

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RAÍZES DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*) PARA ESTUDOS DE PROTEÔMICA

OPTIMIZATION OF PROTEIN EXTRACTION OF CAUPI BEANS ROOTS (*Vigna unguiculata*) FOR PROTEOMIC STUDIES

Lais Dieb Lima¹, Suane de Oliveira Souza Brasil², Diana Carolina Lima de Freitas³,
Isadora Dalbem Schuerne⁴, Karina Soardi⁵, João Claudio Vilvert⁶, Rosilene Oliveira
Mesquita⁷

RESUMO

O estudo de proteomas, em vegetais, nada mais é que o conhecimento de um conjunto de proteínas que estão atuando em uma célula, tecido ou órgão, em uma condição específica, como situações de estresse, por exemplo, e a partir disso podem-se obter possíveis marcadores moleculares. As etapas básicas para os estudos em proteomas consistem na preparação da amostra, separação proteica, visualização das proteínas e identificação das mesmas. Entretanto, devido a variedade de tecidos vegetais e uma série de compostos que dificultam a análise proteica, torna-se difícil estabelecer um protocolo de extração eficiente para todos os órgãos. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de proteínas em raízes já lignificadas de Feijão-caupi a partir do protocolo de Mesquita (2012). Foram feitas 3 repetições, dos seguintes tratamentos nas raízes lignificadas: utilização de 10 mL de tampão de extração e 1,5 g de material vegetal (controle), 10 mL de tampão de extração e 2,0 g de material vegetal (10 mL x 2,0 g), 15 mL de tampão de extração e 1,5 g de material vegetal (15 mL x 1,5 g) e 15 mL de tampão de extração e 2,0 g de material vegetal (15 mL x 2,0 g). As raízes foram maceradas com N₂ líquido e 10 mL de tampão de extração. As amostras submetidas ao tratamento 15mLx1,5g e 15mLx2,0 foram lavadas novamente com mais 5mL de tampão de extração. Posteriormente foi realizada a solubilização, quantificação, seguida da focalização isoeletrica. A segunda dimensão foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS. As imagens dos geis corados com Coomassie G-250® (Colloidal) foram digitalizadas usando o Image Scanner III (GE Healthcare®). O tratamento que apresentou maior concentração de proteínas foi o 15mLx2,0g, seguido do tratamento 15mLx1,5g. O tratamento controle e o 10 mL x 2,0 g apresentaram as menores médias, as quais não diferiram entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Quanto à nitidez e quantidade de *spots* os resultados foram similares. O melhor tratamento foi 15 mL x 2,0 g, seguido do tratamento 15 mL x 1,5 g, 10 mL x 2,0 g e 10 mL x 1,5 g. Os resultados atingidos foram satisfatórios, pois com o aumento do volume de tampão de extração houve maior eficiência em extrair as proteínas da amostra com tecido lignificado. Assim como a quantidade de

^{1,3,5}Mestranda em Produção Vegetal pela Universidade do Estado de Santa Catarina

²Mestranda em Fitotecnia pela Universidade Federal do Ceará

^{4,6}Graduanda em Agronomia pela Universidade do Estado de Santa Catarina

⁷Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal do Ceará

amostra utilizada também foi fundamental nessa otimização. Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que as alterações no volume de tampão de extração (2 lavagens) apresentaram resultados melhores que os descritos no protocolo original, sendo o tratamento 15 mL x 2,0 g o que melhor respondeu em eficiência.

