

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CAMPUS SOROCABA

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

MAYSA DE SOUZA CAVALCANTE

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ZZ-AMYLUC E SUA OTIMIZAÇÃO PARA
IMUNOENSAIOS

SOROCABA – SP

2024

MAYSA DE SOUZA CAVALCANTE

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ZZ-AMYLUC E SUA OTIMIZAÇÃO PARA
IMUNOENSAIOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Dr. Vadim R. Viviani

Co-orientação: Dra. Jaqueline R. Silva

Sorocaba – SP

2024

Cavalcante, Maysa de Souza

Caracterização da proteína de fusão ZZ-AmyLuc e sua
otimização para imunoenaios / Maysa de Souza
Cavalcante -- 2024.
60f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Vadim R. Viviani

Banca Examinadora: Karina Martins, Alexandre D. M.
Cavagis

Bibliografia

1. Bioluminescência. 2. Imunoenaios. 3. Proteína de
Fusão. I. Cavalcante, Maysa de Souza. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

Folha de aprovação

Maysa de Souza Cavalcante

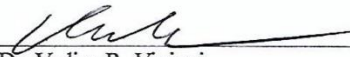
“Caracterização da Proteína de Fusão ZZ-Amy Luc e sua otimização para
imunoensaios”

Trabalho de Conclusão de Curso

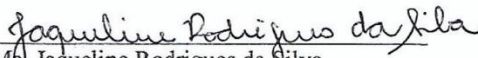
Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba

Sorocaba, 01 de fevereiro de 2024.

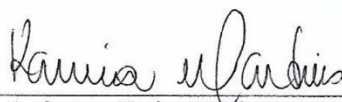
Orientador


Prof. Dr. Vadim R. Viviani


Coorientadora


M^{te} Jaqueline Rodrigues da Silva

Membro 1


Profa. Dra. Karina Martins

Membro 2


Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio dos processos 2010/05426-8, 2022/04800-0 e 2022/14071-6.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Deise Ricardo e Marcelo Cavalcante, por todo apoio e incentivo durante a minha trajetória;

Aos meus irmãos, Mayra, Murilo e Paulo Cavalcante pelo companheirismo;

Aos meus avós Maria e Lázaro de Souza também pelo apoio e incentivo;

Ao meu orientador Prof. Vadim Viviani pela oportunidade, orientação, confiança e contribuição para minha formação profissional e pessoal;

À minha co-orientadora Dra. Jaqueline Silva por todos os ensinamentos, paciência e cuidado;

A todo o grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica, Biologia Molecular e Tecnologias de Sistemas Bioluminescentes por ser extremamente dedicado, coeso e acolhedor;

À minha amiga Mirella Franco pelo companheirismo, suporte e amizade;

À todas as minhas amigas companheiras de turma que colaboraram diretamente para minha formação e tornaram essa etapa mais leve e descontraída;

Aos meus amigos de Barão Geraldo pelo amparo, apoio e incentivo durante essa etapa;

A todos os professores da UFSCar-Sorocaba pelos ensinamentos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e intelectual ao longo da minha Iniciação Científica.

RESUMO

Os imunoenaios possuem vasta utilização em análises biomédicas baseadas na interação antígeno-anticorpo, na qual são capazes de detectar anticorpos contra antígenos específicos. De maneira geral, os ensaios comerciais mais sensíveis utilizam, principalmente, a quimioluminescência como método de detecção. No entanto, os métodos atuais de quimioluminescência baseados na enzima peroxidase de rabanete (HRP) conjugado com anticorpo-secundário e luminol apresentam um decaimento rápido da luminescência. Dessa maneira, a nova proteína de fusão, ZZ-AmyLuc, construída a partir da luciferase do vagalume *Amydetes vivianii* fusionada à porção ZZ da proteína A (VIVIANI et al., 2021), se mostrou uma boa alternativa. Essa proteína apresenta um brilho verde-azulado mais forte, com maior atividade bioluminescente, além de ser muito termoestável e apresentar emissão mais sustentada, capaz de durar vários minutos ($t_{1/2} > 30$ min). Além disso, ela foi notadamente capaz de detectar imunoglobulinas do tipo G (IgG), inclusive a anti-nucleoproteína do vírus SARS-CoV-2 e seu respectivo antígeno. A detecção pôde ser observada em câmeras de fotodetecção (CCD) e até mesmo por câmeras comuns de smartphone, sustentando a sua elevada eficiência tanto em imunoenaios quanto em técnicas de *Western Blotting*. No entanto, uma caracterização físico-química mais detalhada da ZZ-AmyLuc, ainda não havia sido realizada, sendo necessárias a sua estabilização *in vitro* e otimização da sensibilidade do ensaio de detecção para uso em imunoenaios bioluminescentes, particularmente para a detecção da nucleoproteína do SARS-CoV-2. Para tanto, foram determinadas as propriedades cinéticas, a saber os K_{MS} para o ATP e para a D-luciferina, o pH ótimo de atividade bioluminescente e de ligação à IgG, termoestabilidade a 4 °C, -20 °C e 37 °C, assim como a otimização da sensibilidade de ensaio de detecção fotométrica em imunoenaios.

Palavras-chave: *Amydetes vivianii*, Bioluminescência; Domínio ZZ; Luciferase.

ABSTRACT

Immunoassays are widely used in biomedical analysis based on antigen-antibody interaction, in which they are capable of detecting antibodies against specific antigens. In general, the most sensitive commercial assays mainly use chemiluminescence as a detection method. However, current chemiluminescence methods based on the enzyme *horseradish* peroxidase (HRP) conjugated with secondary antibody and luminol show a rapid decay of luminescence. Thus, the new fusion protein, ZZ-AmyLuc, built from the luciferase of the firefly *Amydetes vivianii* fused to the ZZ portion of protein A (VIVIANI et al., 2021), proved to be a good alternative. This protein has a stronger blue-green glow, with greater bioluminescent activity, in addition to being very thermostable and presenting more sustained emission, capable of lasting several minutes ($t_{1/2} > 30$ min). Furthermore, it was notably capable of detecting type G immunoglobulins (IgG), including the anti-nucleoprotein of the SARS-CoV-2 virus and its respective antigen. The detection could be observed using photodetection cameras (CCD) and even common smartphone cameras, supporting its high efficiency in both immunoassays and *Western Blotting* techniques. However, a more detailed physicochemical characterization of ZZ-AmyLuc had not yet been carried out, requiring its *in vitro* stabilization and optimization of the sensitivity of the detection assay for use in bioluminescent immunoassays, particularly for the detection of the SARS-CoV-2 nucleoprotein. For that, the kinetic properties were determined, namely the K_M s for ATP and D-luciferin, the optimal pH for bioluminescent activity and IgG binding, thermostability at 4 °C, -20° C and 37 °C, as well as the optimization of the sensitivity of photometric detection assay in immunoassays.

Keywords: *Amydetes vivianii*, Bioluminescence; Luciferase; ZZ-domain

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da reação de emissão de luz através da bioluminescência em vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003.....	15
Figura 2 - (A) Ensaio de ATP comparando a eficiência de emissão de sinal bioluminescente entre a luciferase do <i>Amydetes vivianii</i> e a luciferase comercial do <i>Photinus Pyralis</i> . Extraído de PELENTIR et al., 2019. (B) Quantificação de ATP intracelular de amostras biológicas com concentrações padrão de ATP em corpo gorduroso de larvas de <i>Zophobas morio</i> e em lisado de bactérias; no painel superior a imagem foi obtida por câmera de <i>smartphone</i> enquanto a imagem inferior foi obtida por câmera de fotodeteção (CCD). Extraído de: BEVILAQUA et al., 2022.....	18
Figura 3 - ensaio para detecção de cádmio utilizando a luciferase do <i>Amydetes vivianii</i> ; a imagem foi obtida por câmera de um <i>smartphone</i> Samsung Galaxy S10. Extraído de: VIVIANI et al., 2022.....	18
Figura 4 - Esquema de construção do DNA da ZZ-AmyLuc dentro do vetor pCold II (Takara, Japão) e obtenção da proteína de fusão. Adaptado de VIVIANI et al., 2021.....	22
Figura 5 - Esquema do imunoensaio bioluminescente utilizando a ZZ-AmyLuc. No primeiro passo a anti-nucleoproteína (anti-NP) reconhece e se liga ao seu antígeno específico, a nucleoproteína (NP) do SARS-CoV-2. No segundo passo, a ZZ-AmyLuc reconhece a porção Fc do anticorpo primário (anti-NP). Por fim, na presença de luciferina e ATP, ocorre a emissão de luz.....	23
Figura 6 - (A) Efeito da concentração de ATP na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk do efeito de ATP na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (C) Efeito da concentração de luciferina na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (D) Gráfico de Lineweaver-Burk do efeito de luciferina na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc.....	33
Figura 7 - Estrutura química da D-luciferina (substrato) e oxiluciferina (produto) da reação bioluminescente de vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003.....	34
Figura 8 - Efeito do pH na atividade luciferásica da ZZ-AmyLuc.....	35
Figura 9 - Espectro de bioluminescência da ZZ-AmyLuc (A) e da wtAmy (B) em diferentes pHs. A figura B foi extraída de PELENTIR et al., 2019.....	36

Figura 10 - Termoestabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 4 °C e -20 °, na ausência e na presença de 20% de glicerol durante 90 dias.....	38
Figura 11 - Termoestabilidade da ZZ-AmyLuc (linha preta) e da wtAmy (linha cinza) incubadas a 37 °C durante 48 horas. Os dados da termoestabilidade da wtAmy foram extraídos de PELENTIR et al., 2019.....	39
Figura 12 - Termoestabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 37 °C durante 48 horas em condições padrão (1 mM de EDTA) do tampão de diálise (linha preta); dialisada e diluída em tampão de diálise com 0,5 mM de EDTA (linha tracejada); e dialisada e diluída em tampão de diálise com 2 mM de EDTA (linha cinza).....	40
Figura 13 - Termoestabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 37 °C durante 48 horas em condições padrão (10 mM de NaCl) do tampão de diálise (linha preta); dialisada e diluída em tampão de diálise com 5 mM de NaCl (linha tracejada); dialisada e diluída em tampão de diálise com 15 mM de NaCl (linha cinza); e dialisada em tampão de diálise com a ausência de NaCl (linha pontilhada).....	41
Figura 14 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diferentes diluições (1/200-1/5000) e sua solução de ensaio: (A) após 1 minuto de exposição com concentrações de nucleoproteína variando de 10 a 100 ng; (B) depois de 5 minutos de exposição com concentrações de nucleoproteína variando de 1 a 10 ng.....	43
Figura 15 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 10 a 0,01 ng de antígeno: (A) após 1 minuto de exposição; (B) depois de 5 minutos de exposição.....	44
Figura 16 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 1 a 0,1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoenaios foram realizados com tampão PBS-T nos pHs 7,0 e 8,0.....	45
Figura 17 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 1 a 0,1 ng	

de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoenaios foram realizados com tampão PBS-T contendo 50 mM e 150 mM de NaCl.....46

Figura 18 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 1 a 0,1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoenaios foram realizados com períodos de incubação da ZZ-AmyLuc de 20 e 40 minutos.....46

Figura 19 - Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,1 a 1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. O imunoenasiao foi realizado com a ZZ-AmyLuc dialisada em tampão de diálise contendo 5 mM de NaCl.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades cinéticas e físico-químicas da ZZ-AmyLuc e da wtAmy.....	42
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. LUCIFERASES E SUAS APLICAÇÕES.....	15
1.1.1. Luciferase do Vagalume <i>Amydetes vivianii</i>	16
1.2. IMUNOENSAIOS BIOLUMINESCENTES	19
1.3. PROTEÍNA A DE <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.4. PROTEÍNA DE FUSÃO ZZ-AMYLUC.....	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	26
4.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ZZ-AMYLUC	26
4.3. MEDIDAS DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE <i>IN VIVO</i>	26
4.4. EXTRAÇÃO DA ZZ-AMYLUC	27
4.5. PURIFICAÇÃO DA ZZ-AMYLUC POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM MATRIZ DE NÍQUEL.....	27
4.6. MEDIDAS DE ATIVIDADE DA ZZ-AMYLUC <i>IN VITRO</i>	28
4.7. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO-QUÍMICA DA ENZIMA ZZ-AMYLUC	28
4.7.1. Determinação do K_M para ATP e Luciferina	28
4.7.2. Determinação do pH Ótimo	28
4.7.3. Espectros de Bioluminescência	29
4.7.4. Termoestabilidade.....	29
4.7.4.1. 4°C.....	29
4.7.4.2. -20 °C	29
4.7.4.3. 37 °C.....	30
4.7.5. Efeito de aditivos na Atividade Luminescente da Proteína de Fusão	30
4.8. OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS E ANTÍGENOS COM ZZ-AMYLUC	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. K_M PARA ATP E LUCIFERINA	32
5.2. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO.....	34

5.3. ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA	35
5.4. TERMOESTABILIDADE.....	37
5.4.1. 4 °C.....	37
5.4.2. -20 °C	38
5.4.3. 37 °C.....	38
5.4.4. Efeito de aditivos na Estabilidade da Proteína.....	39
5.5. OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS E ANTÍGENOS COM ZZ-AMYLUC	42
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A bioluminescência é a emissão de luz visível pelos organismos vivos e pode ser observada em uma gama de grupos taxonômicos, do mais simples ao mais complexo, abrangendo espécies de bactérias, insetos e alguns vertebrados (HASTINGS, 1983). A luz emitida pelos organismos vivos pode assumir diferentes funções a depender da espécie, como defesa, camuflagem, dispersão, sinal de alarme, atração sexual e de presas (HASTINGS, 2001; ABRAHAMS e TOWNSEND, 1993).

Conceitualmente, a bioluminescência é um tipo de quimioluminescência que exerce um papel biologicamente funcional e não depende de temperatura ou absorção de luz pelo organismo. A reação bioluminescente é catalisada por enzimas denominadas luciferases que oxidam um composto chamado de luciferina (LH_2). Esses termos são utilizados de forma genérica e não representam a identidade química e molecular, uma vez que os taxa podem apresentar diferentes estruturas moleculares de luciferinas e luciferases (HASTINGS, 1983). Nesse processo ocorre uma reação de oxidação altamente exergônica da luciferina sendo a energia liberada preferencialmente na forma de luz. Neste processo de oxidação são gerados peróxidos cíclicos, cuja clivagem térmica (intermediários) gera produtos carbonílicos no estado eletronicamente excitado singlete que decaem emitindo luz visível (WILSON, 1995).

Dentre os organismos terrestres, a bioluminescência está presente de forma mais abundante nos insetos, sobretudo nos coleópteros da superfamília Elateroidea, representada pelas principais famílias de vagalumes. A reação bioluminescente é compartilhada por esses besouros e apresentam substrato idêntico (luciferina benzotiazólica) e enzimas luciferases homólogas com 543-550 resíduos de aminoácidos (WOOD et al., 1989; VIVIANI, et al. 2002). A reação de emissão de luz pelos vagalumes ocorre por meio de duas reações (Fig. 1). Na primeira reação, a enzima luciferase desempenha função de adenil-transferase catalisando a transformação da luciferina no intermediário adenil-luciferina com a utilização de ATP e magnésio. Na segunda reação, a adenil-luciferina reage com oxigênio resultando em dióxido de carbono, pirofosfato e oxiluciferina eletronicamente excitada que decai emitindo luz (McELROY e DeLUCA, 1978; BRANCHINI et al., 2003).

