

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CATALASE DE *Oryza sativa* VISANDO A UTILIZAÇÃO NA ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM PLANTAS SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO

MARA ANDRADE COLARES MAIA¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO³; RAFAEL CAGLIARI⁴; AMANDA SILVA HECKTHEUER⁵; LUCIANO DA SILVA PINTO⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - maracamaia@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

³ Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - laurajcamargo@gmail.com

⁴ Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - rafael.cagliari@hotmail.com

⁵ Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) - amandasheck@hotmail.com

⁶ BioPro Lab., Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas-orientador: ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em condições naturais, ou mesmo de cultivo *in vitro*, as plantas estão constantemente expostas a adversidades que causam interferência em sua homeostase. Situações que provoquem distúrbios de ordem fisiológica reduzem a eficiência das plantas acarretando perdas de produtividade e redução na produção dos sistemas agrícolas (Taiz e Zeiger, 2004). Os diferentes tipos de estresses podem acarretar acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células vegetais, dentre elas o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Moller et al. 2007). Para evitar danos oxidativos, a concentração das EROs é mantida em níveis não tóxicos, na maioria das vezes por meio de mecanismos antioxidantes enzimáticos (Foyer e Noctor 2003; Moller et al. 2007). Dentre os mecanismos enzimáticos envolvidos, destacamos as catalases (CATs), como agentes de importância vegetal quando os espécimes estão submetidos as condições adversas de salinidade. Portanto, as catalases vegetais são importantes marcadores moleculares de estresse vegetal (Ferreira, 2008) e sua detecção em determinado tecido vegetal indica que o mesmo está sofrendo algum tipo de estresse.

O arroz é terceira mercadoria mais produzida no mundo, sendo também o segundo cereal em produtividade, totalizando mais de 722 milhões de toneladas em todo o mundo (FAOSTAT, 2015). Diante deste fato, o arroz assume uma grande importância social e econômica, uma vez que segundo estimativas do International Rice Research Institute (IRRI, 2015), cerca de metade da população mundial dependem do arroz para se alimentar.

A detecção de catalase em tecidos vegetais pode ser realizada por técnicas que quantifiquem a expressão gênica a nível de mRNA (Sreenivasulu et al., 2007). Porém, existe controle de expressão gênica a nível pós-transcricional, provocando diferenças entre os níveis de mRNA de um determinado gene e a quantidade de proteína realmente expressa (Ferreira, 2008). Desta forma, a detecção de catalase a nível proteico resolve este problema. Para isso, existem técnicas de elevado custo financeiro, tais como espectrometrias de massa, e outras mais acessíveis, como detecção imunológica da proteína por anticorpos específicos em técnicas como Western blotting (WB) semi-quantitativo, Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e Imunofluorescência (IFA). A abordagem de detecção imunológica de proteínas expressas em tecidos vegetais carece de

insumos tais como anticorpos específicos contra catalase de arroz. O objetivo deste trabalho foi clonar um fragmento do gene que expressa catalase isoforma A (CATA), obter a proteína recombinante correspondente e produzir anticorpos policlonais capazes de reconhecer a proteína nativa em *O. sativa*, a fim de detectar o estresse em diferentes condições.

