

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM FOLHAS DE ARROZ DA CULTIVAR BRS AG

GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA¹; DIEGO SERRASOL AMARAL¹; ISABEL LOPES VIGHI²; AMILTON SEIXAS NETO²; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹ Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPEL
guima.sousa07@gmail.com; diegos.amaral@outlook.com

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, CDTec, UFPEL - isavighi@hotmail.com

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPEL - amiltonseixas@gmail.com

³ Laboratório de Bioinformática e Proteômica, PPGBiotec- dmpluc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A proteômica é uma técnica que analisa a expressão de proteínas que compõe o proteoma, lidando com o isolamento, identificação e caracterização de proteínas, incluindo as mudanças na estrutura e abundância em resposta a estímulos ambientais e de desenvolvimento. Técnicas de proteômica tem se destacado nos últimos anos levando à um aumento em sua aplicação em todos os campos biológicos, incluindo a ciência de plantas (ISAACSON et al., 2006). Ferramentas proteômicas baseadas em eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa (MS) fornecem uma abordagem eficaz para investigar a resposta molecular das plantas aos diferentes estímulos ambientais, inclusive aqueles relacionados ao estresse (SHU et al.; 2010).

No entanto, a extração de proteínas dos tecidos vegetais representa um grande desafio para a análise proteômica, pois tecidos vegetais geralmente contêm quantidades baixas de proteínas, altas concentrações de proteases e diversos compostos que interferem na subsequente separação e identificação de proteínas. Além disso, a parede celular vegetal é normalmente difícil de fragmentar, dificultando a lise celular e a obtenção de muitas proteínas. Um protocolo de extração de proteínas deve ser eficaz e adaptável à grande variação nos conjuntos de metabólitos secundários e compostos potencialmente contaminantes que ocorrem entre os tecidos, como por exemplo, folhas, raízes, frutos, sementes e caules (ISAACSON et al., 2006).

Nessa perspectiva, o objetivo do presente trabalho foi testar e comparar três protocolos distintos de extração de proteínas em folhas de arroz da cultivar BRS AG, a fim de avaliar e identificar o seu perfil proteômico.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

O experimento foi conduzido no laboratório de Bioinformática e Proteômica do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da UFPEL, no qual testou-se três protocolos de extração de proteínas utilizando como material vegetal folhas de arroz da cultivar BRS AG.

2.2 Protocolos

O primeiro protocolo usado para extração das proteínas foi o método que usa ácido tricloracético (TCA) e acetona com pequenas modificações (GIAVALISCO et al. 2003; MECHIN et al. 2003). Para isso, 200 mg de folhas de

arroz foram maceradas em nitrogênio líquido e misturadas com 1mL de acetona gelada, contendo 10% de TCA e 0,07% diltiotreitol (DTT) e, em seguida, transferiu-se as amostras para eppendorfs de 1,5 mL, os quais foram mantidos a -20°C por uma hora. As amostras foram centrifugadas a 11000 rpm durante 10 minutos e os pellets ressuspensos com cetona gelada com 0,07% de DTT. Os eppendorfs foram mantidos por mais uma hora a -20°C e centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C . Todas as etapas foram repetidas duas vezes. Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e os pellets secos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 100 microlitros (μL) da solução de lise (9M ureia, 2M tiourea, 1% DTT e 4% CHAPS) aos pellets. As amostras foram incubadas a 30°C por uma hora e, em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 110000 rpm, por 15 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos eppendorfs, sendo armazenados a -20°C .

O segundo protocolo envolveu a extração de proteínas usando fenol, (ISAACSON et al., 2006), com modificações. Neste protocolo, o tecido vegetal (200 mg) foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 1 mL de tampão de extração (Tris 500 mM pH 8,5, 500 mM NaCl, 700 mM sacarose, 10 mM EDTA, 2% β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 0,05% TWen-20). A seguir, foi adicionado igual volume de fenol saturado com Tris (pH 7,5). Agitou-se a mistura vigorosamente durante 30 min. a 4°C e depois centrifugou-se a 5000 g durante 30 min. a 4°C . A fase superior de fenol contendo as proteínas foi coletada e acrescentou-se cinco vezes o volume da fase de fenol de acetato de amônio (0,1 M). Misturou-se bem e manteve-se a precipitação durante a noite a -20°C . No dia seguinte, a mistura foi centrifugada a 5000 g durante 30 min. a 4°C . O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram lavados duas vezes em metanol gelado e três vezes em acetona gelada. Os pellets foram secos a temperatura ambiente e adicionou-se solução de lise como descrito para o protocolo de TCA- acetona- até a sua dissolução.

Para o terceiro protocolo, foi desenvolvida uma nova metodologia, onde macerou-se 400 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido e acrescentou-se 3 mL de tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 5 M de ureia, 2 M tiourea, 0,05% TWen-20, 10% de glicerol, 2% de β -mercaptoetanol, 1 mM de PMSF, e 1 mM de EDTA). O extrato foi incubado a 4°C durante 2 h, e centrifugado durante 15 min. a 13.000 rpm a 4°C . O sobrenadante foi transferido para novos tubos e este passo repetido duas vezes. A seguir, foi adicionando quatro volumes de acetona gelada (-20°C) e incubou-se a -20°C durante a noite, seguido de centrifugação durante 15 min. a 13.000 rpm a 4°C . O pellet resultante foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol gelado e depois três vezes com acetona contendo 0,07% de β -mercaptoetanol e centrifugado a 10000 rpm a 4°C durante 5 min. O sobrenadante foi removido, e o sedimento seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o sedimento foi ressuspensionado em 100 μL de solução de lise, como descrito anteriormente.

