



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Rafael Munareto do Nascimento

Produção do hormônio de crescimento bovino recombinante (rbGH) em cultivos de alta densidade.

Porto Alegre

2013

Rafael Munareto do Nascimento

Produção do hormônio de crescimento bovino recombinante (rbGH) em cultivos de alta densidade.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre

2013

Rafael Munareto do Nascimento

Produção do hormônio de crescimento bovino recombinante (rbGH) em cultivos de alta densidade.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 27 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Cristiano Valim Bizarro – PUCRS (Relator)

Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Dr. João Batista Calixto - UFSC

Porto Alegre

2013

The night is darkest just before the dawn.

- Harvey Dent.

Agradecimentos

Aos Professores Doutores Diógenes Santiago Santos e Jocelei Maria Chies, agradeço por terem me proporcionado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisas, por me possibilitar um grande aprendizado e pelo exemplo científico a ser seguido.

Agradeço a todos os meus colegas da empresa Quatro G P&D: Ana Christina Dias, Alessandra Raupp, Cláudia Paiva Nunes, Cristiano Neves, Gaby Renard, Giandra Volpato Gustavo Roth, José Eduardo Sacconi, Lara Krumberg Schüller, Maria Gleci A. Ferreira, Natasha Kuniechick, Renilda Trapp de Mello e Thiago Milech pela ajuda, dedicação, ensinamentos e a amizade.

Aos meus amigos e colegas do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, por todo apoio, ajuda e conselhos.

ABREVIACÕES

DO - Oxigênio dissolvido

E. coli – *Escherichia coli*

FPLC - Cromatografia líquida de alta performance

IPTG – Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

GRF - Fator Liberador de Somatotropina

SRIF - Somatostatina

GH - Hormônio de crescimento

OD₆₀₀ – Densidade óptica a 600 nm

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

bGH – Hormônio de crescimento bovino

rbGH – Hormônio de crescimento bovino recombinante

ESI-MS – Espectrometria de massas por ionização tipo *electrospray*

LC-MS/MS – Fragmentação induzida por colisão

Resumo

Somatotropina ou hormônio de crescimento trata-se de um hormônio natural secretado pela glândula pituitária. Sua secreção é controlada por dois neuropeptídeos secretados pelo hipotálamo, o fator liberador de somatotropina, que aumenta a secreção de hormônio de crescimento e a somatostatina que inibe a sua secreção. O hormônio de crescimento bovino possui efeito galactopoiético, o que é conhecido desde a década de 30. Seu mecanismo de ação envolve uma série de mudanças no metabolismo, direcionando mais nutrientes para a síntese de leite, sendo que o aumento na produção de leite é alcançado sem prejudicar a saúde do animal. Resultados de pesquisa demonstram que o hormônio de crescimento bovino pode aumentar a produção de leite de 6% a 40% e a eficiência de utilização de alimentos em bovinos. A produção de leite no Brasil aumentou cerca de 5 vezes desde 1975 até 2011, e estima-se que existam 23 mil vacas leiteiras no país, demonstrando o potencial mercado para o uso da somatotropina bovina.

E. coli é atualmente a maior plataforma para expressão simples de proteínas heterólogas, principalmente por ser um sistema bem caracterizado. Cultivos de alta densidade são desenvolvidos para aumentar a produtividade de proteínas, sendo amplamente utilizados para produção de diversas proteínas recombinantes disponíveis no mercado. Neste trabalho foram realizados cultivos de *E. coli* em biorreator por meio de técnicas de batelada alimentada, testando diferentes estratégias de alimentação e tempos de indução com IPTG. Ao final dos experimentos a biomassa obtida foi de 32,4 g/L usando uma estratégia de alimentação linear. Aproximadamente 2,5 mg de bGH foram obtidas a partir de 1 g de célula úmida usando um protocolo de purificação com apenas uma coluna cromatográfica.

Palavras-chave: hormônio de crescimento bovino; batelada alimentada; solubilização; corpos de inclusão.

Abstract

Somatotrophin or growth hormone (GH) is a hormone synthesized and secreted by the anterior pituitary gland in all animals and their secretion is controlled by two neuropeptides: the growth hormone releasing factor (GRF), which increases GH synthesis and secretion and somatostatin (SRIF), which inhibits GH secretion. bGH has galactopoietic effect, which is known since the thirties. The mechanism of action of bGH involves a series of orchestrated changes in the metabolism of body tissues so that more nutrients can be used for milk synthesis and these changes allow the animal to achieve an increased milk yield while remaining healthy. Long term studies (10–12 weeks) demonstrated increase in milk yield up to 40% with no adverse effects in the treated cows.

E. coli is currently the largest platform for expression of heterologous proteins and high cell-density culture techniques for culturing *E. coli* are designed to increase productivity of proteins. This system is widely used for production of various recombinant proteins available in the market. In this work were performed bioreactor cultivations using fed batch techniques, testing different feeding strategies and different IPTG induction times. At the end of the experiments the biomass obtained was 32.4 g/L using a linear feeding strategy. Approximately 2.5 mg of bGH were obtained from 1 g of wet cell using a purification protocol with only one chromatographic column.

Keywords: bovine growth hormone, fed-batch cultivation, inclusion bodies; solubilization.

Sumário

Sumário	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Hormônio de Crescimento Bovino	10
1.2 Efeito Galactopoiético do Hormônio de Crescimento Bovino	10
1.3 Segurança Do Uso Do Bgh	11
1.4 Cultivos Celulares De Alta Densidade Utilizando <i>Escherichia Coli</i>	12
1.5 Mercado De Leite	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. MANUSCRITO	17
5. CARTA DE SUBMISSÃO	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
7. PERSPECTIVAS	43
8. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônio de Crescimento Bovino

Somatotropina ou hormônio de crescimento (GH, do inglês *growth hormone*) trata-se de um hormônio natural secretado pela pituitária anterior em todos os animais. No entanto, sua estrutura difere consideravelmente entre espécies [1]. Sua secreção é controlada por dois neuropeptídeos secretados pelo hipotálamo, o fator liberador de somatotropina (GRF), que aumenta a secreção de GH e a somatostatina (SRIF), que inibe a secreção de GH [2].

A secreção de GH tem início a partir da liberação de SRIF e do aumento da liberação de GRF. Em seguida, a pituitária passa por um período de insensibilidade ao GRF, o qual caracteriza o padrão pulsátil de secreção do GH [3]. O padrão de secreção de GH difere entre os sexos, com machos exibindo pulsos maiores e menores níveis basais, enquanto que as fêmeas apresentam pulsos menores e maiores níveis basais [4]. O hormônio de crescimento bovino (bGH) é uma proteína com 191 aminoácidos com massa molecular de 21,8 kDa, que contém quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto, e não sofre modificações pós-traducionais como glicosilação e fosforilação [5].

1.2 Efeito Galactopoiético do Hormônio de Crescimento Bovino

O bGH é um hormônio que possui efeito galactopoiético, além de exercer ação nas células somáticas, no metabolismo de carboidratos, de proteínas e de lipídeos, o que é conhecido desde a década de 30. Vários experimentos foram conduzidos com administração de extratos hipofisários purificados a partir de bovinos e caprinos, mostrando a importância da somatotropina na manutenção da lactação [6]. O mecanismo de ação pelo qual bGH exerce o efeito galactopoiético é complexo e envolve diversos fatores. O mecanismo de ação do bGH envolve uma série de mudanças no metabolismo dos tecidos, assim mais nutrientes são direcionados para a síntese de leite [7]. Essas mudanças ocorrem por meio de efeitos

diretos sobre o tecido adiposo e fígado, e indiretos sobre tecido mamário, mediados pelas somatomedinas (IGF-I e IGF-II), cuja ação é estimular a capacidade sintética dos tecidos [8]. Esse aumento na produção de leite é atingido sem prejudicar a saúde do animal. Até os anos 70, a disponibilidade de bGH dependia da extração a partir da hipófise de novilhos. Com a chegada da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível a produção de quantidades ilimitadas de bGH a partir de culturas de *Escherichia coli* (*E. coli*) [9]. O hormônio de crescimento bovino recombinante (rbGH) foi o primeiro produto biotecnológico desenvolvido para ser utilizado em propriedades agrícolas [1]. Os resultados de pesquisa comprovam que o rbGH pode aumentar a produção de leite de 6% a 40% e a eficiência de utilização de alimentos em bovinos.