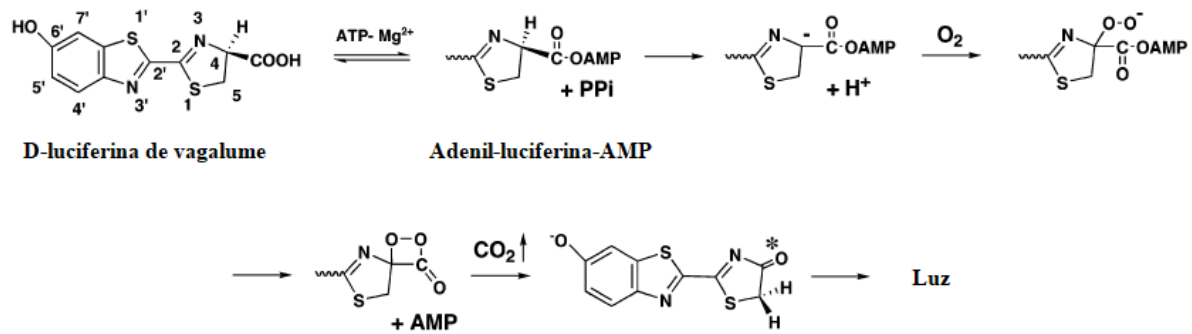


Figura 1: Esquema da reação de emissão de luz através da bioluminescência em vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003.

1.1. LUCIFERASES E SUAS APLICAÇÕES

Desde a clonagem da luciferase do vagalume *Photinus pyralis* (WET et al., 1985), muitas luciferases de besouros foram clonadas e caracterizadas, (TATSUMI et al., 1989;1992; WOOD et al., 1989; KAJIYAMA e NAKANO, 1991; DEVINE et al., 1993; OHMIYA et al., 1995; SALA-NEWBY et al., 1996; YE et al., 1997; VIVIANI et al. 1999a; 1999b; 2004; 2005; 2011; ALIPOUR et al., 2004; BRANCHINI et al., 2006; SILVA NETO et al., 2009; AMARAL et al., 2012; 2016; CARVALHO et al., 2020; MOREIRA et al., 2022). A luciferina e a luciferase de vagalumes tem sido extensivamente utilizadas para fins bioanalíticos como, por exemplo, em ensaios enzimáticos e de ATP, análises de contaminações microbiológicas, biossensores bioluminescentes para a detecção de agentes tóxicos e análises de toxicidade de água, utilização como gene repórter, aplicação em bioimagens de processos biológicos normais e patogênicos (VIVIANI e OHMIYA, 2006; RODA et al., 2009; SYED e ANDERSON, 2021; VIVIANI et al., 2022). Uma vantagem interessante do sistema luciferina-luciferase está no substrato da reação, pois a luciferina é estável e atóxica, favorecendo sua aplicabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TIFFEN et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2016).

Os reagentes dos vagalumes são utilizados nos métodos mais sensíveis para a detecção e quantificação de ATP. Kits para análise de ATP em amostras biológicas baseados no sistema luciferina-luciferase estão disponíveis, com sensibilidade para detectar até 0,01 fmol de ATP (CAMPBELL, 1988; PELENTIR et al., 2019), superando os métodos fluorescentes e colorimétricos. A medição de ATP fornece uma estimativa da quantidade de biomassa (HOLM-HANSEN e KARL, 1978; CHAPPELLE, 1978) e sua aplicação é bastante diversa.

Um exemplo de grande importância do uso do sistema bioluminescente para a detecção e quantificação de ATP é seu uso para avaliação de contaminação microbiológica nas mais diversas indústrias, como alimentícias, incluindo laticínios e bebidas, têxteis e entre outras. Também pode ser utilizado em Estações de Tratamento de Água (ETA), hospitais e demais setores que necessitem de avaliação de contaminantes biológicos e agentes tóxicos (STANLEY, 1993; GABRIEL et al., 2014; 2016; VIVIANI et al., 2022). A análise de contaminação de fluidos biológicos e infecções também é possível através desse sistema bioluminescente (HANNA, 1986). Ensaio de viabilidade celular de diferentes tipos celulares também podem ser realizados aplicando as reações bioluminescentes na detecção e quantificação de ATP intracelular, permitindo avaliar a citotoxicidade de diferentes compostos (VIVIANI e OHMIYA, 2006; VIVIANI et al., 2022).

O uso do DNA que codifica a luciferase como gene repórter também é bastante utilizado para investigar a eficiência de transformações e transfeções celulares, análise da localização de expressão gênica e entre outros. Esse uso se baseia na inserção do gene da luciferase em vetores virais, como o adenovírus (BRASIER e RON, 1992; MITTAL et al., 1993; KOVACS e METTENLEITER, 1991; RODRÍGUEZ et al., 1988; NISHIMIYA et al., 2023).

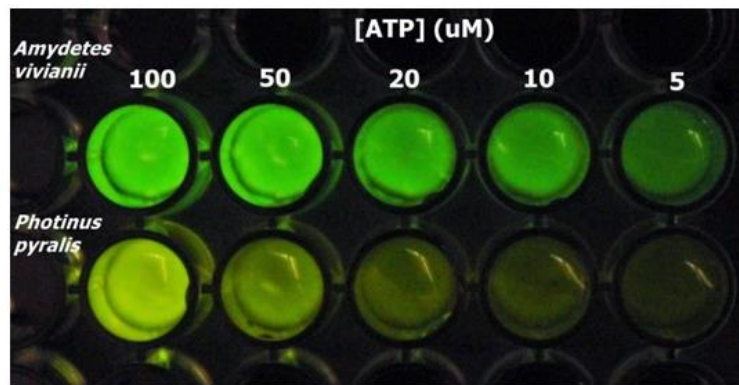
Outras aplicações promissoras da luciferase de vagalumes são a sua utilização para o imageamento de processos biológicos normais e patogênicos em organismos vivos. O gene da luciferase foi expresso com sucesso de maneira estável e transitória em mamíferos com o objetivo de acompanhar infecções virais e bacterianas, realizar análises *in vivo* da expressão gênica viral, acompanhar a progressão tumoral e entre outros diversos propósitos (VIVIANI e OHMIYA, 2006). O uso do gene repórter da luciferase é um processo não invasivo que permite a detecção e a localização de vírus, bactéria e células tumorais (NAYLOR, 1999; SALA-NEWBY et al., 1999; GREER e SZALAY, 2002; CONTAG e BACHMANN, 2002; MITTAL et al., 1993; KOVACS e METTENLEITER, 1991; EDINGER et al., 1999; BEVILAQUA et al., 2019; PHONBUPPHA et al., 2023).

1.1.1. Luciferase do Vagalume *Amydetes vivianii*

O vagalume *Amydetes vivianii* foi descoberto em 2006 no *campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Sorocaba (SILVEIRA e MERMUDES, 2014). Sua luciferase (wtAmy) foi clonada em 2011 (VIVIANI et al., 2011) e possui o espectro mais deslocado para

o azul dentre as demais luciferases de vagalumes ($\lambda_{\max}=547$ nm). Essa enzima apresenta um baixo K_M tanto para a luciferina ($9 \mu\text{M}$) quanto para o ATP ($9 \mu\text{M}$), demonstrando sua alta afinidade na reação bioluminescente. A enzima wtAmy apresenta a maior eficiência catalítica em relação a luciferina e ATP, resultando em um sinal bioluminescente mais brilhante em ensaios de ATP quando comparado com outras luciferases de vagalumes (Fig. 2A) (PELENTIR, 2019). Recentemente, essa luciferase também foi proposta como ferramenta educacional em aulas práticas de bioquímica para quantificação de ATP intracelular de amostras biológicas (Fig. 2B) (BEVILAQUA et al., 2022). Além disso, a wtAmy também apresenta sensibilidade ao cádmio e ao mercúrio, o que permitiu o estabelecimento de um método baseado na mudança da cor da bioluminescência e a análise ratiométrica para detecção de cádmio em água contaminada. Utilizando câmeras comuns de *smartphones* foi possível detectar de 5 a $10 \mu\text{M}$ de cádmio em amostras concentradas de água (Fig. 3), demonstrando a praticidade na qual essa luciferase pode ser utilizada inclusive em campo para a detecção desse metal (PELENTIR et al., 2019). Uma aula prática de efeito de cádmio em proteínas, baseada nesta luciferase, e que vem sendo aplicada na disciplina de bioquímica aplicada aos cursos de graduação de Ciências Biológicas, também foi desenvolvida (VIVIANI et al., 2023).

A



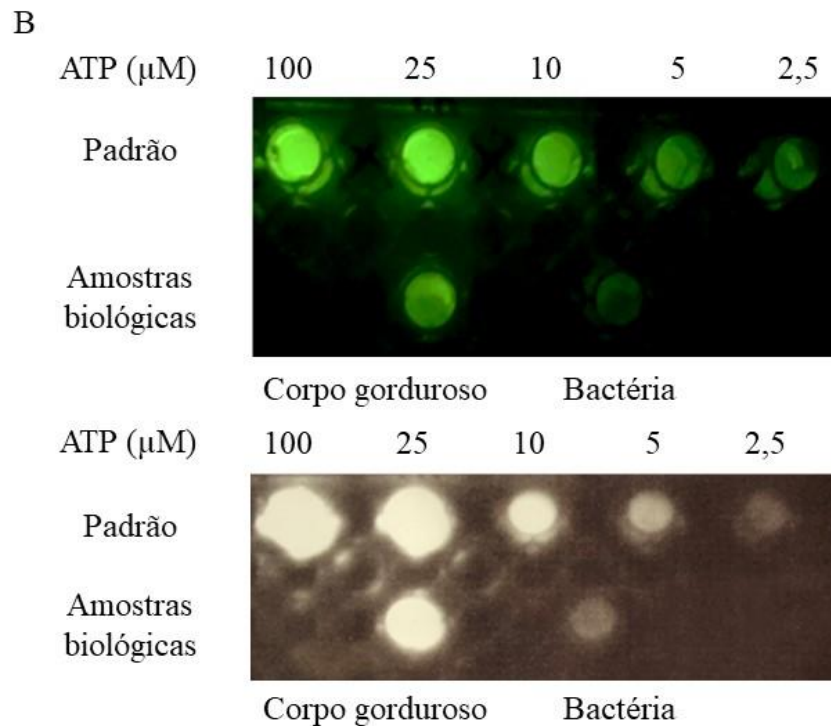


Figura 2: (A) Ensaio de ATP comparando a eficiência de emissão de sinal bioluminescente entre a luciferase do *Amydetes vivianii* e a luciferase comercial do *Photinus Pyralis*. Extraído de PELENTIR et al., 2019. (B) Quantificação de ATP intracelular de amostras biológicas com concentrações padrão de ATP em corpo gorduroso de larvas de *Zophobas morio* e em lisado de bactérias; no painel superior a imagem foi obtida por câmera de *smartphone* enquanto a imagem inferior foi obtida por câmera de fotodeteção (CCD). Extraído de: BEVILAQUA et al., 2022

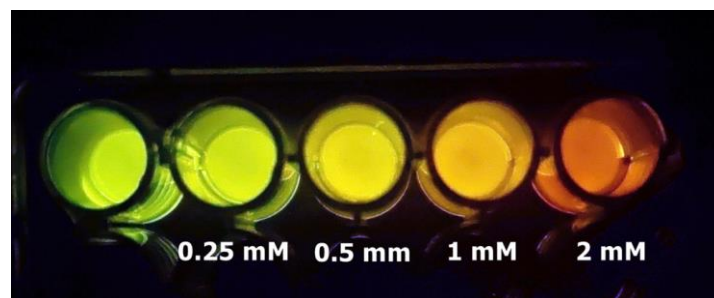


Figura 3: ensaio para detecção de cádmio utilizando a luciferase do *Amydetes vivianii*; a imagem foi obtida por câmera de um *smartphone* Samsung Galaxy S10. Extraído de: VIVIANI et al., 2023.

Devido a termoestabilidade e alta eficiência para a emissão de luz apresentadas pela luciferase do vagalume *Amydetes vivianii*, essa enzima é uma boa opção como reagente em ensaios de detecção de ATP para diversos propósitos, biossensores para bioprospecção de células inteiras, biossensor ratiométrico de metais tóxicos e aplicação em imunoenaios bioluminescentes.

1.2. IMUNOENSAIOS BIOLUMINESCENTES

Imunoensaios para a detecção de antígenos e anticorpos específicos são amplamente utilizados em diagnósticos laboratoriais. Em princípio, os imunoensaios eram realizados por meio de radiação, utilizando proteínas marcadas com iodo radioativo, o I^{125} (KESSLER, 1975, 1981; MCCONAHEY e DIXON, 1980). No entanto, por questões de biossegurança, esse método foi substituído por outros menos tóxicos, como métodos colorimétricos, fluorescentes e quimioluminescentes.

Um dos tipos mais utilizados é o imunoensaio quimioluminescente, pois apresenta elevada sensibilidade e especificidade. Esse método consiste no uso da enzima peroxidase de rabanete (HRP) fusionada a um anticorpo secundário capaz de reconhecer imunoglobulinas do tipo G (IgG). Ao adicionar uma solução de ensaio quimioluminescente (luminol ou algum outro derivado e H_2O_2), quimioluminescência azul é emitida (NESBITT e HORTON, 1992).

Analisando a sensibilidade dos testes no reconhecimento dos antígenos, os testes quimioluminescentes apresentam entre 66 e 75% de sensibilidade para imunoglobulinas do tipo M (IgM), mas o número se eleva quando se analisa a sensibilidade para imunoglobulinas do tipo G (IgG), no qual apresenta entre 75 e 100% de sensibilidade (KOJOURI, 2020). Considerando a evolução e aparecimento de novos agentes virais, principalmente do vírus SARS-COV-2, responsável pela pandemia de COVID-19 em 2020, novos métodos podem trazer um diferencial para as técnicas de bioimagem e imunoensaios. Vários testes para detecção do vírus SARS-COV-2 estão disponíveis comercialmente, dentre eles existem os imunoensaios quimioluminescentes.

Apesar de não possuir tanta popularidade para utilização em imunoensaios, a bioluminescência foi proposta como uma alternativa à quimioluminescência, a partir da criação de proteínas de fusão utilizando, principalmente, luciferases ligadas a antígenos ou anticorpos. No início dos anos 90, foi proposta a utilização de uma luciferase bacteriana (*Vibrio harveyi*) fundida a proteína A de *Staphylococcus aureus* em imunoensaios (LINDBLADH et al, 1991).

No início dos anos 90, a proteína A foi fundida com a luciferase de *Photinus pyralis*, cuja porção N-terminal foi retirada, entretanto, a atividade luminescente foi mais fraca quando comparada com a luciferase selvagem (KOBATAKE et al., 1993). Já nos anos 2000, a sequência completa da luciferase foi fundida com a proteína A e o resultado foi uma proteína de fusão eficaz, capaz de detectar baixas concentrações de antígeno (até 5 pg de marcador de

alfafetoproteína – AFP). Essa proteína apresentou sensibilidade elevada e alta afinidade para IgG (ZHANG et al., 2000).

Mais adiante, foi demonstrada a aplicabilidade da fotoproteína obelina de *Obelia longissima*, um hidrozoário, conjugada com a porção ZZ da proteína A em imunoenaios (FRANK et al., 1996). Em outro trabalho, a fotoproteína obelina foi fundida com a tirotrópina humana e tiroxina, no entanto, a sensibilidade foi análoga àquela dos imunoenaios com isótopos radioativos (FRANK et al., 2004).

Em 2019, a nanoluciferase do camarão de água profundas, *Oplophorus gracilirostris*, foi fundida a um nanocorpo contra a aflatoxina B1. Esse antígeno é uma micotoxina carcinógena produzida por fungos em cereais, o que torna essas análises importantes, especialmente, para quantificar contaminantes em alimentos comercializados. Esses resultados foram atrativos, pois a proteína de fusão permitiu análises simples e rápidas (REN et al., 2019). Outro ensaio importante foi a fusão da proteína S (espícula) e N (nucleoproteína) do vírus SARS-COV-2 com a luciferase NanoLuc, cuja proteína de fusão foi utilizada para quantificar anticorpos contra o vírus da COVID-19 (HALJASMÄGI et al., 2020).

