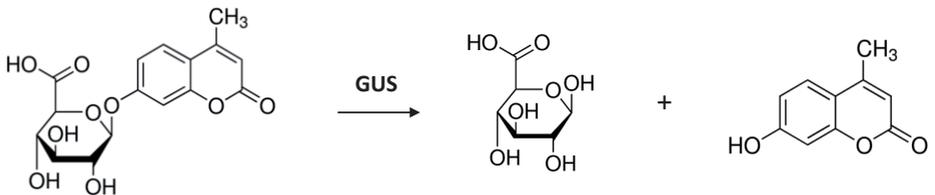


Quantificação da Atividade da Enzima Repórter β -glucoronidase (GUS) em Plantas



4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG)

Ácido glucurônico

4-metilumbeliferona (MU)

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 214

Quantificação da Atividade da Enzima Repórter β - glucuronidase (GUS) em Plantas

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Bárbara França Negri
Sylvia Morais de Sousa

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Ubiraci Gomes de Paula Lana

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Milho e Sorgo

Lana, Ubiraci Gomes de Paula.

Quantificação da atividade da enzima repórter β -glucuronidase (GUS) em plantas / Ubiraci Gomes de Paula Lana, Bárbara França Negri, Sylvia Morais de Sousa – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

15 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 214).

1. Atividade enzimática. 2. Gene repórter. 3. Planta transgênica. I. Negri, Bárbara França. II. Sousa, Sylvia Morais de. III. Título. IV. Série.

CDD 572.7 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Autores

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970
ubiraci.lana@embrapa.br

Bárbara França Negri

Doutoranda em Bioengenharia, Universidade Federal de São João Del Rei, Rodovia MG 424 – Km 47, CEP: 35701-970, Sete Lagoas, MG,
barbarafnegri@gmail.com

Sylvia Morais de Sousa

Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970,
sylvia.sousa@embrapa.br

Apresentação

O gene β -glucoronidase (GUS) tem sido utilizado no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas como gene-repórter, cuja expressão é normalmente avaliada por meio de ensaio histoquímico. A metodologia adaptada e apresentada neste trabalho foi implementada nos laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo, como alternativa para quantificação em larga escala do produto do gene GUS baseada em ensaio enzimático fluorimétrico. Esta metodologia mostra-se mais sensível na detecção da proteína GUS, além de propiciar maior agilidade na obtenção dos resultados.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino

Chefe-Geral

Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	6
Procedimento Experimental	8
Extração de Proteínas	8
Quantificação da Enzima GUS	9
Quantificação de Proteína Total	11
Atividade da Enzima GUS	13
Referências	14

Quantificação da Atividade da Enzima Repórter β -glucoronidase (GUS) em Plantas

Ubiraci Gomes de Paula Lana¹

Bárbara França Negri²

Sylvia Moraes de Sousa³

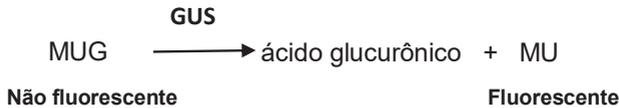
Introdução

O gene repórter β -glucoronidase (GUS) foi isolado de *Escherichia coli* (Jefferson, 1989) e tem sido utilizado em plantas geneticamente modificadas para estudos de função de promotores, expressão tecido específico, regulação do desenvolvimento, estabilidade de mRNA, eventos de excisão de elementos transponíveis e sequências de sinalização para endereçamento de proteínas para várias organelas (GALLAGHER, 1992; HULL; DEVIC, 1995). As duas principais vantagens de se utilizar o GUS são que as plantas, com raras exceções, não apresentam atividade endógena de GUS e que os ensaios são diretos, com a opção de uso de substratos para ensaios histoquímicos e enzimáticos, como apresentado neste documento.

A metodologia para quantificação da atividade da enzima GUS aqui apresentada foi baseada no trabalho descrito por Francis e Spiker (2005) com várias modificações e padronizada para as condições e equipamentos disponíveis nos laboratórios

do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo. As principais alterações incluem a padronização da massa de tecido vegetal necessária para a análise, a drástica redução do volume do tampão de extração e a alteração dos pontos da curva padrão.

A atividade de GUS tem sido medida pelo monitoramento da clivagem do substrato 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG) (JEFFERSON, 1987; JEFFERSON et al., 1987; GALLAGHER, 1992), conforme reação a seguir:



A análise de GUS é baseada na quantificação do produto da reação conhecido como 4-metilumbeliferona (MU) que apresenta fluorescência máxima em pH alto, onde o grupo hidroxila encontra-se ionizado (GALLAGHER, 1992). Assim, antes da quantificação da concentração de MU, adiciona-se solução aquosa de carbonato de sódio que simultaneamente interrompe a reação e ajusta o pH do meio para a quantificação do produto fluorescente. Repetidas análises têm demonstrado que a taxa de clivagem do MUG é linear por pelo menos 20 minutos após o início da reação (FRANCIS; SPIKER, 2005).

Para normalização da atividade da enzima GUS, torna-se fundamental a quantificação de proteínas totais das amostras, que normalmente é realizada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). Neste documento, foram ainda estabelecidos e detalhados os parâmetros ideais de análise, além dos cálculos das etapas de quantificação do

produto da reação enzimática para GUS por fluorimetria e a quantificação de proteína total por espectrofotometria UV/VIS no equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha).