1.3 Segurança Do Uso Do Bgh

O rbGH foi um dos primeiros produtos biotecnológicos de uso animal aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em animais. Várias pesquisas foram conduzidas a fim de certificar a segurança do uso do bGH em vacas leiteiras, e o risco de saúde para os consumidores de leite das vacas tratadas com bGH. Em 1987, Eppard e colaboradores realizaram um experimento utilizando o hormônio recombinante em vacas leiteiras durante 188 dias e não detectaram nenhum problema relacionado ao uso de somatotropina [10]. Judge *et al.* realizaram outro experimento onde 500 mg de rbGH foram administrados em vacas holandesas de quatro fazendas e concluíram que a administração de rbGH não estava associada ao aumento na incidência de mastite nos animais [11]. Estudos de longo prazo para avaliar a saúde dos animais tratados também foram desenvolvidos, demonstrando que não houve relação entre o uso da somatotropina bovina e danos à saúde dos animais [12]. Em um estudo publicado pelo FDA, foi demonstrado que o rbGH não é ativo quando administrado de forma oral, perde sua atividade durante o processo de pasteurização do leite e é classificado como espécie específico, não demonstrando atividade

em humanos, o que assegura a segurança do consumo de leite de vacas tratadas com rbGH [13] .

1.4 Cultivos Celulares De Alta Densidade Utilizando *Escherichia Coli*

O progresso alcançado no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos sistemas de expressão heteróloga possibilita a superprodução de proteínas procarióticas e eucarióticas. À medida que a demanda de utilização do bGH é economicamente interessante, diversas empresas desenvolvem protocolos de produção de análogos recombinantes do bGH. *E. coli* é atualmente a maior plataforma para expressão de proteínas heterólogas, principalmente por ser um sistema bem caracterizado [14]. Como a maior parte das proteínas recombinantes é acumulada na porção intracelular da *E. coli*, a produtividade é proporcional à densidade celular do cultivo [15]. Por esse motivo, técnicas para atingir alta densidade celular são amplamente estudadas. Esses processos são conduzidos frequentemente em batelada-alimentada, sendo possível atingir concentrações celulares superiores a 50 gramas de célula seca por litro (g.L-1) em cultivos de *E. coli* [16]. As metodologias de alimentação utilizadas nos cultivos celulares de altas densidades estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: **Metodologias de alimentação nos cultivos em batelada-alimentada.**

<p>Metodologias de alimentação nos cultivos em batelada-alimentada:</p> <p>Sem controle <i>feedback</i>:</p> <ul style="list-style-type: none">- Vazão constante- Vazão elevada continuamente- Alimentação exponencial <p>Com controle <i>feedback</i>:</p> <p>Indireto:</p> <ul style="list-style-type: none">• DO-stat• pH-stat• Medida de CO₂
--

Fonte: modificação de Lee (1996).

As metodologias utilizadas sem controle *feedback* determinam a vazão de alimentação independentemente do andamento do cultivo. Quando se utiliza vazão constante, devido ao aumento da concentração celular no biorreator, a velocidade específica de crescimento decai continuamente e o aumento da concentração celular decai ao longo do tempo. A elevação gradual, linear ou em degraus da vazão de alimentação acompanha o crescimento celular, mas apenas no caso da vazão estar bem ajustada às condições do cultivo.

O método de alimentação exponencial permite que as células cresçam com uma velocidade específica de crescimento constante, minimizando assim a produção de acetato, pelo controle da taxa específica de crescimento abaixo da taxa crítica para formação do mesmo (geralmente é mantida entre 0,1 e 0,3h⁻¹). Por meio da alimentação exponencial, metodologia simples e eficiente de ser aplicada, Korz e colaboradores conseguiram atingir concentrações celulares de 128 g.L⁻¹ e 148 g.L⁻¹, utilizando como fonte de carbono glicose e glicerol, respectivamente [17].

As alimentações com controle *feedback* são mais sofisticadas. O controle indireto se baseia em medidas de parâmetros físicos do cultivo, como oxigênio dissolvido (DO), pH e velocidade de formação de CO₂ para alterar a vazão de alimentação. O método DO-stat é baseado no fato de que o oxigênio dissolvido no meio rapidamente aumenta quando há escassez de substrato, então a alimentação é adicionada quando o oxigênio dissolvido ultrapassa um valor pré-determinado. Já o método pH-stat se baseia na observação de que o pH se eleva quando acaba a fonte de carbono (principalmente como resultado do aumento da concentração de íons amônio excretados pela célula). O sistema adiciona alimentação quando o pH passa de um determinado valor. A elevação de pH no meio é mais sutil do que a variação do oxigênio dissolvido. O sucesso destas metodologias de alimentação está bastante atrelado à capacidade de controle do equipamento.

Controle *feedback* direto também pode ser utilizado, como por exemplo, com a utilização de um analisador de glicose *on-line*, sendo possível saber o quanto de glicose está presente no

meio de cultivo num determinado instante e então, o sistema é capaz de controlar o quanto de glicose será adicionado ao cultivo[18].

O uso combinado de mais de uma técnica também é possível. Em um estudo realizado em 2004, um grupo de pesquisadores utilizaram alimentação exponencial combinada com pH-stat para controlar a velocidade de crescimento a $0,1h^{-1}$ e utilizando esta estratégia, obtiveram $101 g.L^{-1}$ de células *E. coli* [19].

1.5 Mercado De Leite

A produção de leite no Brasil aumentou cerca de 5 vezes desde 1975 até 2011 [20], e existe uma previsão de aumento de 3 % na produção para 2013 [21]. Estima-se que existam 23 mil vacas leiteiras no Brasil com produtividade de 1.374 litros/vaca/ano [20]. Em termos de produção total o Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial com 31 milhões de toneladas de leite produzido [22]. No entanto, em termos de produtividade o Brasil apresenta um baixo índice (1.381 kg/vaca ordenha/ano) quando comparado a países desenvolvidos como Estados Unidos (9.593 kg/vaca ordenha/ano) e Canadá (8.202 kg/vaca ordenha/ano) [23]. Este cenário com alta produção e baixa produtividade demonstra o potencial mercado para o uso da somatotropina bovina.

2. JUSTIFICATIVA

O avanço científico tem permitido o emprego industrial de micro-organismos ou células modificadas geneticamente, objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas. Patentes de diversos biofármacos e insumos biotecnológicos vêm expirando, possibilitando a produção de biossimilares nacionais por meio de técnicas de DNA recombinante. A produção em larga escala do bGH pode ser economicamente interessante tendo em vista que o mercado nacional tem necessidade do produto e atualmente utiliza apenas o hormônio bovino recombinante importado, que está sujeito a variações de preço conforme a oscilação do mercado internacional. Este trabalho faz parte de um projeto maior que propõe o escalonamento da produção de alguns biofármacos a nível nacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo a superexpressão, purificação e escalonamento do rbGH, utilizando cultivos experimentais de *E.coli* para produção do mesmo.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer condições de cultivo em biorreator para obter cultivos de alta densidade;
- Determinar a sequência de aminoácidos da proteína recombinante por mapeamento peptídico;
- Purificar a proteína superexpressa por meio de Cromatografia Líquida de Rápida Performance (FPLC);

4. MANUSCRITO

Recombinant Bovine Growth Hormone
production in High cell-density culture of E. coli

Manuscrito foi submetido ao periódico Protein
Expression and Purification

Elsevier Editorial System(tm) for Protein Expression and Purification
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Recombinant Bovine Growth Hormone Production In High Cell-Density Culture Of E. Coli

Article Type: Regular Article

Keywords: bovine growth hormone, fed-batch cultivation, inclusion bodies solubilization, one-step purification.