A fusão da nanoluciferase com o nanoanticorpo anti-tetrabromobisfenol permitiu a realização de um imunoensaio de uma etapa que é dez vezes mais sensível que o ensaio imunoenzimático (ELISA) clássico, para a detecção do tetrabromobisfenol, um preocupante poluente ambiental que se acumula principalmente em sedimentos (LI et al., 2020). Outro imunoensaio interessante foi realizado utilizando a nanoluciferase para detectar a quantidade da proteína alvo e seu estado de fosforilação em um lisado celular (HWANG et al., 2020).

A mortalina é um marcador de estresse celular presente em diversas doenças como câncer, diabetes mellitus e cirrose hepática. Por meio da fusão do anticorpo anti-mortalina com a enzima luciferase de *Cypridina* (Mot-mAb-luc) foi possível detectar a mortalina de forma rápida e quantitativa através de uma adaptação do imunoensaio ELISA (GARG et al., 2019).

Além desses ensaios, outros imunoenaios bioluminescentes também foram bem sucedidos no diagnóstico de câncer, em biópsias. Por meio da conjugação do anticorpo secundário com a luciferase de *Cypridina*, foi realizado um imunoensaio quantitativo de bioluminescência para imuno-histoquímica capaz de detectar um marcador tumoral, o antígeno carcinoembrionário (WANG et al., 2020). A utilização de imunoenaios bioluminescentes para imuno-histoquímica, além de fornecer uma metodologia mais rápida, também permite a quantificação da molécula alvo (NIWA et al., 2023). Ademais, a fim de identificar múltiplos

anticorpos baseados em microfluídica e BRET, foram apontados sensores bioluminescentes (TOMIMURO et al., 2020).

1.3. PROTEÍNA A DE *Staphylococcus aureus*

Os mecanismos da engenharia genética permitem a produção de luciferases fusionadas a outras moléculas para inúmeras aplicações. Essa abordagem possibilita conservar o domínio catalítico da luciferase de modo a preservar sua atividade luciferásica, produzir a proteína de fusão em larga escala por meio de expressão bacteriana, além de necessitar de reagentes químicos relativamente mais baratos para a expressão e purificação da proteína de fusão (SMIRNOVA e UGAROVA, 2017).

A proteína A é uma opção conveniente para utilização em proteínas de fusão utilizadas em imunoenaios, uma vez que é muito eficiente, além de financeiramente mais acessível, principalmente para purificação por afinidade de anticorpos (CHEN et al., 2006). Ela foi primeiramente isolada de *Staphylococcus aureus* e é largamente utilizada em imunoenaios, pois possui afinidade elevada pela porção Fc das imunoglobulinas. Entretanto, a proteína A inteira oferece alguns inconvenientes, podendo afetar a atividade das proteínas fusionadas. A sua porção ZZ (141 resíduos de aminoácidos – VIVIANI et al., 2021), permite a construção de proteínas de fusão menores, mais ativas, e com alta taxa de expressão em bactérias (DREVET et al., 1997).

1.4. PROTEÍNA DE FUSÃO ZZ-AMYLUC

Em 2021, Viviani, et al., desenvolveram uma nova proteína de fusão utilizando a porção ZZ da proteína A e a luciferase do vagalume *Amydetes vivianii*, uma das mais brilhantes disponíveis no laboratório, formando a proteína de fusão ZZ-AmyLuc (Fig. 4). A luciferase do *Amydetes vivianii* é demonstradamente muito eficiente e a luz emitida é verde-azulada, característica que não ocorre em outras luciferases de vagalumes (VIVIANI et al., 2011; PELENTIR et al., 2019).

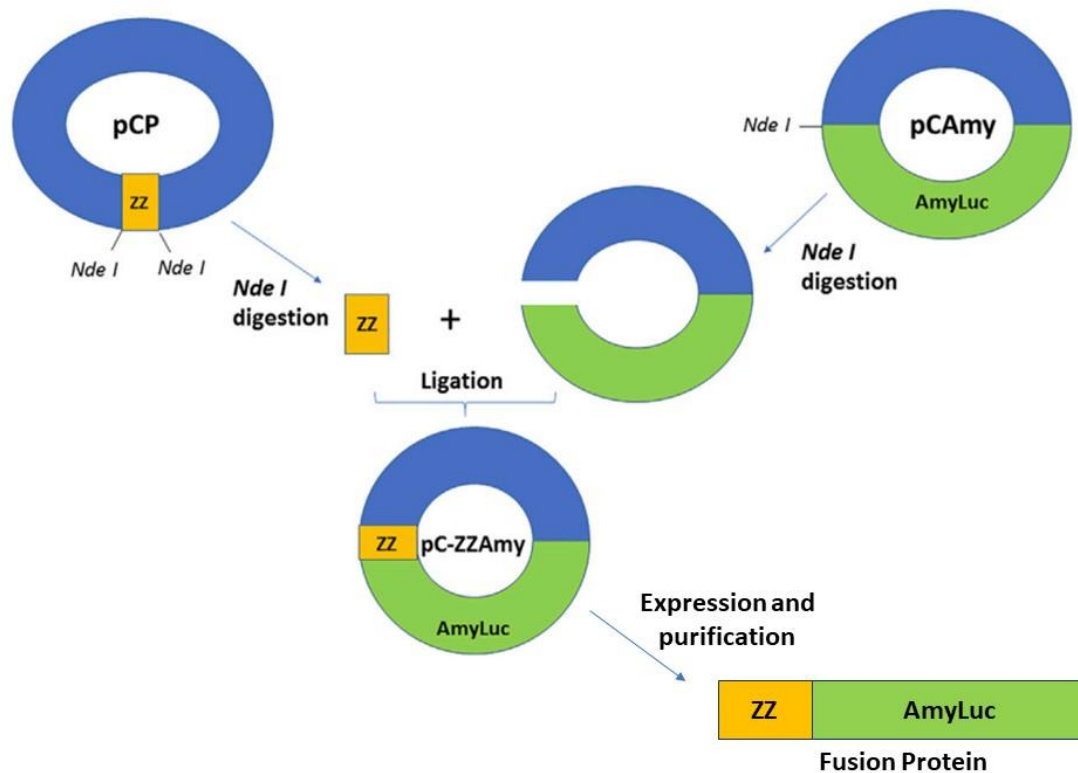


Figura 4: Esquema de construção do DNA da ZZ-AmyLuc dentro do vetor pCold II (Takara, Japão) e obtenção da proteína de fusão. Adaptado de VIVIANI et al., 2021.

A ZZ-AmyLuc se mostrou eficiente nos imunossaios realizados, sobretudo para a detecção da nucleoproteína do SARS-COV-2 (Fig. 5) utilizando IgG, além de seu brilho ser facilmente detectado em câmaras de fotodeteção (CCD). Seu sinal luminescente foi tão promissor que pôde também ser observado em câmaras fotográficas simples de *smartphones*. A proteína de fusão também apresentou luminescência sustentada por vários minutos ($t_{1/2} > 30$ min) na presença de D-luciferina e MgATP em pH 8,0. Complementarmente, com a adição de coenzima A (CoA) e ditioneitol (DTT), ela apresentou cinética mais lenta, com brilho capaz de durar horas. Dessa maneira, a ZZ-AmyLuc se mostrou eficiente tanto em imunossaios bioluminescentes quanto em técnicas de *Western Blotting* (VIVIANI et al., 2021), resultando na submissão de uma patente junto ao INPI.

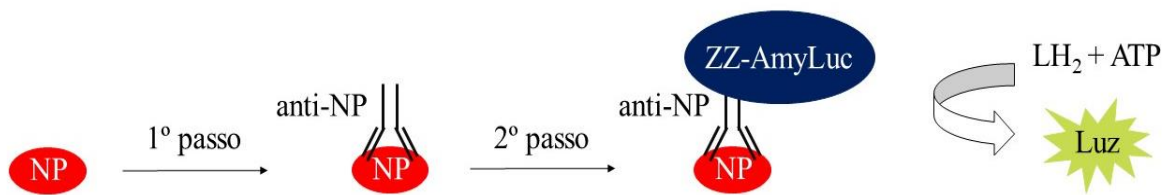


Figura 5: Esquema do imunoenensaio bioluminescente utilizando a ZZ-AmyLuc. No primeiro passo a anti-nucleoproteína (anti-NP) reconhece e se liga ao seu antígeno específico, a nucleoproteína (NP) do SARS-CoV-2. No segundo passo, a ZZ-AmyLuc reconhece a porção Fc do anticorpo primário (anti-NP). Por fim, na presença de luciferina e ATP, ocorre a emissão de luz. Autoria própria.

Porém, ainda é necessário otimizar os imunoenaios com esta proteína de fusão, para torna-la mais aplicável. Considerando as aplicações da ZZ-AmyLuc e suas vantagens na utilização em imunoenaios, esse trabalho propôs sua caracterização físico-química e cinética mais detalhada, e da sua estabilidade, e a otimização da sensibilidade de detecção em imunoenaios bioluminescentes de distintas proteínas, especialmente a nucleoproteína do SARS-CoV-2.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de sistemas bioluminescentes em ensaios bioanalíticos, enzimáticos e de biofotônica têm aumentado nos últimos anos, sobretudo em aplicações biomédicas. Além de sua utilização em diferentes ensaios, a bioluminescência também se mostrou eficiente para o uso em imunoenaios baseados na interação antígeno-anticorpo.

A proteína de fusão, ZZ-AmyLuc, que une a porção ZZ da proteína A à luciferase do vagalume *Amydetes vivianii*, foi desenvolvida no contexto da pandemia de COVID-19 e mostrou-se efetiva na detecção da anti-nucleoproteína do vírus SARS-COV-2. Assim, essa proteína é promissora tanto em análises envolvendo o vírus SARS-COV-2 como, possivelmente, em outros imunoenaios baseados em IgG, inclusive *Western Blotting*. Isso torna evidente a importância da pesquisa da biodiversidade perante crises ambientais e, sobretudo, de saúde pública.

Dentre as vantagens da utilização da ZZ-AmyLuc em imunoenaios está a sua luminescência mais intensa e mais sustentada quando comparada com o ensaio quimiluminescente baseado em anticorpo secundário conjugado com HRP, largamente utilizado em *Western Blotting* e imunoenaios atualmente. Ademais, a proteína de fusão também corresponde a uma alternativa relativamente barata para utilização em larga escala.

Assim, a proteína de fusão ZZ-AmyLuc constitui um reagente bioluminescente muito promissor para uso tanto em *Western Blotting* quanto em imunoenaios, podendo oferecer uma alternativa mais eficiente para tais ensaios. Entretanto, ainda são necessárias uma caracterização enzimática mais detalhada das propriedades cinéticas, bioluminescentes e de ligação à IgG, a otimização da estabilidade *in vitro* da proteína de fusão ZZ-Amy, e melhorar a sensibilidade de detecção de anticorpos e antígenos nos imunoenaios bioluminescentes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização cinética e físico-química da proteína de fusão ZZ-AmyLuc, e otimização da sensibilidade de detecção de anticorpos e antígenos para utilização em imunossaios bioluminescentes de SARS-CoV-2.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o K_M para ATP e para luciferina da ZZ-AmyLuc;
- Determinar o pH ótimo da proteína de fusão;
- Determinar o pH ótimo de interação entre anticorpos e antígenos com a proteína de fusão;
- Avaliar a termoestabilidade da ZZ-AmyLuc a 4 °C, -20 °C e 37 °C;
- Obter os espectros de bioluminescência em diferentes pHs;
- Otimizar a sensibilidade de detecção fotométrica de anticorpos e antígenos da ZZ-AmyLuc em imunossaios bioluminescentes;
- Avaliar a estabilidade da ZZ-AmyLuc.

4. METODOLOGIA

4.1. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Amostras de 50 μL de células competentes de *Escherichia coli* BL21/DE3 (Agilent Technologies, EUA) foram misturadas com 1,0 μL DNA plasmidial (50-100ng) que contém o gene da ZZ-AmyLuc (pCZZ-Amy) em vetor pCold II (Takara, Japão). A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e submetida a um choque térmico de 45 segundos a 42° C em banho maria, seguida de 2 minutos no gelo. Após o choque térmico foram adicionados 200 μL de meio LB líquido e esta solução foi mantida a 37° C por 1 h sob agitação a 225 rpm. A amostra foi plaqueada posteriormente em meio LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA ZZ-AMYLUC

A partir de uma colônia isolada de células competentes *E. coli* BL21/DE3 transformadas com DNA plasmidial contendo pC-ZZ-Amy), foi feita uma pré-cultura com 5 mL de meio líquido LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essa pré-cultura foi mantida a 37° C *overnight* sob agitação de 225 rpm. A pré-cultura então foi transferida para 100 mL de meio líquido LB, sob agitação de 225 rpm a 37° C até atingir $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ para indução da expressão da proteína a 18° C por 18 horas após a adição de isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,4 mM.

4.3. MEDIDAS DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE *IN VIVO*

Para verificar se a expressão da ZZ-AmyLuc foi efetiva nas bactérias em sua forma ativa, foram realizadas medidas de bioluminescência *in vivo* no luminômetro AB-2200 (ATTO; Japão). A medida de intensidade de bioluminescência é dada em *cps* (*counts* por segundo). O ensaio foi realizado misturando-se, em tubo de ensaio, 90 μL da cultura de bactérias e 10 μL de D-luciferina 10 mM pH 5,0.

4.4. EXTRAÇÃO DA ZZ-AMYLUC

As culturas de 100 mL induzidas *overnight* com IPTG foram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas a 2.200 g por 15 minutos a 4° C para coleta do precipitado (*pellet*). Os *pellets* foram armazenados a -80° C até seu uso. O *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de tampão de extração gelado (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM) e 100 µL de coquetel inibidor de protease (Sigma, Estados Unidos). A lise das células foi realizada através de ultrassonicação (Misonix, Estados Unidos) com 5 repetições de 10 segundos cada, intercaladas com 15 segundos da amostra no gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.200 g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante (extrato bruto), foi coletado, a atividade luminescente medida em luminômetro AB-2200 (ATTO; Tóquio, Japão) e, então, usado para purificação da proteína de fusão.

4.5. PURIFICAÇÃO DA ZZ-AMYLUC

O extrato bruto obtido no tópico 4.4. foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade com matriz de níquel. Esse método de purificação baseia-se na afinidade da cauda de histidina fusionada ao N-terminal da enzima recombinante por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose. A resina de Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Alemanha) foi equilibrada com tampão de extração (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM) e, em seguida, o extrato bruto foi ligado à resina por 45 minutos sob agitação moderada a 4° C, a fim de possibilitar a ligação da cauda de histidina da ZZ-AmyLuc ao níquel da resina. A resina complexada com a ZZ-AmyLuc foi então aplicada em uma mini coluna e lavada com 10 mL de tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 20 mM). A proteína de fusão ZZ-AmyLuc, então, foi eluída da resina com tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 300 mM e imidazol 250 mM) em alíquotas de 1 mL cada. Foi medida a atividade de cada alíquota conforme descrito no item 4.6. A eluição com maior atividade foi dialisada em tampão de diálise (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM e glicerol 10%) por 12–20 horas e estocada a 4° C para ser utilizada em ensaios posteriores.

4.6. MEDIDAS DE ATIVIDADE DA ZZ-AMYLUC *IN VITRO*

A atividade enzimática da ZZ-AmyLuc *in vitro* foi realizada pela medida da bioluminescência em luminômetro AB-2200, a partir da mistura de 80 μL de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 10 μL de ZZ-AmyLuc (purificada – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 μL de D-luciferina 10 mM e 5 μL de uma solução contendo MgSO_4 80 mM e ATP 40 mM. A atividade bioluminescente é dada em *cps* (*counts* por segundo).

