

## AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE PROTEÍNAS DE FOLHA DE MAMOEIRO PARA ANÁLISE PROTEÔMICA POR ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL

Silas Pessini Rodrigues<sup>1,2†</sup>; José Aires Ventura<sup>2,3‡</sup>; Russolina Benedeta Zingali<sup>1‡</sup>; Patricia Machado Bueno Fernandes<sup>2‡</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ; <sup>2</sup>Núcleo de Biotecnologia – UFES; <sup>3</sup>Instituto de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER. <sup>†</sup>Doutorando, <sup>‡</sup>Doutor/Pesquisador, pessini@bioqmed.ufrj.br.

### INTRODUÇÃO

A eletroforese bi-dimensional (2-DE) é uma das técnicas mais poderosas para a separação e quantificação de proteínas. Entretanto, os métodos de preparação de amostra representam um dos principais desafios para o uso da técnica (CARPENTIER et al., 2005). Neste trabalho, amostras de folha de mamoeiro (*Carica papaya* L.) foram preparadas utilizando quatro diferentes métodos. A qualidade de cada preparação foi comparada utilizando-se SDS-PAGE (1-DE) e 2-DE. Dados relativos à identificação das proteínas por espectrometria de massas (MS) são também apresentados.

### MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: Proveniente da Fazenda Experimental do INCAPER, Linhares, ES. Amostras de folha, representativa de três plantas diferentes, foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas (250 mg) aos métodos de preparação descritos abaixo (CARPENTIER et al., 2005).

Preparação da amostra: 1) Fracionamento sem precipitação (FSP), em que as proteínas foram extraídas submetendo-se os tecidos, em sequência, aos tampões 1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.1, KCl 100 mM, glicerol 20%, benzamidina 3 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM) e 2 (Tris-HCl 100 mM pH 7.1, KCl 200 mM, CHAPS 4%, glicerol 20%, benzamidina 3 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM), seguido de agitação e centrifugação à 16,000 g 30 min. As amostras resultantes foram chamadas de FSP-1 e FSP-2, respectivamente; 2) *Precipitação com ácido tricloro-acético* (TCA), em que os tecidos foram adicionados a uma solução de TCA 10% em

acetona e permaneceram durante 12 hrs à – 20°C. O precipitado resultante foi lavado com acetona/2-mercaptoetanol 0,07%. O precipitado foi seco à vácuo e solubilizado em 100 µl de tampão de lise (uréia 7 M, tiuréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 1%), amostra TCA-1 (DAMERVAL et al., 1986). A proposta deste trabalho é uma solubilização adicional do resíduo em tampão de lise, amostra TCA-2; 3) Precipitação com TCA/fracionamento (TCA/F), em que os proteínas foram precipitadas como descrito para o método TCA, sendo o resíduo submetido a duas solubilizações, em seqüência. A primeira em 200 µl de uréia 9.5 M, CHAPS 2% e DTT1% (TCA/F-1) e a segunda em tampão de lise (TCA/F-2); 4) *Extração com fenol* (FE), em que as proteínas foram extraídas em 500 µl de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, KCl 100 mM, DTT 1%, sacarose 30%, EDTA 5 mM, benzamidina 3 mM, PMSF 1 mM) e 500 µl de fenol. As proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas em acetato de amônio 100 mM à -20°C e, em seguida, resuspensas em tampão de lise (amostra FE).

**Separação das proteínas:** As proteínas foram iso-focalizadas (IF) em sistema IPG-Phor (GE-Healthcare) utilizando-se tiras de 7 e 18 cm. A separação baseada no peso molecular das proteínas foi feita utilizando-se os sistemas Mini-Protean (Bio-Rad) ou Ettan DALT-Six (GE) de acordo com as instruções do fabricante. Os géis foram corados utilizando-se uma solução de azul de coomassie coloidal (HIGA; CARUSO, 2008). As imagens adquiridas em scanner com o auxílio do programa Labscan (GE), seguidas da análise utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum (2-DE Manual, GE).