Corresponding Author: Mr. Rafael Munareto Nascimento, MSc

Corresponding Author's Institution: Quatro G

First Author: Rafael M Nascimento, MSc

Order of Authors: Rafael M Nascimento, MSc; Gaby Rernard, PhD; Natasha Kuniechick, MSc; José E Sacconi Nunes, MSc; Jbcelei M Chies, PhD; Luiz A Basso, PhD; Diógenes Santiago Santos, PhD

Abstract: A protocol to produce large amounts of bovine growth hormone (bGH) using Escherichia coli fed-batch cultures was developed, and the maximum biomass obtained was approximately 32.4 g/L. bGH gene was constructed, cloned and subcloned, and the recombinant protein expressed as inclusion bodies in E. coli cells. bGH solubilization was achieved employing a brief shift to high alkaline pH in the presence of 2M urea. Purification was accomplished using a single chromatographic step yielding approximately 340 mg of rbGH per liter of E. coli culture. The protocol represents an efficient and high-yield method to obtain homogeneous rbGH. It may thus represent an important step towards scaling up for bGH large-scale production.

*Highlights

Highlights

- Production of bGH in high-cell density culture of E coli
- Two step solubilization from inclusion bodies.
- Purification using a single column.

**Recombinant Bovine Growth Hormone Production In High Cell-Density Culture
Of *E. Coli***

Rafael Munareto^{a,b,c}, Gaby Renard^a, Natasha Kuniechick^{a,b,c}, José Eduardo Sacconi Nunes^{a,b}, Joicei Maria Chies^a, Luiz Augusto Basso^{a,b,c}, Diógenes Santiago Santos^{a,b,c}.

^aQuatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA – Tecnopuc, Porto Alegre – RS, 90619-900, Brazil.

^bCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – RS, 90619-900, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PUCRS – Porto Alegre – RS, 90610-000, Brazil.

*Corresponding author:

Rafael Munareto do Nascimento (rafamn7@gmail.com)

Av. Ipiranga 6681, Prédio 92A. CEP 90619-900, Porto Alegre – RS

Phone: +55 61 9186 7117

Suggested Reviewers:

Geoff Lin-Cereghino, Ph.D (Editorial Board).

University of the Pacific, Stockton, CA, USA

Email: glincere@pacific.edu

Amulya Kumar Panda

National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi

Email: amulya@nii.res.in

Dale E. Bauman

University of Illinois

Email: deb6@cornell.edu

Email addresses:

rafamn7@gmail.com; gabyrenard@quatrogpd.com.br; zehsacconi@gmail.com;

natashakuniechick@hotmail.com; joceleichies@gmail.com; luiz.basso@puhrs.br;

diogenes@puhrs.br

Abbreviations

GH: growth hormone; rbGH: recombinant bovine growth hormone; bGH: bovine growth hormone; GRF: the growth hormone releasing factor; HCDC: high cell-density culture; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: polymerase chain reaction; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; DOC: dissolved oxygen concentration; WCB: Working Cell Bank; LB: Luria Bertani; TB: Terrific Broth; OD600nm: optical density at 600 nm ; TFA: Trifluoroacetic acid; DTT: Dithiothreitol; CDS: coding DNA sequence.

Abstract

A protocol to produce large amounts of bovine growth hormone (bGH) using *Escherichia coli* fed-batch cultures was developed, and the maximum biomass obtained was approximately 32.4 g/L. bGH gene was constructed, cloned and subcloned, and the recombinant protein expressed as inclusion bodies in *E. coli* cells. bGH solubilization was achieved employing a brief shift to high alkaline pH in the

presence of 2M urea. Purification was accomplished using a single chromatographic step yielding approximately 340 mg of rbGH per liter of *E. coli* culture. The protocol represents an efficient and high-yield method to obtain homogeneous rbGH. It may thus represent an important step towards scaling up for bGH large-scale production.

Keywords: bovine growth hormone, fed-batch cultivation, inclusion bodies solubilization, one-step purification.

Introduction

Much of the progress in techniques for gene expression has been achieved on the development and refinement of efficient expression systems in heterologous host organisms and the overproduction of many prokaryotic and eukaryotic proteins is now possible. As the use of bovine growth hormone (bGH) is of economic interest, a number of companies have tried to produce recombinant analogues of it. Somatotrophin or growth hormone (GH) is a hormone synthesized and secreted by the anterior pituitary gland in all animals. However its structure differs considerably between species [1]. Its secretion is controlled by two neuropeptides secreted by hypothalamus: the growth hormone releasing factor (GRF), which increases GH synthesis and secretion, and somatostatin (SRIF) which inhibits GH secretion [2,3]. bGH is a protein with 191 amino acids, molecular mass about 21,800 Da and contains four cysteine residues, all in disulfide linkage [4].

bGH is a hormone that has galactopoietic effect, acting also in somatic cells, metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, which are known since the thirties [5,6]. The mechanism of action of bGH involves a series of orchestrated changes in the metabolism of body tissues so that more nutrients can be used for milk synthesis. These are coordinated changes that allow the animal to achieve an increased milk yield while remaining normal and healthy [7,8]. Additional long term studies (10–12 weeks) demonstrated increase in milk yield up to 40% with no adverse effects in the

treated cows [9,10] . Until the 70s, the availability of bGH depended on the extraction from the pituitary of steers. The advent of recombinant DNA technology has made possible the production of unlimited amounts of bGH from cultures of *Escherichia coli* [7]. High cell-density culture (HCDC) techniques for culturing *E. coli* have been developed in order to improve productivity, and to provide advantages such as reduced culture volume, enhanced downstream processing and reduced investment in equipment [11]. Fed-batch cultivation is an effective and simple method to increase the productivity of a culture by increasing cell concentration, and have been widely used for recombinant protein production in *E. coli* [12].

In the present paper we describe gene construction of recombinant bovine growth hormone, protein expression in high cell density cultivation of *E. coli*, a simple two step solubilization protocol and the purification of the bovine growth hormone using a single anionic exchange column. We believe that the strategies used here provide an efficient protocol that may be useful in the industrial process of recombinant bGH.

Material and Methods

Gene Construction, Cloning and Expression.

For construction of the gene, 16 primers based on the bovine growth hormone sequence (GenBank, [DQ184480](#)) were designed. Each primer has 40 base pairs and were assembled using the *Pfu* DNA Polymerase in a PCR by a method developed in our laboratory [13]. The restriction enzyme sites for *Nde*I and *Bam*HI were added at the 5' and 3' ends, respectively. Briefly, in the first step of the construction the primers are annealed in pairs, in the next step, the eight PCR amplification products are isolated from agarose gel and combined again in pairs, and a new round of PCR is made. In the next steps the PCR amplification products are isolate and annealed until the full gene is complete.

Cloning and subcloning: The constructed gene was cloned into the PCR®-Blunt (Invitrogen) cloning vector and subcloned into the pET-30a(+) (Novagen) expression vector using the *Nde*I and *Bam*HI restriction enzyme sites. In order to confirm its identity and absence of mutations the clone was submitted to automated DNA sequencing.