4.7. CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E FÍSICO-QUÍMICA DA ENZIMA ZZ-AMYLUC

4.7.1. Determinação do K_M para ATP e Luciferina

A determinação do K_M tanto para ATP quanto para luciferina foi realizada por meio das medidas de atividade *in vitro*, de acordo com o tópico 4.6. Para a determinação do K_M para o ATP, as concentrações de ATP foram variadas (concentração final 0,000625; 0,00125; 0,005; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mM), e a concentração de luciferina foi mantida em 0,5 mM. Para a determinação do K_M para a luciferina, as concentrações finais de luciferina foram 0,000625; 0,00125; 0,005; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mM, e a concentração de ATP foi mantida em 2 mM. As medidas foram realizadas em triplicata. Os valores de atividade em *cps* e concentração de substratos obtidos em cada um dos ensaios foram plotados em gráficos para elaborar uma curva de saturação e, em seguida, seus inversos foram plotados em gráficos de Lineaweaver-Burk, a fim de determinar o K_M através do intercepto da abcissa para ambos os ensaios.

4.7.2. Determinação do pH Ótimo

O pH ótimo para a proteína de fusão ZZ-AmyLuc foi determinado através das medidas da atividade enzimática em diferentes pHs usando diferentes tampões: tampão citrato 0,1 M (pH 5,0; 5,5 e 6,0), tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0; 8,5 e 9,0) e tampão CHES 0,1 M (pH 9,0; 9,5 e 10,0). Para o ensaio foram misturados 85 μL de tampão, 5 μL de D-luciferina 10 mM, 5 μL da ZZ-AmyLuc (purificada) e 5 μL de

uma solução contendo ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM. As atividades foram medidas utilizando um luminômetro AB2200 (ATTO; Japão). Ao final do ensaio foi plotado um gráfico com as atividades normalizadas nos pontos de intersecção de pH de cada tampão.

4.7.3. Espectros de Bioluminescência

Os espectros de bioluminescência foram obtidos utilizando o espectroluminômetro de alta sensibilidade LumiF SpectroCapture AB-1850 com câmera CCD resfriada (ATTO, Japão). Para os ensaios no espectroluminômetro, foram misturados em microtubo tipo-PCR 85 µL de tampão Tris-HCl 0,10 M pH 8,0, 5 µL da ZZ-AmyLuc, 5 µL de D-luciferina 10 mM e 5 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM. A janela de emissão foi mantida a 1 mm, sendo o tempo de integração e sensibilidade variaram de acordo com a intensidade da luminescência da amostra (variação de 10 segundos a 5 minutos).

4.7.4. Termoestabilidade

A estabilidade da proteína de fusão foi medida em diferentes temperaturas durante diferentes tempos. A concentração final de ZZ-Amy nesses ensaios foi de ~1,24 µg/µL.

4.7.4.1. 4°C

A enzima ZZ-AmyLuc dialisada e diluída em tampão de diálise (10% glicerol; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 mM DTT) foi incubada na temperatura de 4 °C. A atividade bioluminescente remanescente da proteína de fusão foi medida, de acordo com o tópico 4.6, a cada 30 dias durante três meses (90 dias).

4.7.4.2. -20 °C

A enzima ZZ-AmyLuc dialisada e diluída em tampão de diálise foi incubada na temperatura de -20 °C em condição padrão sem adição de glicerol e com 20% de glicerol. A atividade bioluminescente remanescente da proteína de fusão foi medida, de acordo com o tópico 4.6, a cada 30 dias durante três meses (90 dias).

4.7.4.3. 37 °C

A enzima ZZ-AmyLuc dialisada em tampão de diálise foi incubada na temperatura de 37 °C (bloco termostático). A atividade bioluminescente remanescente da proteína de fusão foi medida, de acordo com o tópico 4.6, em diferentes tempos (0h; 1h; 3h; 6h; 12h; 24h; 48h). A fim de evitar a retirada das amostras do bloco termostático antes do período necessário, uma alíquota foi medida em cada tempo e descartada em seguida.

4.7.5. Efeito de aditivos na Atividade Luminescente da Proteína de Fusão

Para preservar a atividade luminescente de ZZ-AmyLuc, foram adicionados diferentes aditivos no tampão de diálise (10% glicerol; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 mM DTT). Nos testes para avaliar o efeito do EDTA, suas concentrações foram de 0,5 mM e 2 mM, enquanto nos testes para avaliar o efeito do NaCl, as concentrações do sal foram de 5 mM e 15 mM, além da ausência de sal. As concentrações de luciferase nesses ensaios foram de 0,75 – 1,0 mg/mL. Após a diálise, a estabilidade foi analisada conforme descrito no item 4.7.4.3 a 37° C.

4.8. OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS E ANTÍGENOS COM ZZ-AMYLUC

A detecção da nucleoproteína (NP) de SARS-COV-2 foi realizada através da utilização da enzima luciferase ZZ-Amy como anticorpo secundário em imunoenaios. Para analisar a sensibilidade do ensaio de detecção, foram pipetados 1 µL de diferentes concentrações do antígeno (nucleoproteína - Cusabio Technology LLC, USA) (10-100 ng) em uma membrana de nitrocelulose, com tempo de secagem de 30 minutos. As amostras foram incubadas com 2 mL de solução bloqueadora (PBS-Tween 1%/5% leite desnatado) por 30 minutos, seguida de duas lavagens breves com 2 mL de tampão PBS-T (Na₂HPO₄ 0,5 mM; NaH₂PO₄ 0,5 mM; NaCl 10 mM; Tween 0,1%; pH 7,5). Então, as amostras foram incubadas com 0,75 µL de anticorpo primário (anti-NP - Cusabio Technology LLC, USA), seguida de duas lavagens rápidas e, depois, duas lavagens de 10 minutos com tampão PBS-T. As amostras foram incubadas durante uma hora com 1 mL de ZZ-AmyLuc em diferentes concentrações diluições: 5 µg/mL (1/200); 2 µg/mL (1/500); 1 µg/mL (1/1000); 0,5 µg/mL (1/2000) e 0,2 µg/mL (1/5000). As amostras

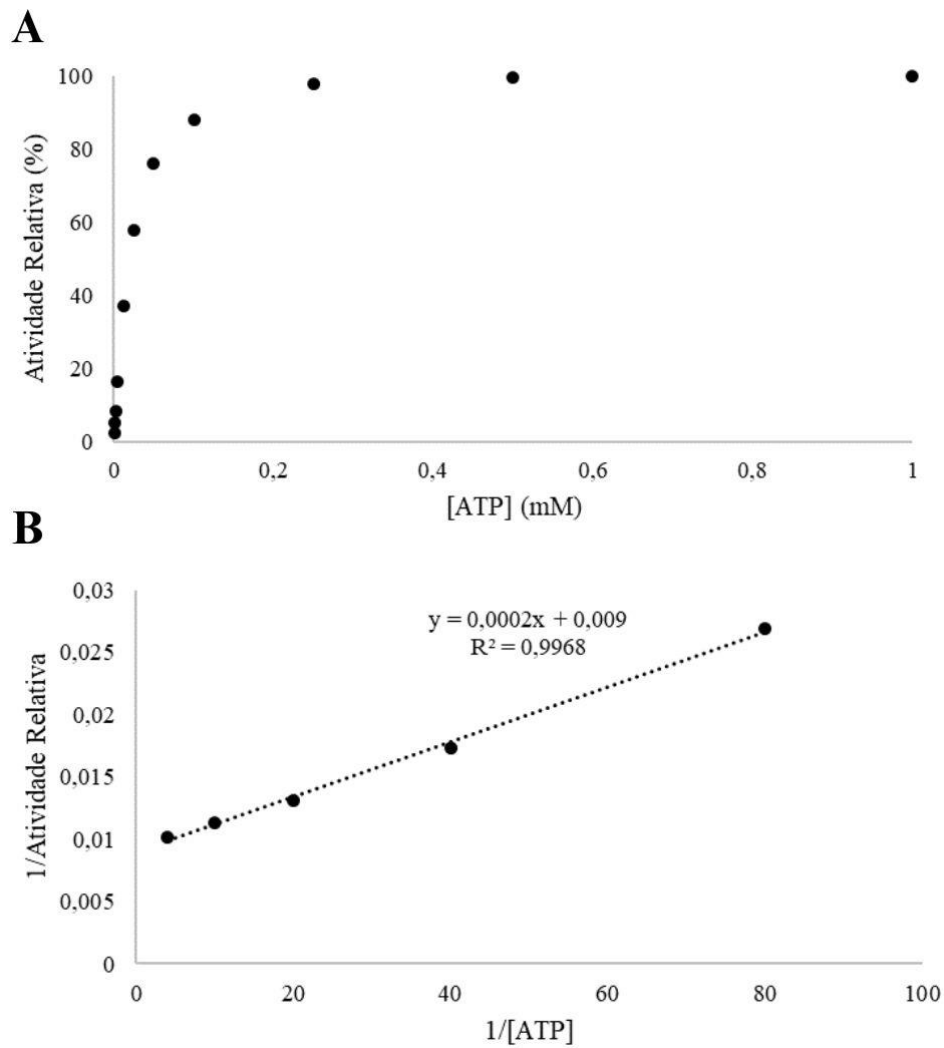
então foram lavadas rapidamente por duas vezes, seguida de duas lavagens de 10 minutos com tampão PBS-T. Ao final, 50 μ L de solução de ensaio (D-luciferina 0,5 mM; ATP 2 mM; $MgSO_4$ 4 mM; DTT 5 mM; CoA 0,25 mM em tampão Tris-HCl pH 8,0) foi adicionada sobre a membrana que foi exposta na câmara de fotodeteção (CCD) de 1 a 5 minutos, dependendo do sinal luminescente.

Além disso, o ensaio de ligação antígeno-anticorpo-ZZ-AmyLuc foi conduzido considerando diferentes condições de pH e concentração de sal do tampão PBS-T. Foram realizados ensaios com tampão PBS-T pH 7,0 e 8,0 (padrão: pH 7,5), e com concentração de NaCl de 50 mM e 150 mM (padrão: 100 mM de NaCl). Foram realizadas variações nos pHs da reação utilizando PBS-T em pHs 7,0 e 8,0 (padrão: pH 7,5), além de alterações na concentração de sal, utilizando PBS-T com 50 mM e 150 mM de NaCl (padrão: 100 mM de NaCl). Ademais, foram realizados testes reduzindo o tempo de incubação da ZZ-AmyLuc para 40 e 20 minutos, em contraste com o período padrão de 1 hora. Adicionalmente, também foi realizado um imunoensaio utilizando a ZZ-AmyLuc dialisada em tampão de diálise contendo 5 mM de NaCl ao invés do padrão de 10 mM de NaCl no tampão de diálise, pois a enzima se mostrou mais termoestável a 37 °C nessa condição. A concentração final de ZZ-AmyLuc nesses imunoensaios foi de ~0,9 mg/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. K_M PARA ATP E LUCIFERINA

Em estudo prévio, a proteína de fusão apresentou cinética de reação mais lenta quando comparada com a luciferase selvagem. Assim, enquanto a luciferase do *Amydetes vivianii* possui um K_M de 9 μM tanto para luciferina quanto para o ATP (PELENTIR et al., 2019), a proteína de fusão ZZ-AmyLuc apresentou valores de K_M aumentados: 30 μM para a luciferina e 22 μM para o ATP (Fig. 6).



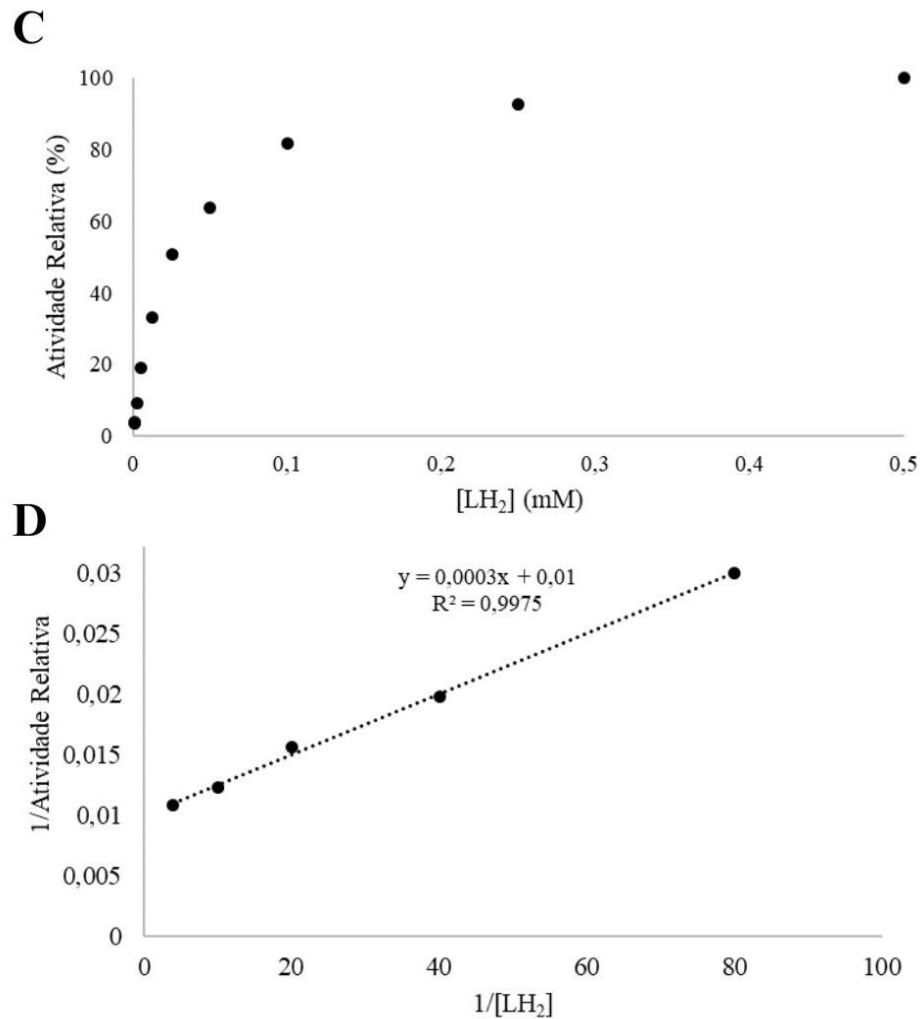
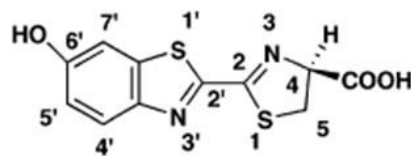


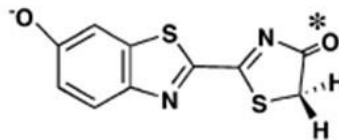
Figura 6: (A) Efeito da concentração de ATP na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (B) Gráfico de Lineweaver-Burk do efeito de ATP na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (C) Efeito da concentração de luciferina na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc; (D) Gráfico de Lineweaver-Burk do efeito de luciferina na atividade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc.