Palavras-chave: Análise proteômica; extração de proteína; metodologia

ABSTRACT

The study of proteomes in plants, is the knowledge of a set of proteins that are acting in a cell, tissue or organ, in a specific situation, such as a situation of stress, and from this can be obtained possible molecular markers. The basic steps for proteomic assays consist of the preparation of the sample, protein separation, examination and identification of proteins. However, because of the variety of plant tissues and a number of compounds that hinder the protein analysis, it is difficult to establish an efficient extraction protocol for all organs. Therefore, the purpose of this study was to optimize the protein extraction in roots of Cowpea beans already lignified based on the protocol of Mesquita (2012). The following treatments were performed in the lignified roots in triplicate: the use of 10 mL of extraction buffer and 1.5 g of plant material (control), 10 mL of extraction buffer and 2.0 g of plant material (10 mL x 2.0 g), 15 mL of extraction buffer and 1.5 g of plant material (15 mL x 1.5 g) and 15 mL of extraction buffer and 2.0 g of plant material (15 mL x 2.0 g). The roots were ground under liquid nitrogen and 10 mL of extraction buffer. The samples that were submitted to the treatment 15 mL x 1.5 g and 15 mL x 2.0 g were washed again with another 5 mL of extraction buffer. Subsequently, it was performed the solubilization, quantification, followed by an isoelectric focusing. The second dimension was carried out on polyacrylamide gel in the presence of SDS. The images of the gels stained with Coomassie G-250® (Colloidal) were scanned using the Image Scanner III (GE Healthcare®). The treatment with the highest concentration of proteins was the 15 mL x 2.0 g, followed by treatment 15 mL x 1.5 g. The control treatment and the 10 mL x 2.0 g presented the lowest results, and they did not differ between themselves by the Tukey test at 5% of probability. Regarding the sharpness and quantity of spots the results were similar. The best treatment was 15 mL x 2.0 g, followed by treatment 15 mL x 1.5 g, 10 mL x 2.0 g and 10 mL x 1.5 g. The results obtained were satisfactory, because as the volume of the extraction buffer increased, a higher efficiency of protein extraction from the sample with lignified tissues was obtained. As well as the amount of sample used was important in this optimization. Considering the obtained results, it can be concluded that the alterations in the volume of extraction buffer (2 washes) presented better results than the results that were described in the original protocol, being the treatment 15 mL x 2.0 g the one that best responded in efficiency.

Keywords: Proteomic analysis; protein extraction; methodology

INTRODUÇÃO

A necessidade de se compreender a função do produto final da expressão gênica levou ao desenvolvimento do campo da proteômica (estudo das proteínas). O estudo de proteomas, em plantas, nada mais é que o conhecimento de um conjunto de proteínas que estão atuando em uma célula, tecido ou órgão, em uma condição específica (FERREIRA et al., 2016), podendo ser perturbações geradas pelo meio ambiente, como déficit hídrico ou salino, ou até mesmo o estágio de desenvolvimento em que o organismo se encontra.

De forma geral, pode-se afirmar que o proteoma é composto por uma grande diversidade de proteínas, o que o torna bastante complexo, seja de uma célula, organismo ou tecido. Quase todos os fenótipos e atividades celulares são de responsabilidade das proteínas (biomoléculas funcionais dos organismos vivos) (FERREIRA et al., 2016), evidenciando a importância do conhecimento e entendimento do proteoma.

Diante da busca em se conhecer as proteínas de forma quantitativa e qualitativa em um momento específico, diversos métodos de extração foram e ainda estão sendo testados em vários centros de pesquisas. Segundo Townsend (2014) as etapas básicas para os estudos em proteomas consistem na preparação da amostra, separação proteica, visualização das proteínas e identificação da mesma.

Nas plantas, uma série de compostos dificultam a análise proteica, tais como proteases, compostos fenólicos e metabólitos secundários que atrapalham o processo de extração das proteínas (MICHAUD & ASSELIN, 1995; NEWTON et al., 2004). Devido à importância desse processo inicial e a grande variedade de tecidos vegetais, o estabelecimento de um protocolo de extração se torna um trabalho laborioso.

Desta forma, buscou-se neste trabalho identificar um método de extração de proteínas eficaz e reprodutivo para se realizar estudos de proteômica em raízes lenhosas de feijão-caupi, através da otimização do protocolo de Mesquita (2012).

MATERIAL E MÉTODOS

O preparo das amostras, a extração, a solubilização, a quantificação e identificação das proteínas foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (LABFIVE). A quantificação e identificação das proteínas foram realizadas em raízes de plantas em estágio de prefloração (aproximadamente 35 dias após a semeadura), em que as raízes já se encontram com tecidos lignificados. Os tratamentos utilizados foram: 10 mL de tampão de extração e 1,5 g de material vegetal (controle), 10 mL de tampão de extração e 2,0 g de material vegetal (10 mL x 2,0 g), 15 mL de tampão de extração e 1,5 g de material vegetal (15 mL x 1,5 g) e 15 mL de tampão de extração e 2,0 g de material vegetal (15 mL x 2,0 g). Os componentes do tampão de extração podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 – Componentes do tampão de extração

Componentes	Concentração Final	Estoque	Para 10 mL
Tris-HCl Ph 7,5	40 mM	1,5 M	0,267 mL
Sacarose	250 mM	1,5 M	1,667 mL
EDTA	10 mM	0,5 M	0,2 mL
Triton X-100	1% (v/v)	PA	1 mL
PMSF**	1 mM	100 mM	0,1 mL
DTT**	1 mM	PA	1,55 mg
B-mercaptoetanol	2%	PA	0,2 mL
H ₂ O ultrapura	--	--	~ 10 mL