Expression: *E. coli* C41(DE3) cells (Lucigen®) were transformed with pET-30a(+):bGH by electroporation. The same strain was transformed with the pET-30a(+) vector as control. A single colony of the recombinant bacteria was grown overnight in 10 mL LB medium (pre-inoculum) supplemented with kanamycin (30 µg/mL) at 37°C. An aliquot of this culture was used to inoculate 50 mL of Terrific Broth (TB) medium, final OD_{600nm} = 0.1. The culture was grown at 37 °C in a shaker at 180 rpm up to an OD_{600nm} = 0.4, followed by induction with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Samples were collected and harvested at different times after induction. The cells were disrupted, and the expression of bGH was analyzed in the soluble and insoluble fractions by a 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.

Bioreactor Cultivation

The cultivation was accomplished in a 2 L BIOSTAT B Plus bioreactor (Sartorius Stedim, Germany) equipped with two six-flat-blade turbines, and with stirrer-speed, air flow rate, temperature and pH controllers. A polarographic electrode was used to measure dissolved oxygen concentration (DOC) in the culture. A Working Cell Bank (WCB) with *E. coli* C41 (DE3) cells harboring the recombinant vector pET-30a(+):bGH was made in 40% glycerol and stored at -20°C. Pre-inoculum was prepared with 150 µL of WCB in 250 mL LB medium supplemented with kanamycin 30 µg/mL. The culture was grown overnight in shaker at 180 rpm at 37°C and used to inoculate the bioreactor at an OD_{600 nm} = 0.1, filled with 1 L of TB supplemented with kanamycin (30 µg/mL).

The cultivation was performed at 37 °C, pH 7.2 and 30% dissolved oxygen concentration (pO₂) in the batch phase, controlled by increasing the agitation speed from 400 to 1200 rpm with constant air-flow rate (1 vvm). The fed-batch phase was started in the beginning of stationary phase, indicated by consumption of the initial glycerol (carbon source) and an increase of the dissolved oxygen concentration [14]. Feeding solution (2X TB, 300 g L⁻¹ glucose, 40 mM MgSO₄ and 30 µg mL⁻¹ kanamycin) was added at a linear increasing flow rate from 0.064 ml/min to 0.65 ml/min in 27 hours. Recombinant gene expression was induced by addition of 1 mM IPTG at 12 hours of cultivation. Culture samples were taken for determination of OD_{600nm}, glucose concentration, and bGH expression. In addition, pO₂, pH, base and acid consumption, and aeration rate were measured online and recorded by an external data acquisition and control system (Sartorius Stedim, Germany).

Solubilization Of Bgh From Inclusion Bodies

Cells (6 g wet weight) were harvested by centrifugation at 24,400 x g for 30 minutes at 4 °C and resuspended in 60mL 50mM Tris-HCl pH 8.0 buffer. Cells were disrupted using a disruption system (TS Series Bench Top, Constant Systems Ltd) at 30 kpsi, the pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl /urea 4M at a pellet:buffer ratio of 1:35 (w/v), and incubated for 30 min at 4 °C. The sample were harvested and resuspended in 50 mM Tris-HCl /2M urea at pellet:buffer ratio of 1:35 (w/v) and the pH of the sample was adjusted to 12.0 for denaturation of proteins, and incubated for 45 min. For protein refolding the buffer pH was adjusted to 8.8. The sample was harvest and the soluble fraction was dialyzed against buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.8).

Purification

The purification protocol was performed using the AKTA System (GE Healthcare) at 4 °C. The sample was harvested and loaded on a HiPrep 16/10 Q XL anion exchange

chromatography column previously equilibrated with buffer A. The unbound proteins were washed out with 5 column volumes of buffer A, and bound proteins were eluted with a 15 CV linear salt gradient (0 – 300mM NaCl). Monitoring was carried out by measuring the UV absorbance at 215, 254, and 280 nm simultaneously. Eluted protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the fractions containing recombinant protein were pooled and stored at -20°C. The protein concentrations were determined by the Bradford's method [15] using bovine serum albumin as standard.

LC-MS/MS Peptide Mapping Experiments:

Protein desalting: Purified bGH samples were desalted with a reverse chromatography phase (POROS R2-50 resin, Applied Biosystems) using lab-made columns built with glass fiber in 200- μ L pipette tips. The columns were activated with methanol and were equilibrated with 0.046% TFA before loading the samples. The samples were washed twice with 0.046% TFA and eluted with 80% acetonitrile/0.046% TFA. Eluted samples were dried using a SpeedVac concentrator (Thermo Scientific, USA).

Trypsin digestion: The in-solution trypsin digestion of bGH was performed using an adapted protocol [16]. Desalted and dried samples of bGH containing 21.8 μ g of protein (1 nmol) were resuspended in 50 μ L of 0.1% (w/v) RapiGest SF acid labile surfactant (Waters Corp.) diluted in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8. The samples were heated to 99°C for 2 min, and DTT was added for a final concentration of 5 mM. After incubation at 60°C for 30 min, iodoacetamide was added to a final concentration of 15 mM and the samples were incubated for 30 min at room temperature while protected from light. Trypsin was added at a ratio of 1:100 enzyme/protein along with CaCl₂ at a final concentration of 1 mM, and the solution was incubated for 1 h at 37°C. For surfactant degradation, HCl was added at a final

concentration of 100 mM. The samples were centrifuged at 20,800 x *g* at 4°C for 10 min, and the supernatants were transferred to clean tubes.

LC-MS/MS peptide mapping experiments: Chromatographic separations of digested peptide mixtures were performed using a nanoLC Ultra system (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) equipped with a nanoLC AS-2 autosampler (Eksigent, USA). The nanoflow system was connected to a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (LTQ-XL and LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Electron Corporation, USA) containing a Finnigan™ nanospray ionization (NSI) source (Thermo Electron Corporation, USA). The separation of digested samples was performed with 15 cm capillary columns (150 μm i.d.) packed in-house with Kinetex 2.6-μm C18 core-shell particles (Phenomenex, Inc.) using a slurry packing procedure (Moritz, 2010). Spectra of the eluted peptides were acquired in positive ion mode in a data-dependent fashion. First, the instrument was set to acquire one MS survey scan for the *m/z* range of 400-2000 with a resolution of 30,000 (at *m/z* 400) followed by MS/MS spectra of the five most intense ions from each survey scan. MS/MS fragmentation was performed using collision-induced dissociation (CID) with an activation *Q* of 0.250, an activation time of 30.0 ms, 35% of normalized collision energy and an isolation width of 1.0 Da. LC-MS/MS data was compared with the theoretical MS/MS spectra obtained from *in silico* tryptic digests of the *Bos taurus* (UMD **Bos taurus**): National Center for Biotechnology Information [<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes>]. We allowed two missed cleavage sites for trypsin, a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines and oxidation on methionine residues. To reduce false identifications, we restricted our analysis to matches with a Xcorr score > 2.0 for twice-charged ions and Xcorr score > 2.5 for thrice-charged ions.

Analytical Methods

Samples were withdrawn periodically for quantitative analysis during the cultivation. Experiments were carried out in duplicate. Cell growth during cultivation was determined by measuring the optical density at 600 nm (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, United Kingdom) and calibrating it against the dry cell weight (DCW) for a specific known optical density.

One optical density unit was equivalent to 0.306 grams of dry cell weight per liter of culture medium. Glucose concentration in the medium was measured with a glucose analyzer (2700 select, Yellow Springs Instruments, USA). Acetate concentration was determined by ultra performance liquid chromatography (UltiMate 3000 Liquid Chromatography Systems, Thermo Electron Corporation, USA) with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories, USA) at 25°C using 0.005 M H₂SO₄ as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min and monitored by UV Detector at 210 nm. Recombinant protein expression (soluble and insoluble fractions) was analyzed by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide resolving gel and 4% polyacrylamide stacking gel. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. The plasmid stability was verified using the replica plating technique [17]. The protein concentration of the different fractions was analyzed by the Bradford method [15], using a commercial assay kit with bovine serum albumin standards.