Os valores aumentados de K_M s são consistentes com a cinética de reação luminescente mais lenta. Na reação bioluminescente, o substrato (luciferina) e o produto (oxiluciferina) são muito semelhantes (Fig. 7). Dessa forma, um baixo K_M pode indicar uma alta afinidade tanto para o substrato quanto para o produto da reação. Assim, a oxiluciferina formada seria capaz de inibir a ação enzimática da luciferase por competição com o substrato, impedindo a transformação de mais luciferina em oxiluciferina, o que implica em um decaimento mais rápido da reação e, conseqüentemente, uma cinética bioluminescente mais rápida (NETO, 2009). O contrário também poderia ocorrer, ou seja, quando o K_M da reação bioluminescente for mais alto, a afinidade tanto pelo substrato quanto pelo produto pode ser menor. Isso faria

com que a oxiluciferina resultante da reação não se ligasse tão fortemente à enzima luciferase, favorecendo sua saída do sítio-ativo e assim permitindo a manutenção de uma velocidade máxima por mais tempo. Dessa forma, a cinética da reação se tornaria mais lenta e a emissão de luz demoraria mais tempo para decair. Portanto, o K_M mais elevado da ZZ-AmyLuc quando comparado com a wtAmy pode ser um motivo capaz de explicar a luminescência sustentada da proteína de fusão por vários minutos, com um tempo de meia vida de cerca de 30 minutos (VIVIANI et al., 2021). Estas diferenças de cinética entre as duas formas da luciferase podem estar relacionadas às alterações estruturais ocasionadas pela fusão do domínio ZZ à porção N-terminal da ZZ-AmyLuc.



D-Luciferina de Vagalume



Oxiluciferina de Vagalume

Figura 7: Estrutura química da D-luciferina (substrato) e oxiluciferina (produto) da reação bioluminescente de vagalumes. Adaptado de: BRANCHINI et al., 2003.

5.2. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

O pH ótimo da reação bioluminescente da luciferase *Amydetes vivianii* selvagem encontra-se próximo ao 8,5 (PELENTIR et al., 2019), enquanto a proteína de fusão mostrou um pequeno desvio para a região alcalina próximo ao pH 9,0 (Fig. 8).

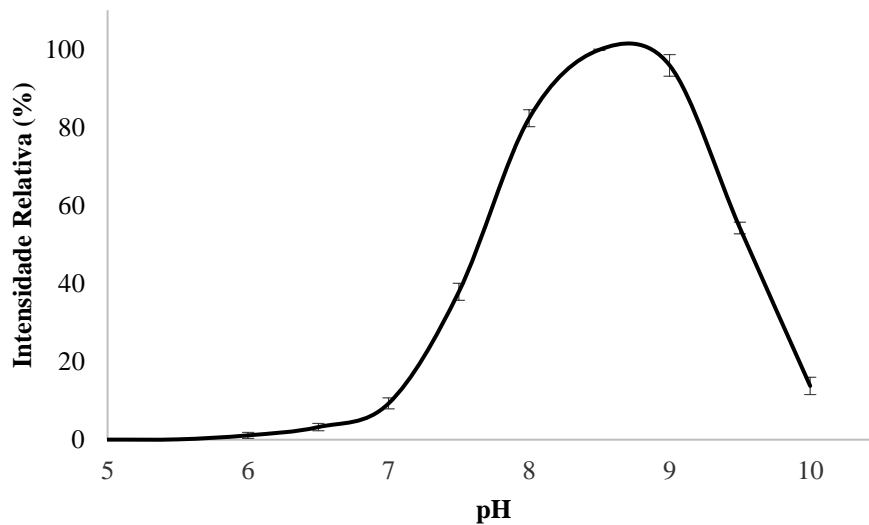


Figura 8: Efeito do pH na atividade luciferásica da ZZ-AmyLuc.

Essa pequena variação no pH ótimo da ZZ-AmyLuc quando comparada com a wtAmy também pode estar relacionada a pequenas variações conformacionais da proteína ocasionadas pela fusão do domínio ZZ no N-terminal da luciferase.

5.3. ESPECTROS DE BIOLUMINESCÊNCIA

A luciferase do *Amydetes vivianii* (Amy) possui o espectro de bioluminescência mais deslocado o azul entre as luciferases de outros vagalumes (PELENTIR et al., 2019). Além disto, seu espectro é menos sensível ao pH quando comparado a outras luciferases de vagalume do que com espectros deslocados para a região do vermelho (VIVIANI et al., 2011). Em pH 8,0, a ZZ-AmyLuc apresentou um espectro ($\lambda_{\text{max}}=549$ nm) (Fig. 9) com pico e boa sobreposição ao espectro da luciferase selvagem. Além disto, a proteína manteve a sensibilidade ao pH encontrada nas luciferases pH-sensitivas (PELENTIR et al., 2019), com espectro deslocado para o vermelho ($\lambda_{\text{max}}=587$ nm) em pH 6,0 (Fig. 9).

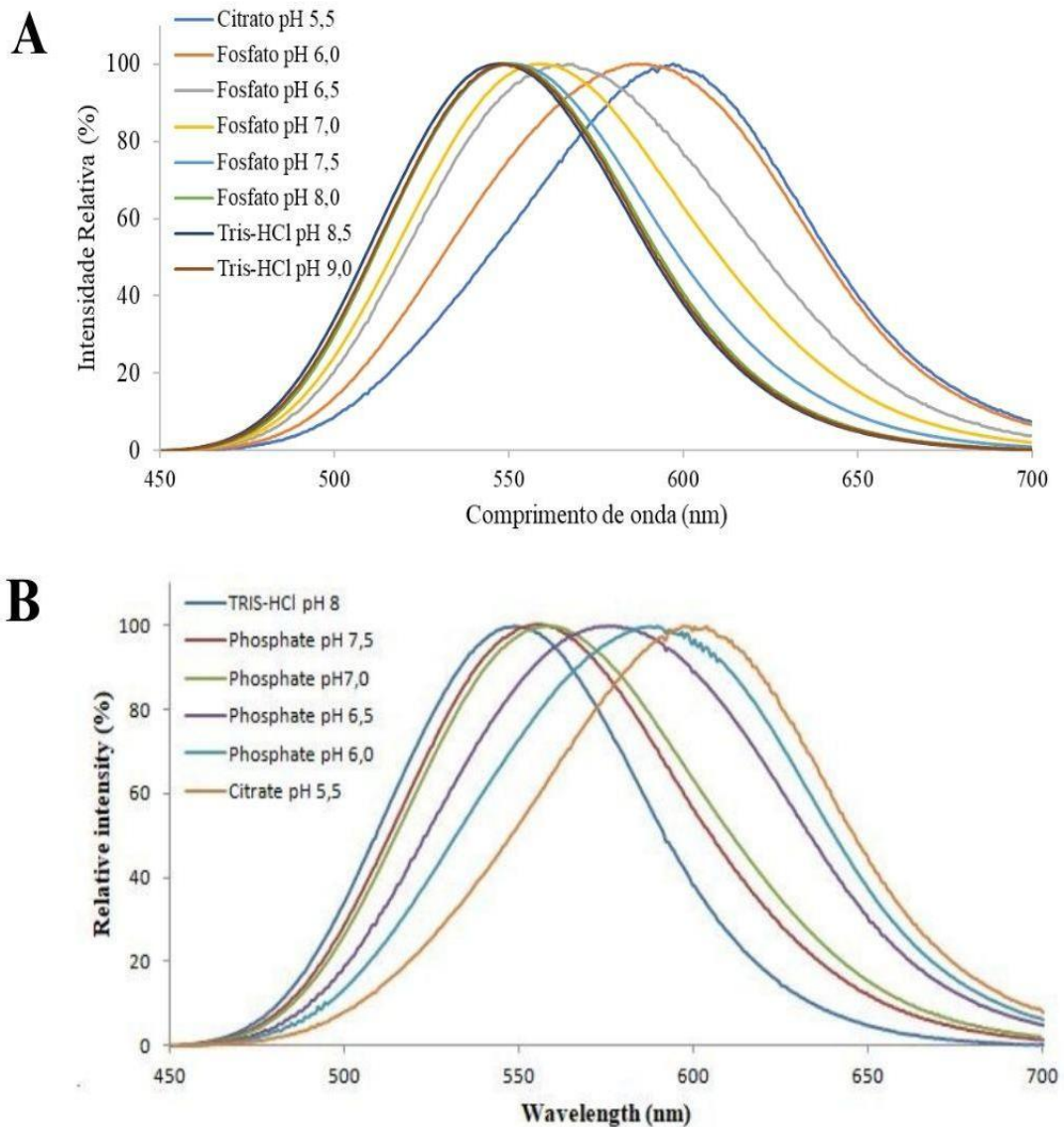


Figura 9: Espectro de bioluminescência *in vitro* da ZZ-AmyLuc (A) e da wtAmy (B) em diferentes pHs. O gráfico B foi extraído de PELENTIR et al., 2019.

Alguns mecanismos foram propostos para explicar a variação no espectro de luz nos besouros: (1) Tautomerização ceto-enólica da oxiluciferina (WHITE et al., 1971), (2) Mecanismo de transferência de carga por torção intramolecular (McCAPRA et al., 1994), (3) Grau de ressonância da oxiluciferina excitada (BRANCHINI et al., 2004), (4) Polarização do microambiente da oxiluciferina (DeLUCA, 1969; UGAROVA e BROVKO, 2001), (5) Conformação da cavidade do sítio-ativo da luciferase (NAKATSU et al., 2006). Dessa forma,

a hidrofobicidade do ambiente catalítico, influenciada pelo pH da reação, geraria uma conformação fechada, resultando na emissão de luz verde-amarelada como ocorre com a wtAmy, enquanto um microambiente mais polar promoveria a emissão de luz vermelho-alaranjada (VIVIANI et al., 2008; VIVIANI et al., 2014). Além disso, o grau de basicidade de algum resíduo de aminoácido localizado próximo ao grupo fenolato da oxiluciferina assim como a polaridade do microambiente seriam responsáveis pela ampla faixa de cores encontradas nas luzes emitidas pelas luciferases de besouros (HIRANO et al., 2009). Portanto, as alterações no espectro de emissão de luz de acordo com a variação do pH podem estar relacionadas com a conformação do sítio ativo da luciferase e do anel benzotiazólico da oxiluciferina.

Os resultados indicam que a fusão da Amy com a porção ZZ não afetou os espectros de bioluminescência nem a sensibilidade ao pH da ZZ-AmyLuc. Portanto, a sensibilidade ao pH apresentada tanto na wtAmy (VIVIANI et al., 2014) quanto na ZZ-AmyLuc pode ser proveniente de uma mudança conformacional na luciferase que se alteraria entre uma conformação apolar fechada para uma conformação polar aberta, resultando na variação encontrada no espectro da proteína de fusão quando submetida a diferentes pHs da reação, conforme proposto (VIVIANI et al., 2016, 2018).

5.4. TERMOESTABILIDADE

5.4.1. 4 °C

A termoestabilidade a 4 °C da ZZ-AmyLuc (concentração final ~1,24 µg/µL) foi analisada durante três meses (90 dias) com avaliação da atividade bioluminescente a cada 30 dias (Fig. 10). A proteína de fusão ZZ-AmyLuc manteve sua atividade estável durante todo o período experimental, demonstrando seu potencial de armazenamento nesta temperatura sem detrimento de sua atividade bioluminescente.

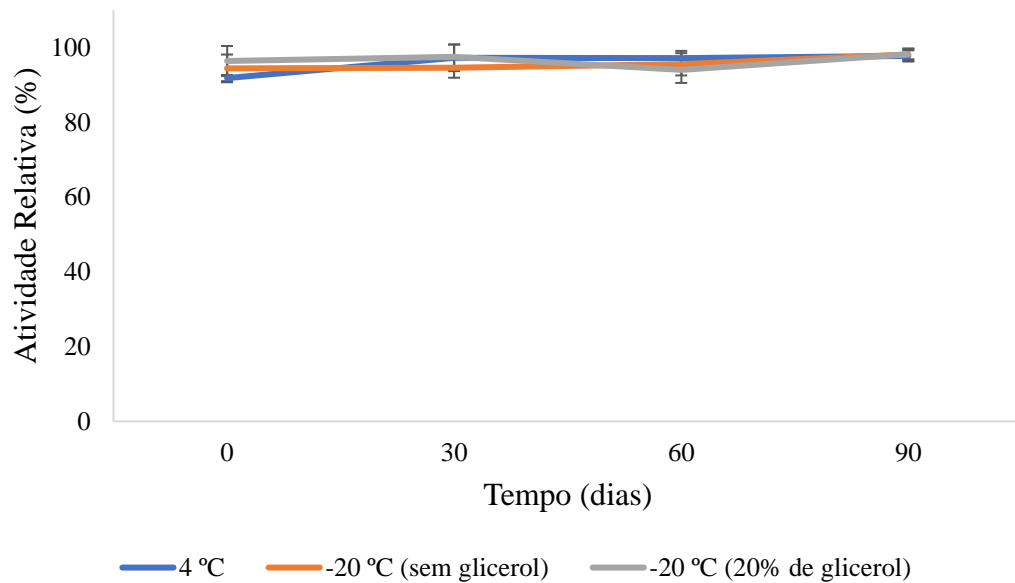


Figura 10: Termoestabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 4 °C e -20 °, na ausência e na presença de 20% de glicerol durante 90 dias.

5.4.2. -20 °C

A termoestabilidade da proteína ZZ-AmyLuc (concentração final ~1,24 µg/µL) a -20 °C foi analisada sem glicerol e com 20% de glicerol (Fig. 10) durante três meses (90 dias) com avaliação da atividade bioluminescente a cada 30 dias. Em ambos os casos não houve perda de atividade bioluminescente da proteína de fusão, demonstrando que esta proteína pode ser facilmente estocada na forma congelada.

5.4.3. 37 °C

A termoestabilidade da ZZ-AmyLuc (concentração final ~1,12 µg/µL) a 37 °C foi analisada nas mesmas condições estabelecidas para a Amy selvagem (PELENTIR et al., 2019). A proteína de fusão ZZ-AmyLuc perdeu aproximadamente 22% da sua atividade na primeira hora de experimento, ~45% na terceira hora e 100% após 24 horas (Fig. 11). Quando comparada à luciferase selvagem, a ZZ-AmyLuc mostrou-se menos termoestável a 37° C, pois a luciferase do *Amydetes vivianii* perdeu apenas cerca de 60% da atividade luciferásica após 24 horas de experimento e 80% após 48 horas (PELENTIR et al., 2019).

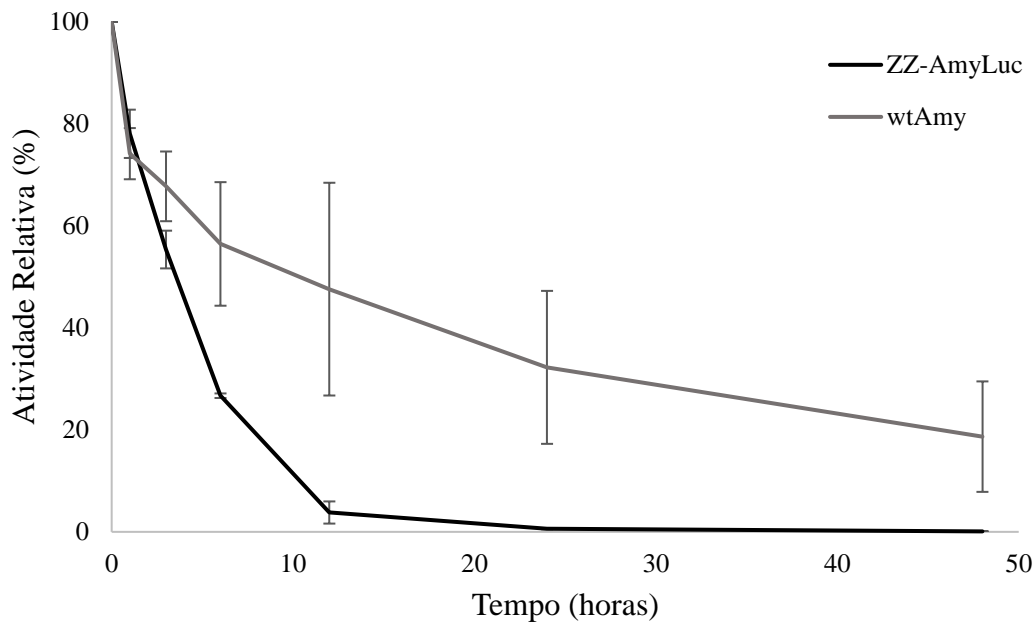


Figura 11: Termostabilidade da ZZ-AmyLuc (linha preta) e da wtAmy (linha cinza) incubadas a 37 °C durante 48 horas. Os dados da termostabilidade da wtAmy foram extraídos de PELENTIR et al., 2019.