** Adicionados no momento do uso.
 Fonte: Mesquita & Bertini (2014).

As raízes foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até apresentarem a aparência de pó fino. Os tratamentos foram devidamente separados e identificados em tubos do tipo Falcon. Após pesadas, as amostras foram homogeneizadas com a adição de 0,2 g de PVPP e 10 mL de solução tampão de extração. Posteriormente foram colocadas dentro de uma caixa de isopor com gelo, onde permaneceram em uma mesa agitadora por uma hora. Terminado esse período, foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 minutos e a 4°C.

Para as amostras que foram submetidas à extração com 15 mL de solução tampão de extração, após a centrifugação com 10 mL do tampão de extração, o

sobrenadante foi coletado para uso posterior, e no tubo em que permaneceu o precipitado foram adicionados 5 mL de solução tampão e levado novamente à mesa agitadora, por uma hora, dentro de uma caixa de isopor com gelo. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 minutos e a 4°C. O sobrenadante obtido foi adicionado ao sobrenadante anteriormente coletado e o precipitado foi descartado.

Para as demais amostras, cujo tratamento foi a utilização de 10 mL de solução tampão, após a centrifugação armazenou-se o sobrenadante e o precipitado foi descartado. Em ambos os tratamentos adicionou-se TCA a 10% (m/v) em acetona gelada para que ocorresse a precipitação das proteínas e os volumes foram correspondentes aos volumes de tampão de extração utilizado em cada tratamento. Nas amostras em que se utilizou 15 mL de solução tampão, adicionou-se 15 mL de TCA 10% em acetona gelada, e nas amostras em que se utilizou 10 mL de tampão, adicionou-se 10 mL de TCA 10% em acetona gelada. As amostras foram acondicionadas em ultrafreezer a -80°C *overnight* para que a precipitação proteica ocorresse.

Após retirar as amostras do ultrafreezer, centrifugou-se a 10.000 x g, por 10 minutos e a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de acetona pura nos tubos onde ficaram os *pellets*. Centrifugou-se nas mesmas configurações, e o sobrenadante foi novamente descartado. Adicionou-se 1 mL de acetona pura nos tubos contendo o *pellet*, misturando com uma espátula de forma que todo o precipitado desgrudasse das paredes do tubo. Todo o material foi passado para *ependorf* e centrifugado a 10.000 x g, por 5 minutos e a 4°C.

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de acetona nos *ependorfs* contendo os *pellets*. Agitou-se com o auxílio de um vortex e foram centrifugados novamente a 10.000 x g, por 5 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de álcool para retirar o excesso de acetona. O material foi agitado no vortex e levado novamente a centrífuga a 10.000 x g, por 5 minutos e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e os *pellets* permaneceram a temperatura ambiente até secar. Após a secagem os *pellets* foram armazenados em freezer a -20°C.

O *pellet* contido no *eppendorf* foi solubilizado sendo homogeneizado com auxílio do vortex e thermomixer (bloco agitador), adicionando-se 250 μ L do tampão de solubilização.

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

Foram utilizadas fitas de 13 cm com intervalo linear de pH 3,0 a 10,0 para a realização da focalização isoeletrica (IEF). Inicialmente, as tiras foram reidratadas durante um período de 14 h a 16 h em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare®). Foram aplicados 250 μ L de solução contendo 500 μ g de proteínas, tampão de reidratação e IPG buffer (2%).

A IEF foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare®) sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V em passo único por 2 horas; 2) 500 Vxh em passo único de 500 volts; 3) 800 Vxh em gradiente até 1000 volts; 4) 11.300 Vxh em gradiente até 8.000 volts; 5) 4.000 Vxh em passo único de 8.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 μ A/tira.

Para a análise da segunda dimensão, as tiras foram previamente equilibradas após a IEF em 5 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) sob agitação por 20 minutos. Foram realizadas duas etapas de equilíbrio com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas. À primeira etapa, foi adicionado 1% de DTT ao tampão de equilíbrio e, na segunda etapa, adicionou-se 2,5% de iodoacetamida.