Results and Discussion

Gene Construction, Cloning and Expression.

Construction of bGH coding DNA sequence (CDS) was carried out without making any modification such as replacement of rare codons. At the end of 8 construction steps a DNA fragment consistent with that expected encoding for bGH gene (approximately 580 pb) was purified from agarose gel, and cloned into the pCR-Blunt® cloning vector

and subcloned into the pET-30a(+) expression vector, using the *NdeI* and *BamHI* restriction sites. The bGH CDS was confirmed by automated DNA sequencing. *E. coli* C41(DE3) cells were transformed with the construct by electroporation and the expression was achieved with the use of IPTG for induction. The analysis by SDS-PAGE showed an intense protein band of approximately 21.80 kDa in the insoluble fraction (Fig. 1) compatible with rbGH. The protein expression was not observed in the soluble fraction. Recombinant proteins expressed as inclusion bodies in *E. coli* have been most widely used for commercial production of proteins [18]. The recovery of biologically active protein from inclusion bodies has several advantages: large amounts of highly enriched protein can be expressed as inclusion bodies; these aggregates are resistant to proteolysis by *E. coli* proteases, allowing high yield protein production; facilitate production of protein that can be toxic or lethal to the host cell, because inclusion bodies have no biological activity; and, finally, it can be isolated and purified, decreasing the downstream process [19,20]. The loss in the recovery is compensated by the very high level of expression of the desired protein [21].

Bioreactor cultivation

In batch cultivation, the biomass production was approximately 5.06 g/L (dry cell weight) at 6 h of cultivation. Before the culture entered the stationary phase, demonstrated by stabilization of biomass and increase of dissolved oxygen, the fed-batch phase was started. Aiming to maximize biomass production and bGH expression, induction was tested at 12, 18, and 24 hours of cultivation. Higher levels of bGH were detected at induction with 12 hours of growth with the obtainment of 32.4 g of biomass. Induction at 18 and 24 hours showed lower levels with the obtainment of 30.06 g and 24.48 g, respectively.

When *E. coli* is grown aerobically in the presence of excess glucose, acetate can be produced [22,23]. In concentrations above 5 g/L at pH 7.0, acetate reduces growth rate, biomass yield, and maximum attainable cell densities in HCDCs [11]. In our experiments, the maximum acetate production was approximately 0.8 g/L in 30 h of cultivation, which was not significant in any of the conditions studied. Approximately 100% of viable cells retained recombinant plasmid along 32 h of cultivation. This plasmid maintenance was verified in all conditions tested in this study. This result may be related to the use of expression vector containing the kanamycin resistance gene, since other authors reported plasmid instability probably linked to rapid ampicillin degradation in fed batch cultures [24–27]. The strategy used in this work was able to achieve $OD_{600nm} = 105$, similar to results obtained by Yoon *et al* (1994) [28] and Yoon *et al* (1996) [29], which obtained $OD_{600} = 110$ and $OD = 100$, respectively.

Solubilization Of Bgh From Inclusion Bodies

Inclusion bodies can be easily purified and these protein aggregates have also been observed as a source of relatively pure polypeptide [30], containing very little host protein, ribosomal components or DNA/RNA fragments [31,32]. Refolding of inclusion bodies proteins into bioactive forms is laborious and often requires many operational steps [21]. The strategy that we used to wash the inclusion bodies was carried out in two steps. In the first one, 4 M urea was used to solubilize contaminant *E. coli* proteins. In this step several undesirable proteins of the host cells are eliminated (Figure 1). In the second step the recombinant protein was solubilized by a shift to high alkaline pH in the presence of 2 M urea, followed by adjustment to pH 8.8. High concentration of chaotropic agents (such as 6-10 M urea) can generate random coil structure of the protein where hydrophobic amino acid stretches are exposed enhancing the propensity

of aggregation during refolding [21]. The use of alkaline pH and 2 M urea helps to prevent this protein aggregation by destabilizing both the ionic and hydrophobic interactions.

LC-MS/MS Peptide Mapping Experiments

Purified samples were desalted and digested with trypsin and were subjected to LC-MS/MS analysis. We obtained spectra that corresponded to 11 different peptides (approximately 40% of the bGH sequence), which ensured the protein's identity.

Purification

The recombinant bGH was purified to homogeneity by a protocol using a single anionic exchange chromatography column. Analysis by SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue R-250 staining showed a single band of 21.8 kDa (figure 1). The one step purification protocol is an improvement upon previous protocols that utilized multiple chromatographic steps [33,34], further this protocol does not utilize a size-exclusion column, which is not appropriate to be used in industrial processes. Approximately 2.5 mg of recombinant protein could be obtained from 1 g wet cells of *E. coli* C41 (DE3). The yield obtained in this study is higher than the one reported by other authors. For example, Wingfield et al (1987) was able to obtain 1.88 mg of purified protein per cell gram [33] employing two chromatographic steps. When considering protein yield, we obtained 340 mg/L of the homogenous bGH, whereas Choi et al (1998) obtained 30 mg/L [34]. We believe the higher levels achieved by our strategy are due to the reduced number of solubilization steps and non-use of high concentrations of chaotropic agents, besides the use of only one chromatographic step for recombinant protein purification. On large-scale (as industrial scale), reducing the number of purification steps is practical and economical because each purification step not only

adds to the cost of the final product but also causes successive yield losses of the recombinant protein [35].

Conclusions

In this report, we present the gene synthesis, cloning, expression and purification of bGH. Using fed-batch cultures strategies we were able to achieve high yields of biomass and productivity of recombinant bGH. In addition, the protein purification protocol by liquid chromatography using a single chromatographic step may be a valuable and cost-effective approach to large scale production. The data presented here may be of interest to biopharmaceutical companies interested in developing biosimilars, which offer a great opportunity to scientific, economical and industrial growth.

Acknowledgments:

Financial support for this work was provided by Quatro G P & D.