5.4.4. Efeito de aditivos na Estabilidade da Proteína

Foram analisados os efeitos da presença de EDTA e NaCl na estabilidade e atividade da proteína de fusão (concentração final ~0,75 – 1,0 mg/mL). A proteína de fusão dialisada e diluída em tampão contendo 0,5 mM e 2 mM de EDTA não se mostrou mais estável do que a proteína dialisada e diluída em tampão padrão (concentração 1 mM de EDTA). A atividade luciferásica em ambos os casos apresentou diminuição de aproximadamente 40 a 50% na primeira hora de experimento, de 90 a 95% após 12 horas e de 100% a partir de 24 horas de experimento (Fig. 12).

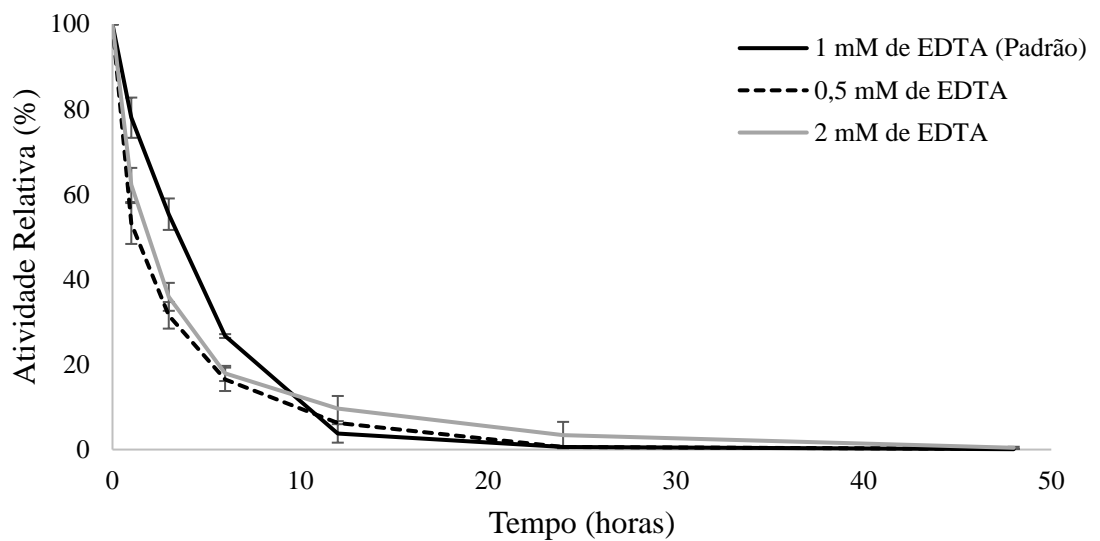


Figura 12: Estabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 37 °C durante 48 horas em condições padrão (1 mM de EDTA) do tampão de diálise (linha preta); dialisada e diluída em tampão de diálise com 0,5 mM de EDTA (linha tracejada); e dialisada e diluída em tampão de diálise com 2 mM de EDTA (linha cinza).

A proteína de fusão dialisada e diluída em tampão contendo 5 mM de NaCl se mostrou mais estável do que a proteína dialisada e diluída em tampão de diálise padrão (concentração 10 mM de NaCl). Em tampão contendo 5 mM de NaCl, a atividade luciferásica da ZZ-AmyLuc apresentou diminuição de aproximadamente 20% na primeira hora de experimento, 45% após 12 horas e 67% após 48 horas. Essa alteração tornou a proteína de fusão mais estável que a luciferase selvagem em condições padrão, na qual perdeu 80% de sua atividade após as 48 horas de experimento (PELENTIR et al., 2019). Por outro lado, a ausência de NaCl no tampão de diálise reduziu a estabilidade da proteína de fusão que perdeu ~100% de atividade após 12 horas de experimento. Entretanto, o aumento da concentração para 15 mM de NaCl no tampão de diálise não promoveu variação na estabilidade da proteína de fusão, apresentando queda de 100% da atividade após 24 horas de experimento, semelhante à curva obtida a partir do tampão de diálise padrão com 10 mM de NaCl (Fig. 13).

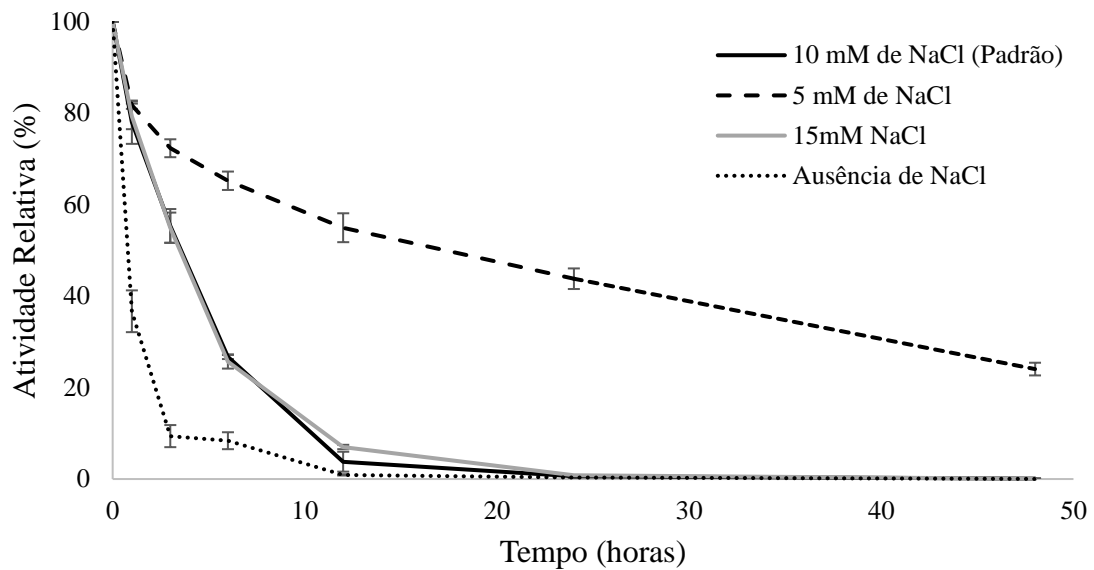


Figura 13: Estabilidade da ZZ-AmyLuc incubada a 37 °C durante 48 horas em condições padrão (10 mM de NaCl) do tampão de diálise (linha preta); dialisada e diluída em tampão de diálise com 5 mM de NaCl (linha tracejada); dialisada e diluída em tampão de diálise com 15 mM de NaCl (linha cinza); e dialisada em tampão de diálise com a ausência de NaCl (linha pontilhada).

As variações na concentração de sal em reações bioluminescentes se mostraram um fator importante relacionado com o aumento ou decaimento da atividade bioluminescente (ANDERSON et al., 1937; RODIONOVA e PETUSHKOV, 2006; YAWATA et al., 2021a; 2021b). Em vagalumes, o NaCl pode inibir a atividade luciferásica a depender da concentração (McELROY e GREEN, 1956), dessa forma, a taxa máxima de emissão de luz ocorre em forças iônicas mais baixas (ALEDORT et al., 1966). A interação eletrostática é um fator de grande importância que afeta as interações intra e intermoleculares de forma a determinar a estrutura, a dinâmica e a função das biomoléculas (NEVES-PETERSEN e PETERSEN, 2003). Dessa maneira, os íons de sal neutralizam as forças repulsivas eletrostáticas de longo alcance entre as cargas intramoleculares, além de aumentar os efeitos hidrofóbicos de forma a promover estabilidade à enzima (CURTIS et al., 1998; VALENTE et al., 2005). No entanto, o sal também pode impedir as interações eletrostáticas entre a enzima e o seu substrato, inibindo a atividade enzimática (YAWATA et al., 2021a).

Portanto, os resultados podem indicar uma relação entre a concentração de NaCl e a estabilidade da proteína de fusão ZZ-AmyLuc. Assim, a redução na concentração de NaCl

mostrou-se benéfica para a estabilidade da enzima, enquanto o aumento do sal não promoveu variação significativa e a ausência de NaCl promoveu a diminuição da estabilidade da proteína de fusão. Esses resultados podem apontar que concentrações específicas de NaCl desempenham papel crucial na preservação da atividade luciferásica ao longo do tempo.

A Tabela 1 apresenta um resumo das propriedades cinéticas e físico-químicas da proteína de fusão ZZ-AmyLuc em comparação com as propriedades da luciferase de tipo selvagem. Embora os espectros de luminescência e o pH ótimo sejam semelhantes entre as duas luciferases, a proteína de fusão demonstrou aumentos nos valores de K_M para ATP e luciferina, bem como uma redução significativa no tempo de meia-vida a 37 °C em comparação com a wtAmy. Além disso, a proteína de fusão exibiu uma constante catalítica ligeiramente superior em comparação com a luciferase do tipo selvagem. Assim, a capacidade de manter a reação bioluminescente por um período prolongado, em conformidade com os valores de K_M identificados, pode oferecer vantagens para a aplicação da ZZ-AmyLuc nos imunoenaios, uma vez que pode proporcionar uma durabilidade ampliada do sinal luminoso.

Tabela 1: Propriedades cinéticas e físico-químicas da ZZ-AmyLuc e da wtAmy.

Luciferase	λ_{max} (nm)	K_M (μM)		pH Ótimo	k_{cat}	$t_{1/2}$ (min)	Meia vida a 37 °C (h)	k_{cat}/K_M	
		ATP	LH ₂					ATP	LH ₂
<i>Amydetes viviani</i> ^a	547	9	9	8,5	109	12 ± 0,325	12	12,1	12,1
ZZ-AmyLuc	549	22	30	9,0	150 ^b	18,7 ± 2,8 ^{b,c}	3	6,8	5

^a As propriedades cinéticas e físicos químicas da wtAmy foram extraídas de Pelentir et al., 2019;

^b Propriedades extraídas de Viviani et al., 2021;

^c Tempo de meia vida da cinética de luminescência obtida na presença de CoA.

5.5. OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS E ANTÍGENOS COM ZZ-AMYLUC

A proteína de fusão é demonstradamente eficiente em detectar a nucleoproteína do SARS-CoV-2, apresentando sensibilidade elevada e eficiente que permitiu a detecção de menos de 1 ng de antígeno utilizando a câmera de fotodeteção (CCD). A fim de otimizar a sensibilidade de detecção de anticorpos e antígenos com a proteína de fusão, foram realizados primeiramente

imunoensaios com diferentes concentrações/diluições da enzima: 5 µg/mL (1/200); 2 µg/mL (1/500); 1 µg/mL (1/1000); 0,5 µg/mL (1/2000) e 0,2 µg/mL (1/5000). As concentrações de nucleoproteína variaram de 1 a 100 ng/µL em pH 7,5 (Fig. 14). Nesse primeiro ensaio os resultados foram obtidos em triplicata.

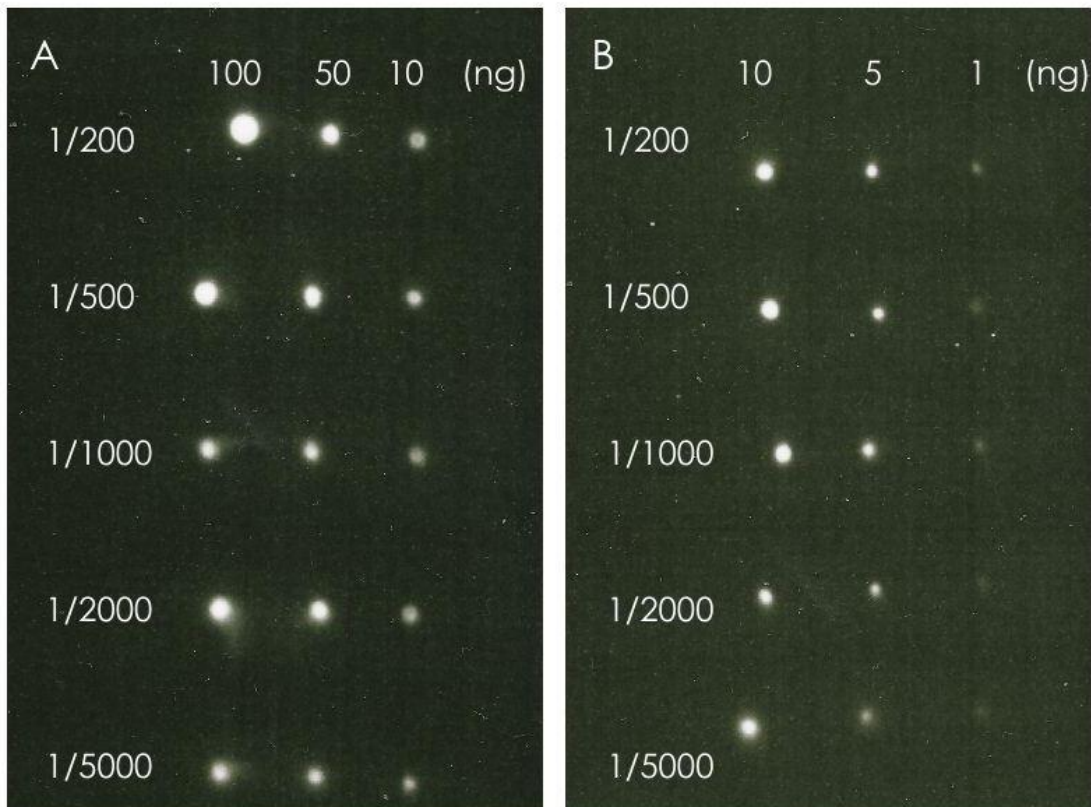


Figura 14: Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) de diferentes quantidades da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diferentes diluições (1/200-1/5000) e sua solução de ensaio: (A) após 1 minuto de exposição com concentrações de nucleoproteína variando de 10 a 100 ng; (B) depois de 5 minutos de exposição com concentrações de nucleoproteína variando de 1 a 10 ng.

Anteriormente, a proteína de fusão ZZ-AmyLuc apresentou brilho mais intenso do que aquele apresentado pelo ensaio quimioluminescente comercial da GE HealthCare que utiliza o anticorpo secundário conjugado com HRP e revelado com luminol. Além disso, a atividade específica da proteína de fusão ($5,1 \pm 0,8 \times 10^{12}$ cps/mg) foi maior que a do anticorpo secundário conjugado com HRP comercial ($2,5 \pm 0,54 \times 10^{12}$ cps/mg). Considerando que o fotomultiplicador do luminômetro apresenta maior sensibilidade na região do azul, na qual é emitido o sinal da reação de HRP/luminol (460 nm), é possível que a ZZ-AmyLuc apresente

atividade luminescente ainda maior, uma vez que seu sinal é emitido na região do verde (~550 nm). Além disto, o sinal bioluminescente emitido pela ZZ-AmyLuc é mais sustentado que o sinal quimioluminescente emitido pelo sistema HRP-luminol, uma vez que o tempo de meia vida apresentado pela proteína de fusão foi de ~30 min, enquanto o sistema HRP-luminol apresentou tempo de meia vida de apenas ~10 min. Isso indica que o sinal luminescente do ensaio com HRP não permite a visualização por muito mais que 10 min, enquanto o sinal luminescente dos imunoenaios e *Western blotting* utilizando a ZZ-AmyLuc podem ser detectados em até mais de 30 min após a adição do reagente, permanecendo intenso após 2 horas do início do ensaio (VIVIANI et al., 2021).