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida, em cuba tipo Rubi (GE Healthcare®). As tiras previamente equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de agarose 0,5%. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

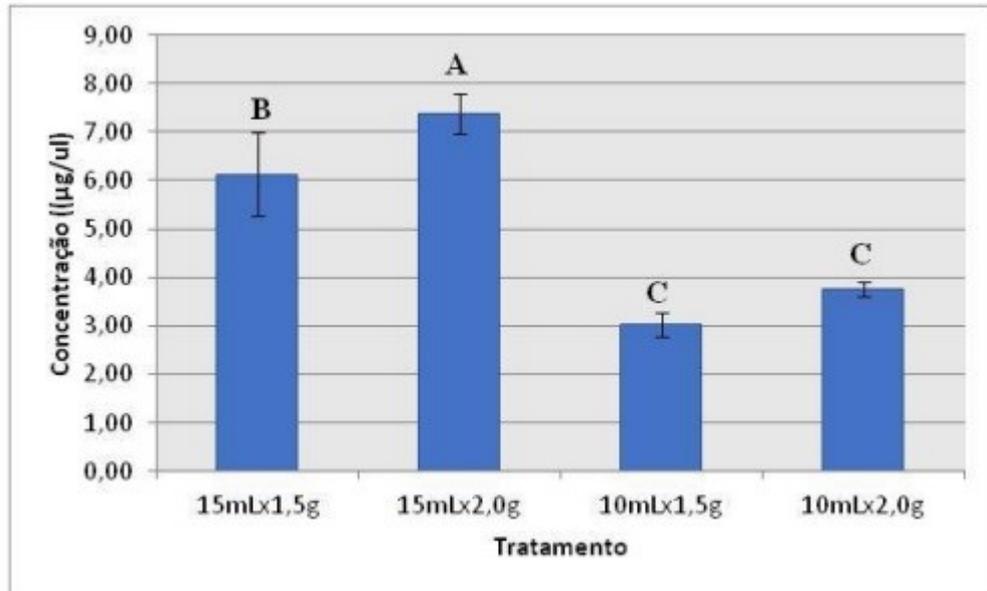
A corrida foi realizada em uma etapa inicial de 20 mA/gel por 30 minutos e, em seguida, a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel.

Terminada a corrida, os geis 2DE foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10% (v/v) e metanol a 50% (v/v) *overnight*. Após a etapa de fixação os geis foram corados por 48 h com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie blue G-250 0,08% (v/v) e metanol 20% (v/v) (Neuhoff et al., 1985). Após essa etapa, os geis foram lavados com solução de ácido acético 1% (v/v) até a eliminação completa do corante excedente.

As imagens dos geis corados com Coomassie G-250® (Colloidal) foram digitalizadas usando o Image Scanner III (GE Healthcare®) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software* Labscan (GE Healthcare®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford. O limite de detecção da concentração proteica desse método é de 0 a 20 µg de proteína e se fundamenta na ligação da proteína ao corante Coomassie brilhante blue G-250, ligação essa que causa a mudança na absorvância máxima do corante de 495 nm para 595 nm (FRANÇA-SANTOS et al., 2009). Dessa forma realizou-se a leitura das absorvâncias das amostras de raízes lignificadas de feijão-caupi a 595 nm. Os valores dessa leitura foram inseridos na equação da reta ($Y=0,034x+0,0367$) - onde Y é a média da absorvância da amostra a ser quantificada e x, a concentração em µg/µL - gerada pela curva padrão com o intuito de se obter a concentração de proteínas, como pode ser observado na figura 1.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. CV=15,28%. Cada tratamento representa a média de 3 repetições e em triplicata.