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

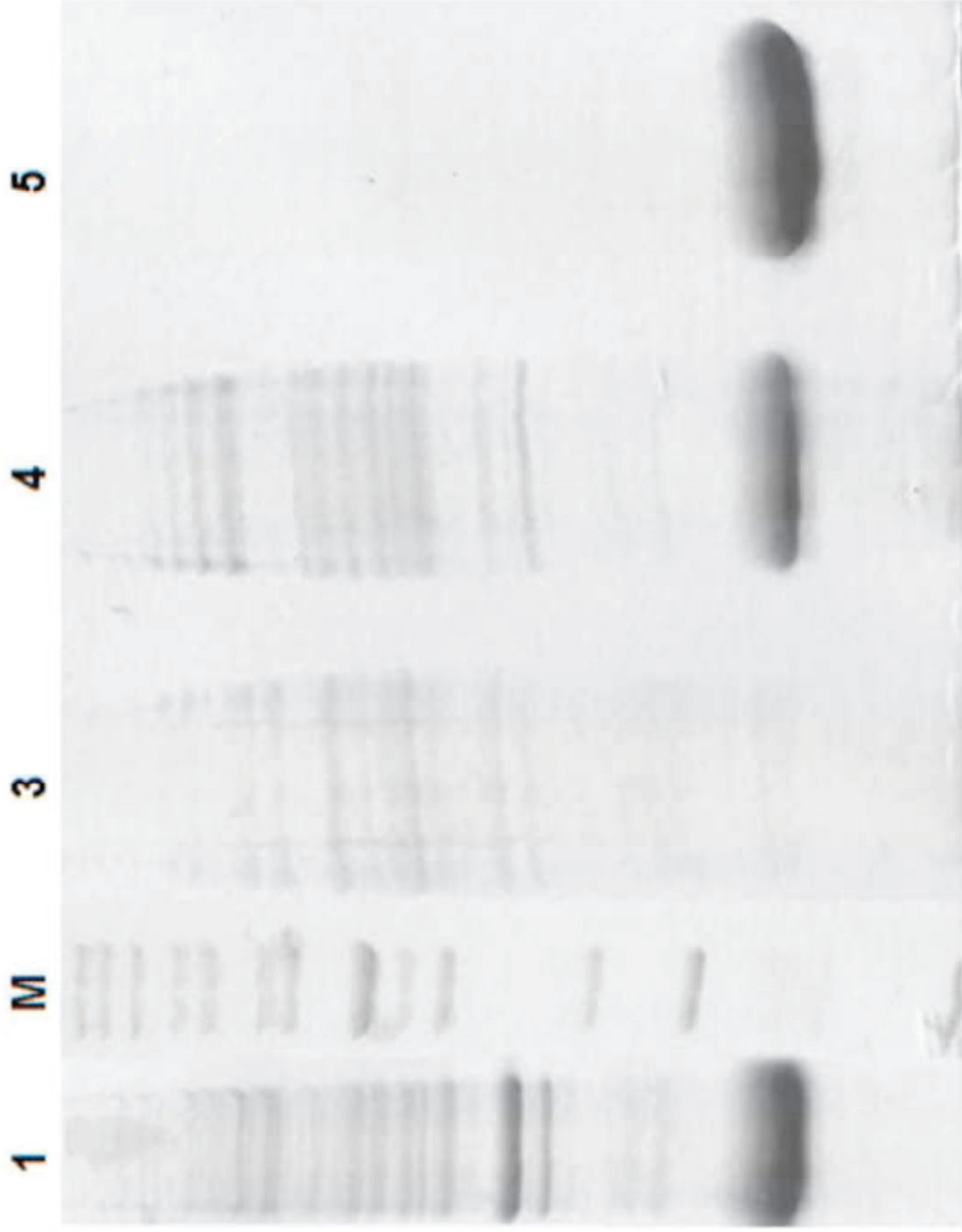
References

- [1] E.P. Cunningham, The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems¹, *Livestock Production Science*. 58 (1999) 1–24.
- [2] J.. ROCHE, J.. QUIRQUE, Hormonal control of growth in beef cattle, *Beef Cattle Production*. (1992) p.151–167.
- [3] M.L. Hartman, J.D. Veldhuis, M.O. Thorner, Normal control of growth hormone secretion, *Horm. Res*. 40 (1993) 37–47.

- [4] C. Secchi, V. Borromeo, Structure and function of bovine growth hormone. Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 688 (1997) 161–177.
- [5] G.J. Asimov, N.K. Krouze, The Lactogenic Preparations from the Anterior Pituitary and the Increase of Milk Yield in Cows, *J. Dairy Sci.* 20 (1937) 289–306.
- [6] S.A. Asdell, The Effect of the Injection of Hypophyseal Extract in Advanced Lactation, *Am J Physiol.* 100 (1932) 137–140.
- [7] D.E. Bauman, Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology, *J. Dairy Sci.* 75 (1992) 3432–3451.
- [8] D.E. Bauman, Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application, *Domest. Anim. Endocrinol.* 17 (1999) 101–116.
- [9] L.J. Machlin, Effect of Growth Hormone on Milk Production and Feed Utilization in Dairy Cows, *Journal of Dairy Science.* 56 (1973) 575–580.
- [10] P.J. Eppard, D.E. Bauman, C.R. Curtis, H.N. Erb, G.M. Lanza, M.J. DeGeeter, Effect of 188-Day Treatment with Somatotropin on Health and Reproductive Performance of Lactating Dairy Cows, *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 582–591.
- [11] S.Y. Lee, High cell-density culture of *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol.* 14 (1996) 98–105.
- [12] B.S. Kim, S.C. Lee, S.Y. Lee, Y.K. Chang, H.N. Chang, High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat, *Bioprocess Biosyst Eng.* 26 (2004) 147–150.
- [13] D.S. Santos, J.M. Chies., L.A. Basso, G. Renard, I.O. Fonseca, Method for the obtention of chimeric nucleotide sequence and chimeric nucleodite sequence, U.S. Patent 2007/068068 A2, n.d.
- [14] D.J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E.A. Sanders, W.D. Deckwer, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 39 (1995) 59–65.
- [15] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [16] A.A. Klammer, M.J. MacCoss, Effects of Modified Digestion Schemes on the Identification of Proteins from Complex Mixtures, *J Proteome Res.* 5 (2006) 695–700.
- [17] J. Lederberg, E.M. Lederberg, REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS, *J Bacteriol.* 63 (1952) 399–406.
- [18] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks—2003, *Nature Biotechnology.* 21 (2003) 865–870.
- [19] J.H. Choi, K.C. Keum, S.Y. Lee, Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*, *Chemical Engineering Science.* 61 (2006) 876–885.

- [20] E.D. Clark, Protein refolding for industrial processes, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 202–207.
- [21] S.M. Singh, A.K. Panda, Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *J. Biosci. Bioeng.* 99 (2005) 303–310.
- [22] H. Holms, Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Rev.* 19 (1996) 85–116.
- [23] A. Varma, B.W. Boesch, B.O. Palsson, Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates., *Appl Environ Microbiol.* 59 (1993) 2465–2473.
- [24] B.D. Ensley, Stability of Recombinant Plasmids in Industrial Microorganisms, *Critical Reviews in Biotechnology.* 4 (1986) 263–277.
- [25] K. Friehs, Plasmid copy number and plasmid stability, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 86 (2004) 47–82.
- [26] H.P. Sørensen, K.K. Mortensen, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 115 (2005) 113–128.
- [27] L. Yee, H.W. Blanch, Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *Biotechnology (N.Y.)*. 10 (1992) 1550–1556.
- [28] S.K. Yoon, W.K. Kang, T.H. Park, Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate, *Biotechnol. Bioeng.* 43 (1994) 995–999.
- [29] S.K. Yoon, W.K. Kang, T.H. Park, Regulation of trp promoter for production of bovine somatotropin in recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 81 (1996) 153–157.
- [30] A. Villaverde, M.M. Carrió, Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1385–1395.
- [31] P. Valax, G. Georgiou, Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition, *Biotechnol. Prog.* 9 (1993) 539–547.
- [32] U. Rinas, J.E. Bailey, Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 37 (1992) 609–614.
- [33] P.T. Wingfield, P. Graber, G. Buell, K. Rose, M.G. Simona, B.D. Burleigh, Preparation and characterization of bovine growth hormones produced in recombinant *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 243 (1987) 829–839.
- [34] J.W. Choi, S.I. Kim, S.Y. Lee, Purification and characterization of recombinant bovine growth hormone produced in *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters.* 20 (1998) 269–273.
- [35] A. Vanz, G. Renard, M. Palma, J. Chies, S. Dalmora, L. Basso, et al., Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization, *Microbial Cell Factories.* 7 (2008) 13.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)



Appendices

Figure 1.