Considerando a eficácia da proteína de fusão em identificar 1 ng da nucleoproteína de SARS-CoV-2 em diferentes diluições de ZZ-AmyLuc, foi realizado um novo teste para determinar a concentração mínima de nucleoproteína que a ZZ-AmyLuc seria capaz de detectar. O teste foi conduzido utilizando uma diluição de 1/2000 da ZZ-AmyLuc, enquanto a concentração da nucleoproteína variou de 0,01 a 10 ng. Sob essas condições, conseguimos detectar até 0,5 ng do antígeno (Fig. 15), com melhor visualização após 5 minutos de exposição na câmera de fotodetecção.

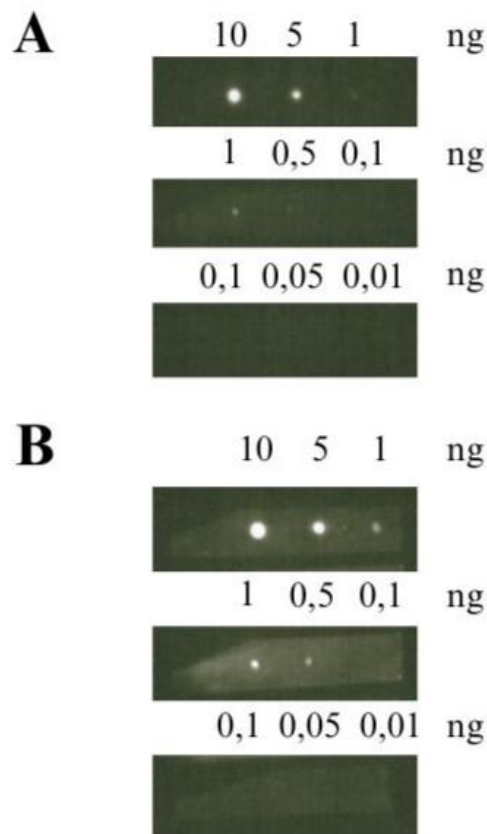


Figura 15: Imagem em câmera de fotodetecção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,01 a 10 ng de antígeno: (A) após 1 minuto de exposição; (B) depois de 5 minutos de exposição.

A fim de avaliar a performance da proteína de fusão sob diferentes condições, o imunoensaio foi realizado com tampão PBS-T contendo variações em seu pH e na concentração de NaCl. Para determinar o melhor pH de interação entre anticorpos e antígenos com a proteína de fusão no imunoensaio, o experimento foi conduzido utilizando PBS-T nos pHs 7,0 e 8,0 (Fig. 16) nas concentrações de 0,1 a 1 ng de nucleoproteína do SARS-CoV-2 e a ZZ-AmyLuc foi diluída em 1/2000 (concentração final ~0,89 mg/mL). No entanto, ambas as variações não apresentaram melhora na sensibilidade de detecção da ZZ-AmyLuc, que foi de 0,5 ng de nucleoproteína, similarmente ao imunoensaio padrão realizado em pH 7,5.

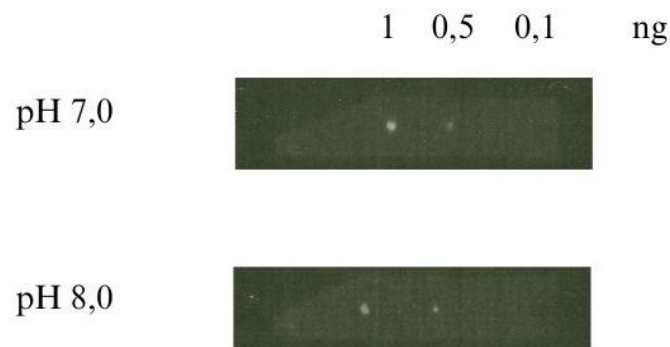


Figura 16: Imagem em câmera de fotodetecção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,1 a 1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoensaios foram realizados com tampão PBS-T nos pHs 7,0 e 8,0.

Considerando a melhora na termoestabilidade da ZZ-AmyLuc a 37 °C após a alteração na concentração de NaCl no tampão de diálise, um imunoensaio foi realizado para avaliar os efeitos da concentração do sal. Dessa forma, os experimentos foram realizados utilizando 50 mM e 150 mM de NaCl no PBS-T concentrações de 0,1 a 1 ng de nucleoproteína do SARS-CoV-2 e ZZ-AmyLuc diluída em 1/2000 (Fig. 17). Contudo, essas alterações não resultaram em melhorias na detecção da nucleoproteína, cuja detecção foi semelhante àquela observada no imunoensaio contendo a concentração padrão de 100 mM de NaCl no PBS-T.

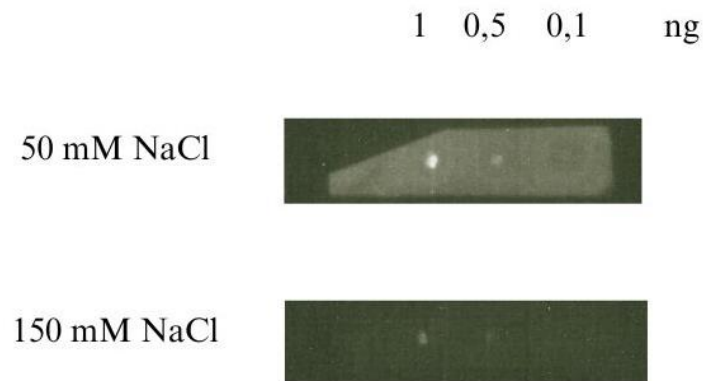


Figura 17: Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,1 a 1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoenaios foram realizados com tampão PBS-T contendo 50 mM e 150 mM de NaCl.

Outro aspecto considerado foi o tempo necessário de incubação da ZZ-AmyLuc no imunoenasiao para detectar a nucleoproteína do SARS-CoV-2. Para isso, foram realizados imunoenaios com períodos de incubação da proteína de fusão reduzidos para 20 e 40 minutos (Fig. 18) nas concentrações de 0,1 a 1 ng de nucleoproteína do SARS-CoV-2 na diluição 1/2000 de ZZ-AmyLuc. Em ambos os casos, os resultados foram semelhantes ao resultado encontrado para o tempo padrão de 1 hora de incubação que permitiu a captação de até 0,5 ng do antígeno. No entanto, a intensidade do sinal luminescente gerado pela incubação de 20 minutos foi menor em comparação com o tempo mais longo de incubação.

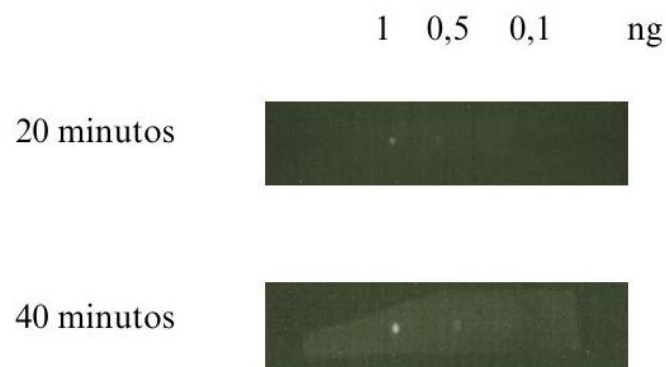


Figura 18: Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000

e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,1 a 1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. Os imunoenaios foram realizados com períodos de incubação da ZZ-AmyLuc de 20 e 40 minutos.

Ainda considerando o aumento da estabilidade da proteína de fusão a 37 °C após a redução da concentração de sal no tampão de diálise, foi realizado um imunoenasão com a ZZ-AmyLuc dialisada em tampão contendo 5 mM de NaCl (Fig. 19), nas concentrações de 0,1 a 1 ng de nucleoproteína do SARS-CoV-2 e diluição 1/2000 de ZZ-AmyLuc. No entanto, embora essa mudança tenha melhorado a estabilidade da proteína de fusão, houve uma redução no sinal luminescente da nucleoproteína do SARS-CoV-2 pela ZZ-AmyLuc. Isso resultou em uma visualização quase imperceptível do brilho quando 1 nanograma do antígeno estava presente



Figura 19: Imagem em câmera de fotodeteção (CCD) da nucleoproteína do SARS-CoV-2 incubada com concentrações fixas de anticorpo primário anti-NP (1/3000) e revelada com a ZZ-AmyLuc em diluição de 1/2000 e sua solução de ensaio, com concentrações de 0,1 a 1 ng de antígeno, após 5 minutos de exposição. O imunoenasão foi realizado com a ZZ-AmyLuc dialisada em tampão de diálise contendo 5 mM de NaCl.

Durante a execução do trabalho, um contratempo comprometeu a execução em triplicata dos experimentos que envolviam a alteração do protocolo do imunoenasão. Ao utilizar uma solução de ensaio mais recente, a detecção do complexo antígeno-anticorpo foi mais sensível, possibilitando a detecção de até 0,5 ng de nucleoproteína, ao contrário de 1 ng captado primariamente. Devido a isso, foi necessário realizar novos imunoenaios para avaliar o limiar de detecção da proteína de fusão, o que comprometeu o estoque de anticorpo anti-NP e, conseqüentemente, a realização de triplicata desses ensaios. No entanto, essa variação trouxe uma questão sobre o efeito da solução de ensaio no limiar de detecção da ZZ-AmyLuc. Provavelmente o que causou a diferença de sinal usando as diferentes preparações das soluções de ensaio foi o tempo de estoque das mesmas, sabendo-se que a luciferina em pH alcalino oxida facilmente, e assim o uso de uma solução mais nova pode ter sido responsável pela geração de

um sinal mais intenso. Assim, estudos futuros podem avaliar o efeito tanto de alterações nos padrões da solução de ensaio quanto da sua capacidade de detecção ao longo do tempo. Além disso, a realização da triplicata desses imunoenaios também ficará em aberto para próximos momentos.

Apesar dos imunoenaios realizados por Viviani et al. (2021) terem conseguido captar até 0,1 ng de nucleoproteína, os ensaios realizados neste trabalho demonstraram que o protocolo padrão é o ideal para uma detecção acurada da nucleoproteína do SARS-CoV-2, uma vez que as alterações realizadas no PBS-T e no período de incubação da proteína de fusão não trouxeram melhorias significativas para a detecção da NP pela ZZ-AmyLuc. Além disso, os estudos de termoestabilidade a 37 °C da ZZ-AmyLuc dialisada e diluída em tampão de diálise contendo 5 mM de NaCl evidencia uma ligeira melhoria para a preparação e estocagem da proteína de fusão em temperaturas mais baixas. No entanto, o imunoenaso utilizando a nucleoproteína dialisada nessa condição não foi capaz de detectar a nucleoproteína de forma eficiente.

Portanto, o presente estudo realizou a caracterização cinética e físico-química da proteína de fusão ZZ-AmyLuc. Isso incluiu a determinação dos valores de K_M para ATP e LH_2 , a identificação do pH ótimo para a reação bioluminescente, a caracterização dos espectros de luminescência e a avaliação da termoestabilidade da proteína de fusão. Simultaneamente, foram investigadas variáveis que poderiam influenciar a sensibilidade de detecção da ZZ-AmyLuc em imunoenaios bioluminescentes. Os resultados indicam um desempenho ideal da proteína de fusão nas condições originalmente estabelecidas nos imunoenaios. No entanto, destaca-se a necessidade de uma investigação mais detalhada sobre a estabilidade da solução de ensaio utilizada para revelar a reação bioluminescente, considerando que ainda existe margem para melhorar a sua estabilidade e atividade, mediante alteração das concentrações dos reagentes ATP, luciferina e aditivos, e assim aumentar o a intensidade do sinal bioluminescente e o limite de detecção.

6. CONCLUSÕES

A proteína de fusão ZZ-AmyLuc possui alta atividade de bioluminescência, com estabilidade e sensibilidade de detecção em imunoenaios comparável aos kits quimioluminescentes comerciais. Considerando as potenciais aplicações da ZZ-AmyLuc e suas vantagens na utilização em imunoenaios, esse trabalho teve como objetivo realizar a caracterização físico-química e cinética mais detalhada desta proteína, e otimizar a estabilidade da proteína e sensibilidade de detecção de antígeno para uso efetivo em imunoenaios bioluminescentes. Foram determinados os K_M s da proteína de fusão para a luciferina e ATP, pH ótimo, espectro de luminescência em diferentes pHs e termoestabilidade da ZZ-AmyLuc. Apesar das modificações feitas na luciferase mediante a construção da proteína de fusão, as suas propriedades de atividade luminescente e espectrais assemelham-se muito as encontradas para a luciferase de *Amydetes* selvagem, exceto para os valores de K_M para ATP e luciferina que foram aumentados, em concordância com a cinética luminescente mais lenta. A luminescência mais sustentada por um longo período pode estar relacionada com o K_M da proteína de fusão e pode representar um diferencial para utilização em imunoenaios.

Nos ensaios para otimização de detecção da nucleoproteína do SARS-CoV-2, conseguimos detectar até 0,5 ng de NP. Esses resultados destacam a necessidade de investigações adicionais para compreender os fatores que podem afetar o limiar de detecção deste imunoenaiio bioluminescente, como o impacto de variações da solução de ensaio e a sua estabilidade ao longo do tempo, indicando um caminho importante para estudos futuros. Além disso, os resultados dos imunoenaios apontam para a melhor eficácia na detecção da nucleoproteína quando o protocolo padrão é realizado. Por fim, vale ressaltar que o desempenho na detecção da nucleoproteína do SARS-CoV-2 e seu anticorpo torna a proteína de fusão uma ferramenta inovadora para uso em imunoenaios bioluminescentes e *Western Blotting*.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMS, M. e TOWNSEND, L. Bioluminescence in Dinoflagellates: a test of the burgular alarm hypothesis. **Ecology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 258-260, jan. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/1939521>.

ALEDORT, L. et al. Ionic effects on firefly bioluminescence assay of red blood cell ATP. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 268-277, nov. 1966. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90205-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(66)90205-3).

ALIPOUR, B. et al. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 325, n. 1, p. 215-222, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.022>.

AMARAL, D. et al. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: elateridae), a brazilian click-beetle with a single abdominal lantern. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1259-1267, jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c2pp25037c>.

AMARAL, D. et al. A new orange emitting luciferase from the Southern-Amazon *Pyrophorus angustus* (Coleoptera: elateridae) click-beetle. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 1148-1154, set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c6pp00165c>.

ANDERSON, R. Chemical Studies on Bioluminescence. IV. Salt Effects on the Total Light Emitted by a Chemiluminescent Reaction1. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 59, n. 11, p. 2115-2117, nov. 1937. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01290a009>.

BEVILAQUA, V. et al. Phrixotrix luciferase and 6'-aminoluciferins reveal a larger luciferin phenolate binding site and provide novel far-red combinations for bioimaging purposes. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, 21 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44534-3>.

BRANCHINI, B. et al. A Mutagenesis Study of the Putative Luciferin Binding Site Residues of Firefly Luciferase. **Biochemistry**, [S.L.], v. 42, n. 35, p. 10429-10436, 13 ago. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi030099x>.

BRANCHINI, B. et al. An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase. **Biochemistry**, [S.L.], v. 43, n. 23, p. 7255-7262, 20 maio 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi036175d>.

BRANCHINI, B. et al. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S.L.], v. 145, n. 2, p. 159-167, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.06.001>.

BRASIER, A. e RON, D. Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 386-397, 1992. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)16036-j](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(92)16036-j).