2. METODOLOGIA

Analisando a sequência de aminoácidos de CATA de *O. sativa* cultivar Japonica, foi selecionado um fragmento predito como hidrofílico, correspondente aos aminoácidos 1003-1431. O fragmento de 510 pb foi amplificado por PCR e clonado no vetor pAE de expressão em *Escherichia coli* (pAE/CAT), segundo protocolo já estabelecido (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O vetor recombinante foi submetido a sequenciamento para confirmar a construção correta do mesmo. O vetor recombinante foi inserido em *E. coli* BL21(DE3) Star™ por choque térmico e em seguida, a cepa foi cultivada em 25 mL de LB líquido com ampicilina (LB/AMP) por 16h, a 37°C sob agitação. Este cultivo foi utilizado para inocular 500 mL de LB/AMP e incubado nas mesmas condições até atingir a fase exponencial, quando a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1 M de IPTG por 3 h. As células foram coletadas por centrifugação, solubilizadas em tampão de purificação de proteínas recombinantes e lisadas por sonicação. Após nova centrifugação o *pellet* foi ressuspensionado no mesmo tampão, agora contendo uréia, e novamente centrifugado. Ambos sobrenadantes foram avaliados em eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) para identificar a solubilidade da proteína recombinante expressa. Catalase recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. As alíquotas da purificação foram verificadas em SDS-PAGE e aquelas contendo proteína pura foram combinadas para diálise contra tampão fosfato-salino (PBS). rCAT purificada foi observada por SDS-PAGE e Western blot (WB) utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis e quantificada utilizando o método BCA por kit comercial (Pierce/Thermo Scient.).

Dois ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) de 4-6 semanas foram utilizados para obtenção do anticorpo policlonal contra CATA. Foram realizadas três imunizações, por injeções via intraperitoneal, com intervalo de 3 semanas entre a primeira imunização e primeira dose de reforço, e duas semanas entre a primeira e segunda dose de reforço. Cada dose era composta de 50 µg da proteína recombinante diluída para 300 µl de PBS e emulsificada com o mesmo volume de adjuvante de Freund completo na primeira dose e incompleto nas 2 doses reforço. Por fim, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia por isofurano, seguido de exsanguinação cardíaca. O sangue foi centrifugado a 5000xg, 10 min, 4 °C, e o soro contendo anticorpos contra rCATA foi separado, alíquotado e armazenado a -20 °C. O soro foi avaliado por WB quanto a sensibilidade e especificidade de detecção de rCATA. Para isso, diferentes concentrações da proteína recombinante foram separadas em SDS-PAGE (1,5-100 ng/linha), juntamente com controle negativo composto de extrato bruto de *E. coli*. Após SDS-PAGE as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado pela incubação em leite em pó 5% por 16h a 4 °C, sob agitação. Em seguida, o anticorpo policlonal foi diluído 1:3000 em solução de bloqueio e adicionado a membrana, com incubação a temperatura ambiente, por 1 h sob agitação. Após 3 lavagens com PBS-T (PBS + 0.05% de Tween 20), uma nova incubação nas mesmas condições foi realizada, desta vez com anticorpo antiIgG de rato conjugado com peroxidase na diluição 1:3000. A reação foi desenvolvida pela

adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPel, processo nº 1972-2016.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência codificadora da rCAT foi eficientemente clonado no vetor pAE, conforme demonstrado no sequenciamento do vetor recombinante. Depois da indução com IPTG, as células de *E.coli* BL21(DE3) Star expressaram uma proteína recombinante de aproximadamente 19 kDa, correspondente ao fragmento de rCAT (Fig 1A). O fragmento proteico foi purificado por cromatografia de afinidade ao níquel (Fig. 1A) e reconhecida pelo WB utilizando anticorpo anti-6xHis (Fig. 1B). A obtenção do soro advindo dos ratos foi realizada com sucesso. No Western blotting, (Fig.2) o anticorpo policlonal anti-catalase recombinante (pAb anti-rCAT) foi capaz de reagir com a proteína na sua forma recombinante, reconhecendo a banda com peso molecular de 19kDa, revelando assim a eficiência na produção e reconhecimento de tais anticorpos até a quantidade de 6,25 ng de proteína. Apesar de ter conter uma banda mais abaixo a catalase, esta não deve vir a interferir no prosseguimento da pesquisa, uma vez que pode se caracterizar como alguma proteína de *E. Coli* advinda da purificação