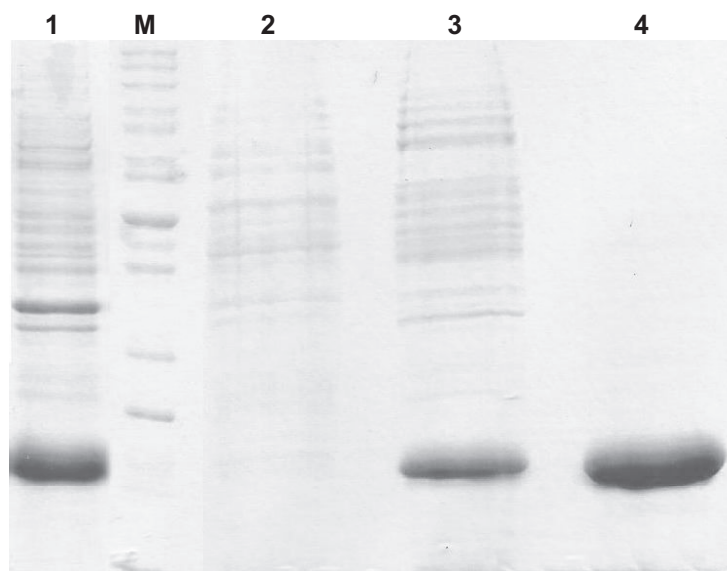


Figure 1: Analysis of recombinant bGH protein expression and purification by SDS-PAGE (12%). Lane 1 corresponds to insoluble fraction after cell disruption. M corresponds to molecular weight marker Page Ruler (Fermentas). Lane 2 corresponds to soluble fraction after washing of inclusion bodies with 4M urea. Lane 3 corresponds to sample loaded on HiPrep 16/10 Q XL column. Lane 4 corresponds to pooled fractions eluted from HiPrep 16/10 Q XL column (purified protein).

5. CARTA DE SUBMISSÃO

Recombinant Bovine Growth Hormone
production in High cell-density culture of E. coli

Manuscrito foi submetido ao periódico Protein
Expression and Purification em 15/07/2013.



Rafael Munareto <rafamn7@gmail.com>

Protein Expression and Purification: Submission Confirmation

PEP (ELS) <pep@elsevier.com>
Para: rafamn7@gmail.com

15 de julho de 2013 19:37

Title: Recombinant Bovine Growth Hormone Production In High Cell-Density Culture Of E. Coli
Corresponding Author: Mr. Rafael Munareto Nascimento
Authors: Gaby Remard, PhD; Natasha Kuniechick, MSc; José E Sacconi Nunes, MSc; Jocelei M Chies, PhD; Luiz A Basso, PhD; Diógenes Santiago Santos, PhD

Dear Mr. Nascimento,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Protein Expression and Purification.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Protein Expression and Purification as an author:

<http://ees.elsevier.com/prep/>

Your username is: rmn

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/prep/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89

Thank you for submitting your manuscript to Protein Expression and Purification. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Susan Ikeda
Journal Manager
Protein Expression and Purification
Elsevier
E-mail: pep@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Normalmente, os genes que codificam proteínas são obtidos de cDNA de células que estão em bancos de células nos países desenvolvidos, como por exemplo a American Type Cell Collection (ATCC) dos Estados Unidos. As células podem ser adquiridas mediante a assinatura de um termo de confidencialidade (*non disclosure agreement*) que assegura que as mesmas não poderão ser usadas para fins comerciais e sim para pesquisa científica. Para superar esta barreira impeditiva foi desenvolvida uma tecnologia [24] para síntese de genes codificadores de biofármacos. Utilizando esta técnica o gene que codifica o bGH foi construído e ao final das 8 etapas de construção um fragmento com aproximadamente 580 pb foi purificado a partir da eletroforese em gel de agarose 2%. O fragmento foi clonado no vetor pCR®-Blunt e em seguida subclonado no vetor de expressão pET 30a(+). A liberação de um fragmento de aproximadamente 580 pb após clivagem do DNA plasmidial recombinante com as endonucleases de restrição *NdeI* e *BamHI* confirmaram a subclonagem do inserto no pET 30a(+). A identidade do gene do bGH foi confirmada por sequenciamento automático da construção que mostrou a ausência de mutações. A expressão da proteína recombinante foi testada em diferentes cepas de *E. coli* [como BL21 (DE3), C43 (DE3), Rosetta-gami2 (DE3), C41 (DE3), Rosetta (DE3), C41 (DE3)Lys, C43 (DE3)Lys, BL21 Star (DE3), BL21 (DE3)pLys e BL21 NH (DE3)]. O bGH foi expresso na fração insolúvel das cepas Rosetta-gami2 (DE3); C41 (DE3); Rosetta (DE3); BL21 (DE3) quando induzidas com 1mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Como não houve expressão do bGH na fração solúvel optamos pela solubilização da proteína a partir dos corpos de inclusão. A expressão da proteína na forma insolúvel teve um melhor rendimento quando a cepa C41 (DE3) foi utilizada, quando comparada com outras cepas testadas (dados não-mostrados). Com o objetivo de se obter uma alta densidade celular os cultivos foram realizados em biorreator. Neste, foram testadas diferentes estratégias de alimentação do cultivo. Inicialmente foram testadas as estratégias pH stat e DO-stat, obtendo-se respectivamente 14,5 g e 18,4 g de biomassa. Com o objetivo de melhorar o rendimento

celular optamos por testar a estratégia de alimentação linear ascendente com fluxo de 0,064 ml/min a 0,65 ml/min em 27 horas, o qual obteve o rendimento de 21,2 g na biomassa. Após a análise dos dados obtidos pudemos observar que o passo limitante para o crescimento das células era a falta de oxigênio no meio de cultivo. Para melhorar a suplementação de oxigênio do cultivo, a agitação deste foi fixada em 1.200 rpm. Nesta condição a biomassa máxima obtida foi de 32,4 g. Para determinar o melhor momento de indução foram avaliadas a expressão da proteína recombinante e a produção de biomassa. A expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG em diferentes tempos (12, 18 e 24 horas) de cultivo. A melhor condição de expressão foi obtida com a indução em 12 horas com biomassa de 32,4 g. A indução do cultivo com 18 e 24 apresentou níveis baixos de expressão do bGH, com respectiva biomassa de 30,06 g e 24,48 g. A estratégia utilizada neste trabalho foi capaz de atingir $OD_{600} = 105$, resultado similar ao obtido por Yoon *et al* (1994) [25] e Yoon *et al* (1996) [26] que alcançaram $OD_{600} = 100$ e $OD_{600} = 110$, respectivamente.

A concentração máxima de acetato medida nos cultivos foi de 0,8 g/L, portanto a produção de acetato não foi significativa em nenhuma das condições testadas. A literatura preconiza que concentrações superiores a 5 g/L em pH 7,0 reduzem a taxa de crescimento e a produção de biomassa em cultivos de alta densidade [16]. Durante as 32 horas de cultivo a estabilidade plasmidial manteve-se em 100%. Este resultado está relacionado ao uso de vetores com o gene de resistência a canamicina como marca de seleção, diferente de vetores com gene de resistência a ampicilina, que podem apresentar instabilidade plasmidial associada à rápida degradação da ampicilina em cultivos [27–30].

Proteínas recombinantes expressadas na forma de corpos de inclusão são amplamente utilizadas comercialmente [31]. Para que as proteínas expressas em corpos de inclusão apresentem atividade biológica é necessária a solubilização e o *refolding* das proteínas insolúveis. Este processo pode apresentar algumas dificuldades e frequentemente são necessários protocolos de solubilização com várias etapas. A perda de proteína inerente ao processo de solubilização pode ser compensada pela alta quantidade de proteína expressa

[32]. No entanto, a expressão de proteínas recombinantes na forma de corpos de inclusão pode ser favorável, já que estes podem se acumular no citoplasma em altos níveis, muitas vezes ultrapassando 30% do total de proteínas expressas pela célula. Por não possuírem atividade biológica, facilitam a produção de proteínas tóxicas para a bactéria e são, na maior parte, protegidos de degradação por proteases celulares [33,34]. Para solubilizar o bGH expressado em C41 (DE3), foram testados diferentes agentes desnaturantes, como: ureia nas concentrações de 2 M, 4 M em pH 8,0 e 2M em pH alcalino; cloreto de guanidina nas concentrações de 2 M, 4 M e 6 M. Como as amostras tratadas com cloreto de guanidina precipitaram durante a diálise, foi utilizada a solubilização com ureia. O tratamento com ureia foi capaz de solubilizar a proteína de interesse na concentração de 2 M em pH alcalino. Durante os testes de solubilização foi observado que proteínas da célula hospedeira foram solubilizadas com 4 M de ureia pH 8,0. Então foi introduzido um pré-tratamento com ureia 4 M para eliminar essas proteínas indesejadas. Posteriormente a solubilização do rbGH foi realizada com ureia 2M em pH alcalino. A utilização de agentes caotrópicos em alta concentração (como ureia 6 – 10M) gera o dobramento desordenado da estrutura secundária da proteína expondo a porção hidrofóbica [32], diminuindo assim o rendimento final do protocolo de solubilização. A utilização de ureia 2M e pH alcalino para solubilizar os corpos de inclusão previne a formação de agregados durante o *refolding*.