CAMPBELL, A. **Chemiluminescence. Principles and applications in biology and medicine**. Alemanha: VCH, 1988

CARVALHO, M. et al. Luciferase isozymes from the Brazilian *Aspisma lineatum* (Lampyridae) firefly: origin of efficient ph-sensitive lantern luciferases from fat body ph-insensitive ancestors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1750-1764, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/d0pp00272k>.

CHAPPELLE, E. et al. Determination of bacterial content in fluids. **Bioluminescence And Chemiluminescence**, [S.L.], p. 65-72, 1978. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(78\)57009-2](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(78)57009-2).

CHEN, C. et al. Immobilized protein ZZ, an affinity tool for immunoglobulin isolation and immunological experimentation. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 87-92, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1042/ba20060055>.

CONTAG, C. e BACHMANN, M. Advances in In Vivo Bioluminescence Imaging of Gene Expression. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 235-260, ago. 2002. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.111901.093336>.

CURTIS, R. et al. Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes. **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 11-21, 5 jan. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980105\)57:13.0.co;2-y](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980105)57:13.0.co;2-y).

DELUCA, M. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 160-166, 1 jan. 1969. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00829a023>.

DEVINE, J. et al. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cdna, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Gene Structure And Expression**, [S.L.], v. 1173, n. 2, p. 121-132, maio 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90172-a](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(93)90172-a).

DREVET, P. et al. High-Level Production and Isotope Labeling of Snake Neurotoxins, Disulfide-Rich Proteins. **Protein Expression And Purification**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 293-300, ago. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/prep.1997.0740>.

EDINGER, M et al. Noninvasive Assessment of Tumor Cell Proliferation in Animal Models. **Neoplasia**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 303-310, out. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.neo.7900048>.

FRANK, L. et al. Use of proZZ-obelin Fusion Protein in Bioluminescent Immunoassay. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 219, n. 2, p. 475-479, fev. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.0258>.

FRANK, L. et al. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 325, n. 2, p. 240-246, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.003>.

GABRIEL, G. et al. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 445, p. 73-79, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.017>.

GABRIEL, G. et al. Engineering the metal sensitive sites in *Macrolampis* sp2 firefly luciferase and use as a novel bioluminescent ratiometric biosensor for heavy metals. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 408, n. 30, p. 8881-8893, 4 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-0011-1>.

GARG, S. et al. Express ELISA for detection of mortalin. **Biotechniques**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 166-171, out. 2019. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/btn-2018-0158>.

GREER, L. E SZALAY, A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. **Luminescence**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 43-74, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.676>.

HALJASMÄGI, L. et al. LIPS method for the detection of SARS-CoV-2 antibodies to spike and nucleocapsid proteins. **European Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 50, n. 8, p. 1234-1236, 6 jul. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.202048715>.

HANNA, B. Detection of bacteriurea by bioluminescence. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 22-27, 1986. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)33052-0](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(86)33052-0).

HASTINGS, J. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. **Journal Of Molecular Evolution**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 309-321, set. 1983. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02101634>.

HASTINGS, J. Bioluminescence. In: SPERELAKIS, N. **Cell Physiology**. Nova Iorque: Academic Press, 2001. p. 1115-1131.

HIRANO, T. et al. Spectroscopic Studies of the Light-Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 131, n. 6, p. 2385-2396, 21 jan. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja808836b>.

HOLM-HANSEN, O. e KARL, D. Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples. **Bioluminescence And Chemiluminescence**, [S.L.], p. 73-85, 1978. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(78\)57010-9](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(78)57010-9).

HWANG, B. et al. A homogeneous bioluminescent immunoassay to probe cellular signaling pathway regulation. **Communications Biology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1, 3 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-019-0723-9>.

KAJIYAMA, N. e NAKANO, E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. **Protein Engineering, Design And Selection**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 691-693, 1991. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/4.6.691>.

KESSLER, S. Rapid Isolation of Antigens from Cells with A Staphylococcal Protein A-Antibody Adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein a. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 115, n. 6, p. 1617-1624, 1 dez. 1975. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.115.6.1617>.

KESSLER, S. et al. Use of protein A—bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 442-459, 1981. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)73084-2](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(81)73084-2).

KOJOURI, M. et al. Performance of Commercially Antibody-based assays for Covid-19 Detection. **American Journal Of Biomedical Science & Research**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 461-471, 12 ago. 2020. BiomedGrid LLC. <http://dx.doi.org/10.34297/ajbsr.2020.09.001453>.

KOBATAKE, E. et al. Bioluminescent Immunoassay with a Protein A-Luciferase Fusion Protein. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 208, n. 2, p. 300-305, fev. 1993. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1050>.

KOVACS, S. e METTENLEITER, T. Firefly Luciferase as a Marker for Herpesvirus (pseudorabies virus) Replication in Vitro and in Vivo. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 72, n. 12, p. 2999-3008, 1 dez. 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-12-2999>.

LI, Z. et al. An Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Heptamer Fusion for the Detection of Tetrabromobisphenol A in Sediment. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 92, n. 14, p. 10083-10090, 19 jun. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01908>.

LINDBLADH, C. et al. Preparation of a genetically fused protein A/luciferase conjugate for use in bioluminescent immunoassays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 137, n. 2, p. 199-207, mar. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90025-b](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(91)90025-b).

MCCAPRA, F. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. In: CAMPBELL, A et al. **Bioluminescence and chemiluminescence: fundamental and applied aspects**. Chichester: John Wiley And Sons, 1994. p. 387-391.

MCCONAHEY, P. e DIXON, F. [11] Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 210-213, 1980. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(80\)70050-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(80)70050-2).

MCELROY, W e DELUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. In: HERRING, Peter. **Bioluminescence in Action**. Nova Iorque: Academic Press, 1978. p. 109-127.

MCELROY, W. e GREEN, A. Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 257-271, out. 1956. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(56\)90268-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(56)90268-5).

MITTAL, S. et al. Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter. **Virus Research**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 67-90, abr. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702\(93\)90090-a](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702(93)90090-a).

MOREIRA, A. et al. Cloning and molecular properties of a novel luciferase from the Brazilian *Bicellonycha lividipennis* (Lampyridae: photurinae) firefly. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 1559-1571, 19 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43630-022-00240-0>.

NAKATSU, T. et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, [S.L.], v. 440, n. 7082, p. 372-376, mar. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04542>.

NAYLOR, L. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 58, n. 5, p. 749-757, set. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00096-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00096-9).

NESBITT, S. e HORTON, M. A nonradioactive biochemical characterization of membrane proteins using enhanced chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 206, n. 2, p. 267-272, nov. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90365-e](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(92)90365-e).

NETO, A. **Aspectos comparativos das luciferases pH-insensitivas de *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) e *Phrixotrix* sp. (Coleoptera: Phengodidae): Expressão, purificação e propriedades do sítio ativo**. 2009. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009.

NEVES-PETERSEN, M. e PETERSEN, S. Protein electrostatics. **Biotechnology Annual Review**, [S.L.], p. 315-395, 2003. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656\(03\)09010-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1387-2656(03)09010-0).

NISHIMIYA, Y. et al. Molecular evolution of *Cypridina noctiluca* secretory luciferase for production of spectrum-shifted luminescence-emitting mutants and their application in nuclear receptor–reporter assays. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], p. 1, 16 set. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.13857>.

NIWA, K. et al., 2023. Quantitative Analysis of Bioluminescence Optical Signal. **Biosensors**, v. 13, p. 223. Doi: 10.3390/bios13020223.

OHMIYA, Y. et al. CLONING, EXPRESSION and SEQUENCE ANALYSIS OF cDNA FOR THE LUCIFERASES FROM THE JAPANESE FIREFLIES, *Pyrocoelia tniyako* AND *Hotaria*

parvula. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 62, n. 2, p. 309-313, ago. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05273.x>.

PELENTIR, G. et al. A highly efficient, thermostable and cadmium selective firefly luciferase suitable for ratiometric metal and pH biosensing and for sensitive ATP assays. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 2061-2070, ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c9pp00174c>.

PHONBUPPHA, J. et al. High sensitivity and low-cost flavin luciferase (FLUXVc)-based reporter gene for mammalian cell expression. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 299, n. 5, p. 104639, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104639>.

REN, W. et al. One-Step Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Fusion for Detection of Aflatoxin B1 in Cereal. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 67, n. 18, p. 5221-5229, 18 mar. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00688>.

RODA, A. et al. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 307-322, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.015>.

RODIONOVA, N. e PETUSHKOV, V. Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid *Fridericia heliota*. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 83, n. 2, p. 123-128, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.014>.

SALA-NEWBY, G. et al. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyris noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 313, n. 3, p. 761-767, 1 fev. 1996. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3130761>.

SALA-NEWBY, G. et al. **Fluorescent and luminescent probes for biological activity**. Londres: Academic Press, 1999.

SILVA NETO, A. et al. *Pyrearinus termitilluminans* larval click beetle luciferase: active site properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 1748-1754, dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/b9pp00053d>.

SILVEIRA, L. e MERMUDES, J. Systematic review of the firefly genus *Amydetes* Illiger, 1807 (Coleoptera: lampyridae), with description of 13 new species. **Zootaxa**, [S.L.], v. 3765, n. 3, p. 201, 18 fev. 2014. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3765.3.1>.

SMIRNOVA, D. e UGAROVA, N. Firefly Luciferase-based Fusion Proteins and their Applications in Bioanalysis. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 436-447, 30 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.12656>.

STANLEY, P. A survey of some commercially available kits and reagents which include bioluminescence or chemiluminescence for their operation: including immunoassays, hybridization, labels, probes, blots and atp :based rapid microbiology. products from more than forty companies. **Journal Of Bioluminescence And Chemiluminescence**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 51-63, mar. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1170080202>.

SYED, A. e ANDERSON, J. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 50, n. 9, p. 5668-5705, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0cs01492c>.

TAKAHASHI, R. et al. Establishment of a novel method to evaluate peritoneal microdissemination and therapeutic effect using luciferase assay. **Cancer Science**, [S.L.], v. 107, n. 3, p. 341-346, 9 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12872>.

TATSUMI, H. et al. Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *escherichia coli*. **Journal Of Bioluminescence And Chemiluminescence**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 75-78, abr. 1989. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bio.1170030208>.

TATSUMI, H. et al. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Gene Structure And Expression**, [S.L.], v. 1131, n. 2, p. 161-165, jun. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90071-7](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(92)90071-7).

TIFFEN, J. et al. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 22 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-299>.

TOMIMURO, K. et al. Thread-Based Bioluminescent Sensor for Detecting Multiple Antibodies in a Single Drop of Whole Blood. **ACS Sensors**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 1786-1794, 22 maio 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssensors.0c00564>.

UGAROVA, N. e BROVKO, L. Relationship between the structure of the protein globule and bioluminescence spectra of firefly. **Russian Chemical Bulletin**, [S.L.], v. 50, n. 10, p. 1752-1761, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1014365609421>.

VALENTE, J. et al. Second Virial Coefficient Studies of Cosolvent-Induced Protein Self-Interaction. **Biophysical Journal**, [S.L.], v. 89, n. 6, p. 4211-4218, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.068551>.

VIVIANI, V. et al. Cloning, Sequence Analysis, and Expression of Active Phrixothrix Railroad-Worms Luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. **Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 26, p. 8271-8279, 1 jun. 1999a. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi9900830>.

VIVIANI, V. et al. Cloning and Molecular Characterization of the cDNA for the Brazilian Larval Click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 254, 1999b. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(1999\)0702.3.co;2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(1999)0702.3.co;2).

VIVIANI, V. et al, Thérèse. Two Bioluminescent Diptera: the north american *orfeia fultoni* and the australian *arachnocampa flava*. similar niche, different bioluminescence systems. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 22, 2002. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0752.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0752.0.co;2)

VIVIANI, V. et al. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with european *lampyris noctiluca* and asiatic *pyrocoelia* luciferases. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 151-156, out. 2004a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.05.012>.

VIVIANI, V. et al. A New Firefly Luciferase with Bimodal Spectrum: identification of structural determinants of spectral ph-sensitivity in firefly luciferases. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 843, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1562/2004-12-09-ra-398r.1>.

VIVIANI, V. et al. 2008. The structural origin and biological functions of pH-sensitivity in beetle luciferases. **Photochem. Photob.**, v. 8, p. 159-169. Doi: <https://doi.org/10.1039/b714392c>

VIVIANI, V. et al. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: lampyridae) firefly. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1879-1886, dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c1pp05210a>.

VIVIANI, V. et al. Bioluminescence of Beetle Luciferases with 6'-Amino-d-luciferin Analogues Reveals Excited Keto-oxyluciferin as the Emitter and Phenolate/Luciferin Binding Site Interactions Modulate Bioluminescence Colors. **Biochemistry**, [S.L.], v. 53, n. 32, p. 5208-5220, 4 ago. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi500160m>.

VIVIANI, V. et al. Glu311 and Arg337 Stabilize a Closed Active-site Conformation and Provide a Critical Catalytic Base and Counteraction for Green Bioluminescence in Beetle Luciferases. **Biochemistry**, [S.L.], v. 55, n. 34, p. 4764-4776, 18 ago. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00260>.

VIVIANI, V. et al. The proton and metal binding sites responsible for the pH-dependent green-red bioluminescence color tuning in firefly luciferases. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, 4 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33252-x>.

VIVIANI, V. et al. A Novel Brighter Bioluminescent Fusion Protein Based on ZZ Domain and *Amydetes vivianii* Firefly Luciferase for Immunoassays. **Frontiers In Bioengineering And**

Biotechnology, [S.L.], v. 9, 18 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.755045>.

VIVIANI, V. et al. Bioluminescence Color-Tuning Firefly Luciferases: engineering and prospects for real-time intracellular ph imaging and heavy metal biosensing. **Biosensors**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 400, 10 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bios12060400>.

VIVIANI, V. et al. Aula Prática: efeito de cádmio e ph na função de uma enzima. **Revista de Ensino de Bioquímica**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 164-178, 30 dez. 2023. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v21i2.1048>.

VIVIANI, V. e OHMIYA, Y. Bioluminescence Color Determinants of Phrixothrix Railroad-worm Luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of arg 215 and guanidine effect. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 267-271, 2006. American Society for Photobiology. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0720267bcdopr2.0.co2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720267bcdopr2.0.co2).

WANG, K. et al. Quantitative immunohistochemistry using an antibody-fused bioluminescent protein. **Biotechniques**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 302-306, out. 2020. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/btn-2020-0006>.

WET, J. et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 82, n. 23, p. 7870-7873, dez. 1985. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.23.7870>.

WHITE, E. et al. The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 1, n. 1-2, p. 92-122, set. 1971. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-2068\(71\)90009-5](http://dx.doi.org/10.1016/0045-2068(71)90009-5).

WILSON, T. COMMENTS ON THE MECHANISMS OF CHEMI- AND BIOLUMINESCENCE. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 601-606, out. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb08706.x>.

WOOD, K. et al. Complementary DNA Coding Click Beetle Luciferases Can Elicit Bioluminescence of Different Colors. **Science**, [S.L.], v. 244, n. 4905, p. 700-702, 12 maio 1989. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2655091>.

YAWATA, S. et al. Mutant firefly luciferase enzymes resistant to the inhibition by sodium chloride. **Biotechnology Letters**, [S.L.], 4 maio 2021a. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-021-03109-x>.

YAWATA, S. et al. Improved bioluminescence-based endotoxin measurement method using a salt-resistant luciferase mutant. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 633, p. 114408, nov. 2021b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2021.114408>.

YE, L. et al. Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [S.L.], v. 1339, n. 1, p. 39-52, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(96\)00211-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(96)00211-7).

ZHANG, X. et al. Genetically Fused Protein A–Luciferase for Immunological Blotting Analyses. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 282, n. 1, p. 65-69, jun. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.2000.4584>.