2.3 Análise das amostras

As proteínas foram quantificadas usando o reagente Bradford (BRADFORD, 1976) e as amostras foram analisadas em triplicata. Utilizou-se gel SDS-PAGE (12%) de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) para análise de eletroforese 1-D. O volume para cada amostra utilizada foi de $15\ \mu\text{L}^{-1}$. A eletroforese foi conduzida a 120 V por 2 horas. Os géis foram corados em Comassie Brilliant Blue (CBB) e depois descorados em uma solução contendo 10% de ácido acético glacial e 30% de metanol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados de extração, foi possível observar uma melhor porcentagem de proteína (15,44%) para o protocolo desenvolvido pelo nosso grupo e 12,77% para o protocolo de fenol, enquanto que o protocolo TCA-acetona apresentou um rendimento de 8,33% (Fig.1A). Porém, é preciso lembrar que foi utilizado o dobro de material vegetal para o protocolo desenvolvido por nós, o que pode refletir na maior quantidade de proteínas extraídas.

Após a quantificação das proteínas obtidas pelos diferentes métodos testados, foi realizada a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, para observar o padrão das bandas (Fig 1B). Os três métodos são reprodutíveis, no entanto, com base na análise do gel, o protocolo desenvolvido pelo nosso grupo mostrou bandas com mais intensidade e distintas, embora pode-se observar um arraste. O método no qual se utiliza fenol também mostrou-se efetivo e não apresenta o arraste de proteínas, porém é um método mais custoso, que utiliza reagentes tóxicos (fenol) e que demandou um tempo maior para adaptações no protocolo.

Muitos grupos relataram que o método fenol é o mais efetivo para extração de proteínas, escolhendo este para suas análises (WANGET al., 2006; CILIA et al., 2009; DAM et al., 2009). Alguns ainda relatam o método TCA-acetona ser o melhor, o que difere dos nossos resultados (GIAVALISCO et al. 2003; MECHIN et al. 2003; CILIA et al., 2009; SHU et al.; 2010).

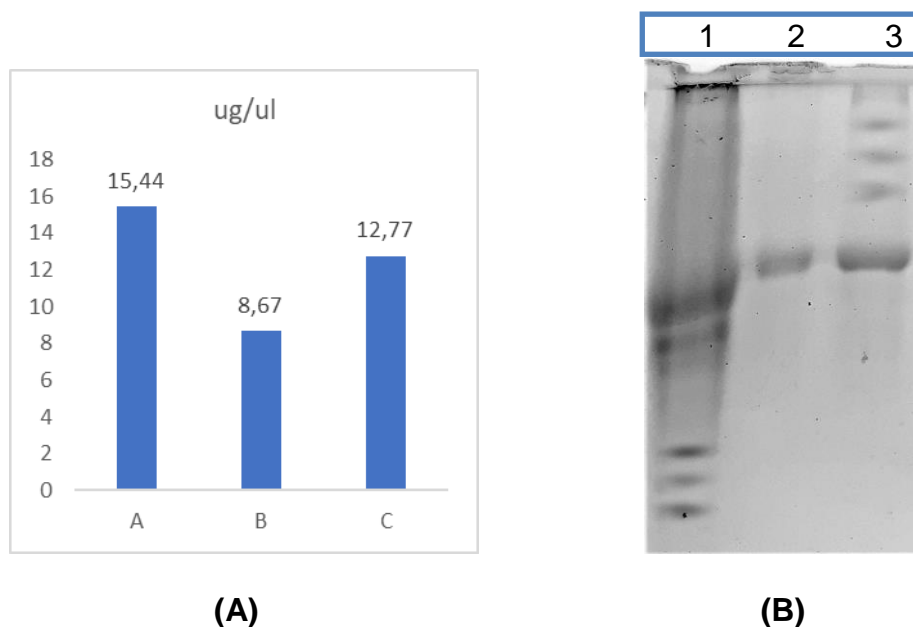


Fig. 1. Comparação dos métodos de extração de proteínas por quantificação e análise por SDS-PAGE. (A) Rendimento de proteínas pelos três protocolos: (A) Desenvolvido pelo nosso grupo (B) TCA-acetona e (C) Fenol. (B) Análise dos três protocolos, por SDS -PAGE. (1) Desenvolvido pelo nosso grupo (2) TCA-acetona (3) Fenol.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se inferir que o protocolo desenvolvido pelo nosso grupo se apresentou eficiente na extração de proteínas de folhas de arroz, comparável aos demais protocolos, especialmente ao do método que usa fenol na extração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CILIA, M.; FISH, T.; YANG, X.; MCLAUGHLIN, M. and THANNHAUSER, T.W. *et al.*, 2009. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins. **J. Biomol. Tech.**, v. 20, p. 201- 215, 2009.

GIAVALISCO, P.; NORDHOFF, E.; LEHRACH, H.; GOBOM, J.; KLOSE, J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. **Electrophoresis** v .24, p.207–216,2003.

ISAACSON, T. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, New York, v .1, n.2, p.769 -774, 2006.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRASIL, I. T.; and RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **J. Proteomics**, v.74, p.1301–1322, 2011.

MECHIN, V.; DAMERVAL, C.; ZIVY, M. Total protein extraction with TCA-acetone. **Methods Mol Biol**; p. 355:1–8, 2007.

SHU, L. B; DING, W; WU, J. H.; FANG, F. J; LUO, L. J.; MEI, H. W. Proteomic Analysis of Rice Leaves Shows the Different Regulations to Osmotic Stress and Stress Signals. **Journal of Integrative Plant Biology**, Shangai, v.52, p.981-995,2010.

UNLU, M.; MORGAN, M.E. & MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v.18, p. 2071–2077, 1997.

WU, W.W.; WANG, G.; BAEK, S.J. & SHEN, R.F. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/ TOF. **J. Proteome Res.**, v.5, p 651–658, 2006.