**Espectrometria de massas e identificação das proteínas:** As proteínas de interesse foram cortadas do gel, processadas e os espectros de massa obtidos em MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystem). As proteínas foram identificadas utilizando-se o programa Mascot (Matrix Science). Todos os procedimentos foram previamente descritos (HIGA; CARUSO, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um perfil complexo de bandas de proteínas foi observado em 1-DE para as amostras preparadas utilizando-se os métodos TCA, TCA/F e FE (Figura 1). Entretanto, as bandas provenientes dos métodos TCA e TCA/F mostraram-se em melhor definição (Figura 1). As amostras provenientes destes dois métodos foram também separadas em 2-DE (dados não apresentados). O melhores resultados foram obtidos para aquelas amostras provenientes do método TCA.

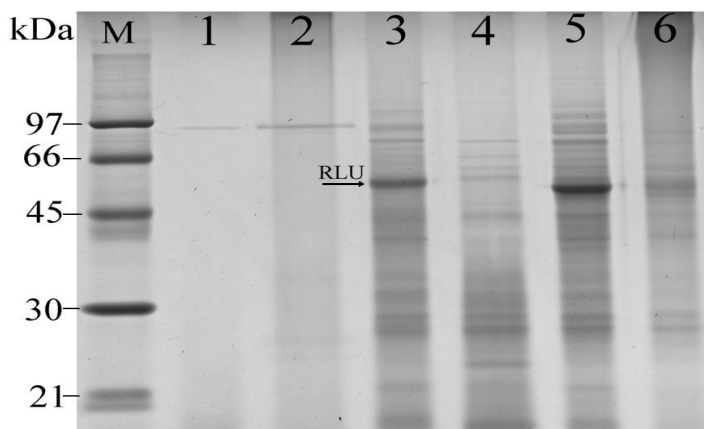


FIGURA 1 - Perfil 1-DE de proteínas de folha de mamoeiro preparadas por diferentes métodos. PSF: PSF-1 (1), PSF-2 (2). TCA/F: TCA/F-1 (3), TCA/F-2 (4). TCA-1 (5). FE (6). Marcador de peso molecular (M).

A metodologia original de preparação por TCA (DAMERVAL et al., 1986) sugere uma primeira solubilização, seguida do descarte dos tecidos residuais (amostra TCA-1). Neste trabalho, os resíduos foram novamente submetidos a uma solubilização em tampão de lise (amostra TCA-2). As proteínas resultantes foram comparadas com aquelas da amostra TCA-1, em 1-DE e 2-DE. A amostra TCA-2 apresentou um maior número de bandas de proteínas de alto e médio peso molecular, comparado com as de baixo peso molecular obtidas na amostra TCA-1 (dados não apresentados). Objetivando uma maior cobertura em 2-DE, as amostras TCA-1 e TCA-2 foram combinadas (1/1 v/v) e separadas em 2-DE (Figura 2). Um total de 736 spots de proteínas pode ser observado, distribuindo-se nas regiões de alto e baixo peso molecular, em ambas as faixas de pH, ácida e básica. Os spots apresentaram-se de forma circular, com boa resolução, indicando uma separação de alta qualidade.

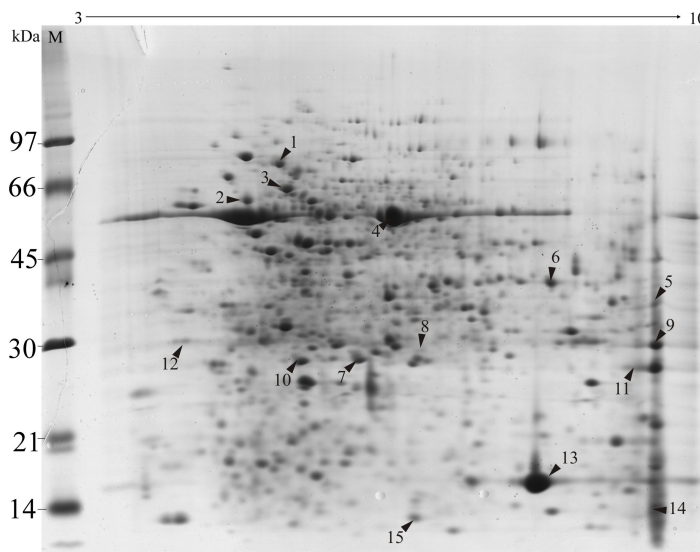


FIGURA 2 - Perfil 2-DE de proteínas de folha de mamão preparadas pelo método TCA ajustado para folha de mamão. Marcador de peso molecular (M).

