a 12000rpm. O sobrenadante foi separado, diluído em uma solução contendo 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico e filtrado em membrana de 0,22µm.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas modelo Xevo G2QTof (Waters) com ionização por electrospray, acoplado a um cromatógrafo (Acquity UPLC Core System, Waters). Inicialmente, foi feita uma otimização das condições empregadas para a separação dos peptídeos por cromatografia. O espectrômetro foi operado no modo de ionização positivo (3,5kV).

Resultados e discussão

A) Concentração de proteína para a estabilização da suspensão coloidal de ouro: observação visual

Após o ensaio de conjugação das NP Au com proteínas, foi possível observar que com a adição de 30µg da proteína BSA, a suspensão coloidal de ouro permaneceu estável após a adição da solução de NaCl. Este comportamento foi verificado para ambos os valores de pH avaliados (6 e 8). Com relação ao ensaio em que o pH da suspensão foi ajustado para 4, ocorreu a desestabilização da suspensão com o ajuste do pH e, desta forma, este pH não foi avaliado. A adição de SDS na solução de BSA não alterou o aspecto da suspensão coloidal de ouro, quando foram adicionados 30µg da proteína BSA.

Os resultados obtidos para a proteína recombinante MSP5 demonstraram que 2,75µg de proteína foram suficientes para estabilizar 200µL da suspensão coloidal de ouro.

B) Eletroforese em gel de agarose

Através da eletroforese em gel de agarose foi possível observar pequenas diferenças entre as mobilidades dos conjugados de NP Au e proteína BSA. Conforme foi observado (figura não apresentada, pois a visualização de cores é primordial na análise) nos ensaios em que não foi feita a adição de SDS, a mobilidade dos conjugados diminuiu com o aumento da concentração da proteína, provavelmente, devido a maior quantidade de proteínas aderidas a superfície das NP Au. Comparando-se os resultados obtidos para a suspensão coloidal em pH 6.0 e 8.0, uma mobilidade maior pode ser verificada em pH mais elevado. Um aumento do pH, resulta em maior quantidade de cargas negativas nas proteínas. Assim, devido a superfície da NP Au estar carregada negativamente, possivelmente, ocorre menor interação entre a proteína e a NP Au. Como as proteínas recombinantes que utilizamos estão diluídas em SDS, o mesmo procedimento será repetido para se estudar a influência desse surfactante na imobilização espontânea das proteínas em nanopartículas de ouro sem modificação ou modificações.

C) Espectrometria de massas

Após uma otimização das condições de ionização e eluição dos peptídeos provenientes da digestão da BSA, uma análise preliminar foi feita para avaliação dos peptídeos que poderiam ser utilizados para a quantificação da proteína conjugada a superfície da NP Au. A amostra analisada foi proveniente da conjugação de 500µL da suspensão coloidal de ouro com 50µg de BSA,

após o tratamento descrito anteriormente. Na Fig 1 pode ser observado o cromatograma obtido para esta amostra, sendo as intensidades normalizadas para 100% para os fragmentos m/z 722,3, 547,3 e 473,9, provavelmente, correspondentes aos peptídeos cujas massas teóricas são 1443,619, 1639,560 e 1419,670, respectivamente, de acordo com Walcher e colaboradores (2003).

Cabe ressaltar que estes estudos estão sendo iniciados no momento e são apenas preliminares, não podendo ser feita qualquer conclusão. Além disso, durante estes ensaios, o equipamento não foi utilizado com correção simultânea da m/z .

Conclusões

A utilização de nanopartículas de ouro na construção de imunossensores é indispensável para o aumento da sensibilidade, para que os resultados sejam comparáveis aos dos testes aplicando ELISA indireto. Nossas observações até o momento deixam clara a necessidade de estudos mais aprofundados sobre técnicas de quantificação e análise da bioatividade das proteínas recombinantes, que apresentam composição química e estrutural que podem não favorecer uma interação espontânea com o ouro. Nesse caso a superfície das nanopartículas de ouro devem ser modificadas para favorecer a ligação com proteínas recombinantes.

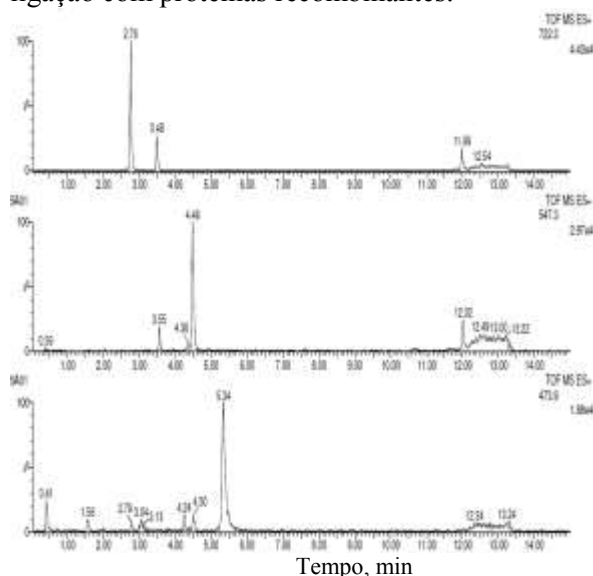


Fig 1. Cromatograma obtido para os peptídeos da proteína BSA após conjugação desta proteína com NPAu e digestão por tripsina. Eluição por gradiente. Fase móvel A: água, 0,1% ácido fórmico. Fase móvel B: acetonitrila, 0,1% ácido fórmico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y.; ZHONG, X.; LIU, Y.; DAI, J. Electrochemical detection of hepatitis B surface antigen using colloidal gold nanoparticles modified by a sol-gel network interface. *Clinical Biochemistry*, v. 39, p. 309-314, 2006.

JU, S.; YEO, W-S. Quantification of proteins on gold nanoparticles by combining MALDI-TOF MS and proteolysis. *Nanotechnology*, v. 23, p. 1-7, 2012.

BREWER, S. H.; GLOMM, W. R.; JOHNSON, M. C.; KNAG, M.K.; FRANZEN, S. Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir*, v. 21, p. 9303-9307, 2005.

WALCHER, W.; FRANZE, T.; WELLER, M. G.; PÖSCHL, U.; HUBER, C. G. Liquid- and Gas-Phase Nitration of Bovine Serum Albumin Studied by LC-MS and LC-MS/MS Using Monolithic Columns, *Journal of Proteome*, v. 2, p. 534-543, 2003.