O protocolo de purificação desenvolvido em nosso laboratório permite a obtenção da proteína homogênea utilizando apenas uma coluna de troca iônica, mostrando-se vantajoso e mais rentável quando comparado a outros protocolos já descritos [35,36]. Este protocolo também não utiliza a etapa de cromatografia por exclusão por tamanho, a qual não é viável industrialmente. Aproximadamente 2,5 mg de proteína homogênea foram obtidos a partir de 1g de célula. O rendimento de proteína homogênea demonstrado neste protocolo é maior do que os descritos na literatura. O trabalho descrito por Wingfield *et al* (1987) produziu 1,88 mg a partir de 1 g de *E. coli* [35]. Choi *et al* (1998) desenvolveram um protocolo que obteve 30 mg de proteína homogênea a partir de 1 litro de cultura celular de *E. coli*, enquanto que

em nosso trabalho o rendimento a partir de 1 L de cultura de *E. coli* foi de 340 mg [36]. Acreditamos que fatores que contribuem para este resultado são: quantidade reduzida de etapas de solubilização; solubilização com ureia 2M em pH alcalino e a purificação realizada com apenas uma coluna cromatográfica. É importante ressaltar que um protocolo de solubilização e purificação com baixa quantidade de passos é economicamente interessante para a produção de proteínas recombinantes em larga escala com finalidade comercial, uma vez que cada passo adicional gera maior custo de produção e diminui o rendimento final.

7. PERSPECTIVAS

Estudos para determinar a atividade do hormônio bovino recombinante em conjunto com os ensaios biofísicos para detectar degradação química, dímeros, monômeros, sulfóxidos e desaminados serão os próximos objetivos deste trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Cunningham EP. The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems1. *Livestock Production Science*. 1999 Mar 1;58(1):1–24.
- [2] ROCHE J., QUIRQUE J. Hormonal control of growth in beef cattle. *Beef cattle production*. 1992;:p.151–167.
- [3] Cronjé P, Boomker EA. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction*. CABI; 2000.
- [4] Gatford KL, Egan AR, Clarke IJ, Owens PC. Sexual Dimorphism of the Somatotrophic Axis. *J Endocrinol*. 1998 Jun 1;157(3):373–389.
- [5] Secchi C, Borrromeo V. Structure and function of bovine growth hormone. Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1997 Jan 24;688(2):161–177.
- [6] Mattos W. Somatotropina bovina e suas implicações nos processos de secreção do leite. *SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*. 1990;FEALQ:49 – 63.
- [7] Bauman DE. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol*. 1999 Oct;17(2-3):101–116.
- [8] Burton JL, McBride BW, Block E, Glimm DR, Kennelly JJ. A review of bovine growth hormone. *Canadian journal of animal science*. 1994 Fevereiro;74(2):167–201.
- [9] Bauman DE. Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology. *J. Dairy Sci*. 1992 Dezembro;75(12):3432–3451.
- [10] Eppard PJ, Bauman DE, Curtis CR, Erb HN, Lanza GM, DeGeeter MJ. Effect of 188-Day Treatment with Somatotropin on Health and Reproductive Performance of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci*. 1987 Mar 1;70(3):582–591.
- [11] Judge LJ, Erskine RJ, Bartlett PC. Recombinant bovine somatotropin and clinical mastitis: incidence, discarded milk following therapy, and culling. *J. Dairy Sci*. 1997 Dec;80(12):3212–3218.
- [12] Bauman DE, Eppard PJ, DeGeeter MJ, Lanza GM. Responses of High-Producing Dairy Cows to Long-Term Treatment with Pituitary Somatotropin and Recombinant Somatotropin. *J. Dairy Sci*. 1985 Jun 1;68(6):1352–1362.
- [13] Juskevich J, Guyer C. Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science*. 1990 Agosto;249(4971):875–884.
- [14] Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density--A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*. 2005 Jul;23(5):345–357.
- [15] Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robotjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N. Over-production of human interferon-[gamma] by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 2007 Jan;42(1):112–117.

- [16] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1996 Mar;14(3):98–105.
- [17] Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 1995 Feb 21;39(1):59–65.
- [18] Kleman GL, Chalmers JJ, Luli GW, Strohl WR. A predictive and feedback control algorithm maintains a constant glucose concentration in fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Apr;57(4):910–917.
- [19] Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang YK, Chang HN. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2004 Apr;26(3):147–150.
- [20] IBGE/Censo Agropecuário e Pesquisa da Pecuária Municipal. Efetivo bovino, vacas ordenhadas e produção de leite no Brasil, 1975 a 2010 (Tabela 02.32) [Internet]. 2013 Feb 26 [cited 2013 Feb 26]; Available from: <http://www.cnppl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0232.php>
- [21] País deve manter crescimento de 3% na produção de leite em 2013 [Internet]. 2013 Feb 26 [cited 2013 Feb 26]; Available from: <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI331911-18530,00-PAIS+DEVE+MANTER+CRESCIMENTO+DE+NA+PRODUCAO+DE+LEITE+EM.html>
- [22] FAO/Faostat. Principais países produtores de leite no mundo - 2010 (Tabela 02.12) [Internet]. Embrapa Gado de Leite. [cited 2013 Feb 26]; Available from: <http://www.cnppl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>
- [23] FAO/Faostat. Produtividade animal em países selecionados - 2010. (Tabela 02.19) [Internet]. Embrapa Gado de Leite. [cited 2013 Feb 26]; Available from: <http://www.cnppl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0219.php>
- [24] Santos DS, Chies, JM, Basso LA, Renard G, Fonseca IO. Method for the obtention of chimeric nucleotide sequence and chimeric nucleodite sequence.
- [25] Yoon SK, Kwon SH, Park MG, Kang WK, Park TH. Optimization of recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation for bovine somatotropin. *Biotechnol Lett.* 1994 Nov 1;16(11):1119–1124.
- [26] Yoon SK, Kang WK, Park TH. Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 1994 Apr 25;43(10):995–999.
- [27] Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.).* 1992 Dec;10(12):1550–1556.
- [28] Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2005 Jan 26;115(2):113–128.

- [29] Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004;86:47–82.
- [30] Ensley BD. Stability of Recombinant Plasmids in Industrial Microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology.* 1986 Jan;4(3):263–277.
- [31] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks—2003. *Nature Biotechnology.* 2003;21(8):865–870.
- [32] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005 Apr;99(4):303–310.
- [33] Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science.* 2006 Feb;61(3):876–885.
- [34] Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001 Apr;12(2):202–207.
- [35] Wingfield PT, Graber P, Buell G, Rose K, Simona MG, Burleigh BD. Preparation and characterization of bovine growth hormones produced in recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 1987 May 1;243(3):829–839.
- [36] Choi JW, Kim SI, Lee SY. Purification and characterization of recombinant bovine growth hormone produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters.* 1998 Mar 1;20(3):269–273.