Visando-se avaliar a compatibilidade das proteínas separadas pelo método TCA ajustado para folhas de mamão, descrito neste trabalho, com técnicas de MS, os spots indicados na Figura 2 foram submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF. Espectros de MS/MS de qualidade foram obtidos para todas as quinze proteínas selecionadas (dados não apresentados). As listas de massas foram utilizadas para a identificação das proteínas, resultando nos dados apresentados na Tabela 1. Os elevados valores de “Score” sugerem boa qualidade na identificação das proteínas. Além disso, observou-se uma equivalência entre os valores de potencial isoeletrônico ( $pI$ ) e peso molecular ( $Mr$ ) teóricos (descritos no banco de dados do NCBI) e experimentais (obtidos *via* 2-DE) para as quinze proteínas, reforçando a boa qualidade da separação das proteínas e uma proteólise limitada.

TABELA 1 - Identificação das proteínas de folha de mamão por MALDI-TOF-TOF<sup>a)</sup>.

| Nº S | p//Mr T  | p//Mr E  | Score | Nº P | Nº Acesso | Identificação da proteína     |
|------|----------|----------|-------|------|-----------|-------------------------------|
| 1    | 5.2/71   | 5.1/79   | 371   | 13   | 6911553   | HSP70                         |
| 2    | 4.7/60.0 | 5.2/61   | 492   | 11   | 3790441   | Chaperinina 60-alfa           |
| 3    | 5.2/64   | 6.2/64   | 311   | 7    | 15222729  | Chaperonina 60-beta           |
| 4    | 8.5/55   | 6.1/52   | 290   | 9    | 167391813 | Rubisco-sub maior (RLU)       |
| 5    | 9.5/63   | 9.0/43   | 253   | 6    | 10720220  | NADPH-oxiredutase             |
| 6    | 8.3/40   | 8.3/36   | 404   | 5    | 120666    | Glic-3-p-dehydrogenase        |
| 7    | 6.0/28   | 8.6/29   | 167   | 3    | 116519121 | Proteína de ligação clorofila |
| 8    | 6.8/28   | 6.6/27   | 155   | 6    | 553107    | Triosefosfato isomerase       |
| 9    | 8.8/32   | 9.1/27   | 610   | 8    | 146286071 | endoquitinase                 |
| 10   | 5.3/28   | 8.8/26   | 182   | 3    | 15242045  | Chaperonina 20                |
| 11   | 9.5/27   | 9.1/25   | 112   | 4    | 4469159   | Quimiopapaina V               |
| 12   | 4.0/31   | 4.3/21   | 172   | 3    | 124484511 | NPAC                          |
| 13   | 9.0/20.4 | 8.5/17.0 | 129   | 5    | 132145    | Rubisco subunidade menor      |
| 14   | 9.5/14   | 10.7/14  | 92    | 3    | 108864390 | Proteína ribossomal 40S       |
| 15   | 5.6/9.3  | 6.6/10.0 | 112   | 2    | 108796706 | Fotossistema I subunidade II  |

<sup>a)</sup> Nº S, número do spot como mostrado na fig.2. p//Mr T, p//Mr teóricos (kDa). p//Mr E, p//Mr experimental (kDa).

Score, Mascot score. Nº P, número de peptídeos. % C, percentual de cobertura. Nº Acesso, número de acesso da proteína no NCBI nr.

O método de preparação de amostra utilizando TCA é característico por limitar a proteólise e, ao mesmo tempo, permitir o resgate de proteínas de baixo peso molecular (CARPENTIER et al., 2005).

## CONCLUSÃO

A inclusão de um passo de solubilização adicional facilitou o resgate de proteínas de médio e alto peso, elevando a cobertura do perfil proteômico de folha de mamão em 2-DE, compatível com MALDI-TOF-TOF, o que permite que estas ferramentas sejam utilizadas na abordagem de problemas de interesse para a cultura do mamão.

## REFERÊNCIAS

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497 – 2507, 2005.

HIGA, L. M.; CARUSO, M. B. Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: Implications for pathogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 10, 1016 p., 2008.