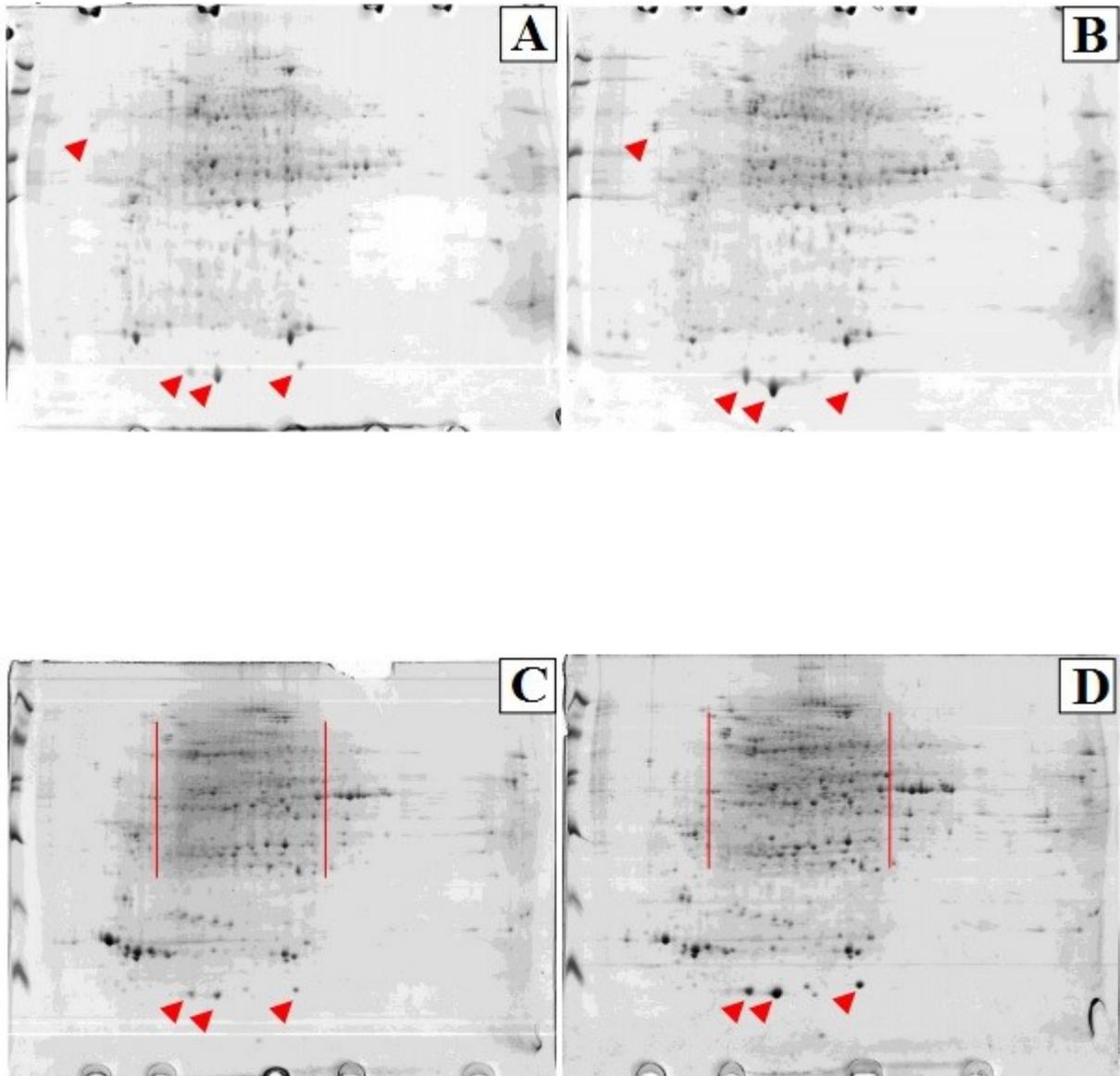
Figura 1 – Concentração de proteínas em raízes lignificadas de feijão-caupi

Como pode ser observado no gráfico acima, o tratamento que obteve maiores concentrações de proteínas foi o que se realizou duas lavagens (10mL + 5mL) e utilizou-se 2,0 g de amostra. Já o tratamento que apresentou menores valores foi o tratamento controle, o qual é estabelecido no protocolo de Mesquita (2012). Os resultados obtidos foram positivos, tendo em vista que a quantidade de amostra é diretamente proporcional à quantidade de proteínas presentes na mesma. Além disso, a utilização de 15 mL de tampão de extração fez com que a segunda lavagem otimizasse o resultado de forma que as proteínas que restaram na primeira lavagem puderam ser extraídas em uma segunda tentativa.

Como relatado anteriormente, todos os tratamentos os quais as amostras foram submetidas mostraram-se mais eficientes em comparação ao tratamento controle (10 mL x 1,5 g). Entretanto, o tratamento 10 mL x 2,0 g não diferiu estatisticamente do estabelecido pelo protocolo de Mesquita (2012), ou seja, a alteração apenas na quantidade de amostra não foi suficiente para otimizar os resultados. Já a utilização de 15 mL de tampão de extração garantiu maiores

concentrações de proteínas. No entanto, pode-se afirmar que houve diferenças significativas quando se compara a quantidade de amostra utilizada. A combinação de 15 mL de tampão e 2,0 g de amostra obteve a maior média em relação aos demais tratamentos.