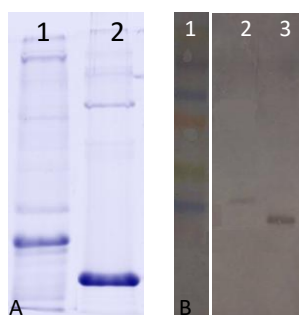


Figura 1

Figura1: Caracaterização geral da proteína recombinante A.Eletroforese em gel de policrilamida 12% mostrando a rCAT após processo de cromatofgrafia e liofilização da proteína. 1.rCAT purificada com aproximadamente19kDa. 2. Proteína de peso molecular conhecido 16kDa B: Western blotting utilizando anticorpo anti-6xHis, com intenção de se confirmar a expressão da proteína recombinante. 1. Marcador de peso molecular (*Rainbow protein marker full range* – BioRad) 2. Indicação dos fragmento recombiante apresentando-se com 19kDa 3. Proteína de peso molecular conhecido 16kDa.

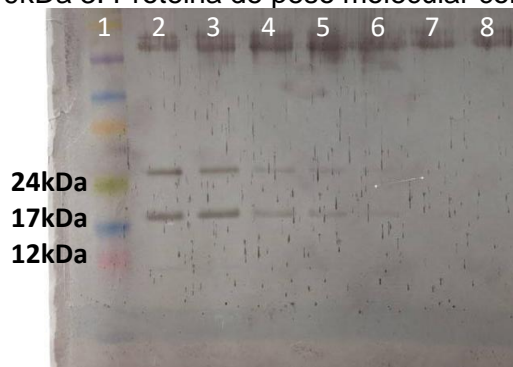


Figura 2

Figura 2: Western blotting para a caracterização do pAbs anti-rCat. 1: Marcador de peso molecular (*Rainbow protein marker full range* – BioRad) 2: 100ng de rCAT; 3: 50ng de rCAT; 4: 25ng de rCAT; 5: 12,5ng de rCAT; 6: 6,25ng de rCAT; 7: 3.125 ng de rCAT; 8: 1,56ng de rCAT.

4. CONCLUSÕES

Os pAbs anti-rCAT produzidos foram capazes de reconhecer o fragmento proteico recombinante da catalase. Nossos próximos avanços, incluem a realização da proteômica e desta forma a confirmação que o anticorpo reconhece a proteína nativa. Esses pAbs podem ser utilizados em pesquisas visando a detecção de plantas de arroz que se mostrem resistentes ou tolerantes ao estresse causado quando submetidas a condições adversas, uma vez que superexpressão tal proteína.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA J.M., FIDALGO F., CONFRARIA A., SANTOS A., PIRES H.; SANTOS I. Effect of hydrogen peroxide on catalase gene expression, isoform activities and levels in leaves of potato sprayed with homobrassinolide and ultrastructural changes in mesophyll cells. **Functional Plant Biology** v.32, p. 707–720, 2005.

FAOSTAT, 2015 Food and Agriculture Organization of the United Nations, The statistics division. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em julho de 2016.

FERREIRA, B. S. **Expressão diferencial de genes envolvidos na resposta ao estresse salino em cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) e arroz (*Oryza sativa*)** 2008. 149f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2008

FOYER, C.H.; NOCTOR, G.. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum** v.119 p. 355-364, 2003

IRRI, 2015. International Rice Research Institute. Disponível em: <<http://irri.org/>>. Acesso em Julho de 2016.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A.. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology** v.58, p. 459-481, 2007

QUEIRÓS, M. F. M. A. **Tolerância à salinidade em linha celular de *Solanum tuberosum* L. – estudo bioquímico, proteômico e ultraestrutural**. 2012. 271f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2012

SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001. 1-2368p.

SANTOS I., FIDALGO F., ALMEIDA J.M.; SALEMA R. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. **Plant Science** v.167, p.925–935, 2004.

SREENIVASULU, N.; SOPORY, S. K.; KAVI KISHOR, P. B. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene**, v. 388, p. 1–13, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. p.720 , 2004.