Na análise das imagens levou-se em consideração a reprodutividade e qualidade dos gels, conforme pode ser observado na figura 2.



A= 10 mL x 1,5 g; B= 10 mL x 2,0 g; C= 15 mL x 1,5 g e D= 15 mL x 2,0 g. Setas em vermelho indicam a nitidez dos *spots* e linhas em vermelho indicam a quantidade de *spots* presentes.

Figura 2 – Comparação visual dos *spots* em gel 2DE das proteínas de raízes lignificadas de feijão-caupi

Comparando-se A e B com C e D, pode-se afirmar que surgiram *spots* no tratamento utilizando-se 15 mL de tampão de extração que não estão presentes nas imagens no tratamento de 10 mL, como pode ser observado no intervalo das linhas em vermelho. Em relação à nitidez, tratamentos com maiores quantidades de amostras foram melhores, independente do volume do tampão de extração. Entretanto, quando se compara os dois fatores em conjunto, o tratamento 15 mL x 2,0 g se sobressaiu aos demais.

Além de alterações em um protocolo gerarem respostas diferentes, Caetano (2007), em estudos com feijão-caupi, comparou duas metodologias de extração em raízes infectadas com o nematoide *Meloidogyne incognita* e observou que o método descrito por De Mot & Vanderleyden (1989) apresentou maiores quantidades de proteína. Em contrapartida, o perfil de proteínas obtido pelo método de Xie et al. (2007) revelou proteínas diferencialmente expressas que não foram observadas na outra metodologia. Já Mesquita et al. (2012) relata que houve aumento no número de *spots* e melhora na resolução dos geis 2DE quando alterou-se o método TCA/Acetona, utilizando mercaptoetanol e ditiotreitol no tampão de extração de forma simultânea.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados das alterações realizadas no protocolo de extração de Mesquita (2012), o tratamento que apresentou maior concentração de proteínas e melhor nitidez dos *spots* foi a utilização de 15 mL de tampão de extração concomitantemente à utilização de 2,0 g de material vegetal. Isso mostra que houve uma otimização da extração devido à alteração na metodologia, de modo que os tratamentos em que se utilizou 15 mL de tampão apresentaram-se mais eficientes do que o protocolo original quando se trabalha com raízes em estádios de desenvolvimento mais avançados (lignificados).

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistri**, Athens, Georgia, n. 72, p. 248-254, 29 January 1976.

CAETANO, Patrícia; SANTANA, Celso G.; CARNEIRO, Regina M. D.; SÁ, Maria Fátima Grossi D.; OLIVEIRA, José Tadeu A.; MEHTA, Angela. Otimização de protocolos para extração de proteínas em raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) infectadas com o nematóide *Meloidogyne incognita*. / Patrícia Caetano ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 10 p. : il. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 210).

DE MOT, R.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 35: 960, 1989.

FERREIRA, E. A. A. **Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2016.

FRANÇA-SANTOS, A; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **SCIENTIA PLENA**, São Cristóvão, v. 5, n. 11, 6 p., 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MESQUITA, Rosilene Oliveira; SOARES, Eduardo de Almeida; BARROS, Everaldo Gonçalves D.; LOUREIRA, Marcelo Ehlers. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: improvements in identification of new and low-abundance proteins. **Genetics and Molecular Biology (impresso)**, v. 35, p. 353-361, 2012.

MESQUITA, R. O.; BERTINI, C. H. C. de M. **Curso prático de eletroforese bidimensional e análise de imagens pelo software image master 2D platinum**. Fortaleza-CE, 2014.

MICHAUD, D.; ASSELIN, A. J. Application to Plant Proteins of Gel Electrophoretic Methods. **Journal of Chromatography A**, v.689, p.263-279, 1995.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, 6: p. 427-448, 1985.

NEWTON, R. P. et al. Plant Proteome Analysis by Mass Spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v.65, p.1449-1485, 2004.

TOWNSEND, Courtney M.; BEAUCHAMP, R. Daniel; EVERS, B. Mark; MATTOX, Kenneth L. **Tratado de cirurgia: A base biológica da prática cirúrgica moderna**. 19ª Edição. ed. [S.l.]: Saunders Elsevier, v. 1, 2014.

XIE, Hui; PAN, Shengli; LIU, Shufen; YE, Kan; HUO, Keke. A novel method of protein extraction from perennial Bupleurum root for 2-DE. **Electrophoresis**, 28: 871 – 875, 2007.