Procedimento Experimental

Extração de Proteínas

1. Coletar as amostras vegetais em nitrogênio líquido.
2. Macerar o tecido com almofariz e pistilo e pesar 100 mg de material congelado (- 80 °C ou N₂ líquido) em microtubo de 1,5 mL.
3. Adicionar imediatamente 200 μ L de tampão de extração [tampão fosfato 150 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; triton X-100 0,1% (v/v); lauril sarcosinato de sódio (sarcosil) 0,1% (m/v); fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) 140 μ M e 2-mercaptoetanol 10 mM. O reagente 2-mercaptoetanol 10 mM deverá ser acrescentado somente no momento do uso.
4. Agitar vigorosamente por 10 segundos e centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente.
5. Transferir o sobrenadante (extrato proteico) para novo microtubo e manter no gelo até a quantificação de GUS e proteínas totais.
6. Todos os ensaios foram padronizados em microplaca transparente de 96 poços, código Costar 3799 da marca Corning®.

Quantificação da Enzima GUS

1. Pipetar 10 μ L do extrato proteico em microplaca e 130 μ L de tampão MUG [tampão fosfato 150 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; triton X-100 0,1% (v/v); lauril sarcosinato de sódio 0,1% (m/v); PMSF 140 μ M; 2-mercaptoetanol 10 mM e MUG (Cód. M-9130, Sigma) 1,2 mM]. O reagente 2-mercaptoetanol 10 mM deverá ser acrescentado somente no momento do uso. Realizar todas as análises em triplicata.

2. Incubar as amostras no escuro a 37 °C por **exatamente** 20 minutos. Em seguida, transferir 10 μ L da reação para outra placa de 96 poços contendo 190 μ L de tampão de parada (carbonato de sódio 200 mM).

3. Incluir uma curva padrão em cada placa com as concentrações aquosas de MU (Cód. M-1508, Sigma) iguais a 50; 25; 5; 2,5; 0,5; 0,1 e 0 μ M, que deverá ser utilizada no cálculo da quantidade de MU produzida por cada amostra. Para isso, repetir as etapas 1 e 2 substituindo as amostras pelo padrão. Em razão da instabilidade das soluções aquosas de MU, estocar a -20 °C por apenas uma semana e descongelar por no máximo três vezes.

4. Medir a fluorescência a 460 nm após excitação a 355 nm no equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha) utilizando o software Omega - Control (BMG LABTECH, Alemanha) com seleção da microplaca "SBS standard 96" e ajuste de ganho de 3%. No programa, clicar em "change layout" e definir a posição das amostras na placa. Em seguida, clicar em "gain adjustment" e logo em seguida em "start measurement". Para análise dos resultados, utilizar o software

Omega Data Analysis (BMG LABTECH, Alemanha) e exportar os dados brutos clicando em “export table to excel”.

5. O valor de fluorescência apresentado pelas amostras não poderá ser superior ao valor de fluorescência encontrado para o padrão MU na concentração de 100 μM . Caso ocorra, a amostra deverá ser diluída e a análise, repetida.

6. Subtrair o valor de fluorescência obtido para o branco (0 μM de MU) de cada amostra ou padrão.

7. Plotar um gráfico com a concentração dos padrões de MU no eixo X e o valor de fluorescência no eixo Y. Calcular a equação da reta ($Y = aX$) e o valor de R^2 que deverá ser superior a 0,98, conforme exemplo na Figura 1.

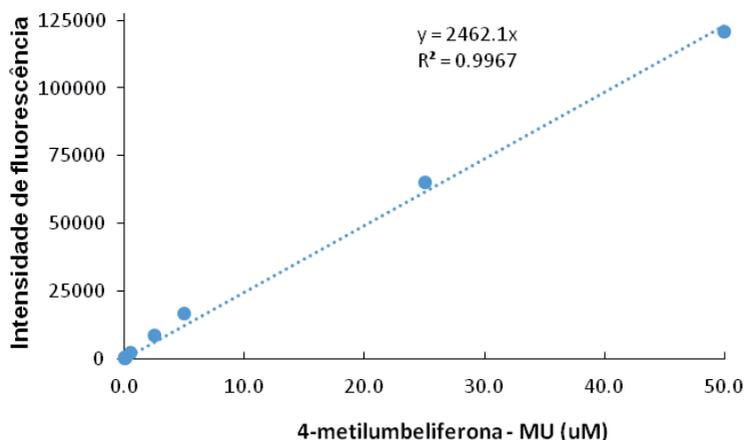


Figura 1. Curva padrão demonstrando a linearidade na faixa de detecção de 0 a 50 μM de MU baseada em ensaio enzimático fluorimétrico.

8. Com base na equação da reta da curva padrão, determinar a concentração de MU nas amostras em μM . Caso as amostras tenham sido previamente diluídas, multiplicar os valores da concentração de MU pelo fator de diluição.

Quantificação de Proteína Total

1. Pipetar 5 μL do extrato proteico diluído 10X e 250 μL de reagente de Bradford (Cód. B-6916, Sigma) em microplaca de 96 amostras e homogeneizar. O reagente de Bradford deverá estar em temperatura ambiente. Realizar todas as análises em triplicata.
2. Incubar as amostras em temperatura ambiente entre 5 e 30 minutos.
3. Incluir uma curva padrão em cada placa com as concentrações de albumina de soro bovino (BSA) iguais a 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,5; 0,3; 0,1 e 0 mg/mL, que deverá ser utilizada no cálculo da quantidade total de proteínas. Para isso, repetir as etapas 1 e 2 substituindo as amostras pelas soluções de BSA.
4. Medir a absorbância a 595 nm no equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha) utilizando o software Omega - Control (BMG LABTECH, Alemanha) com seleção da microplaca "SBS standard 96". No programa, clicar em "change layout" e definir a posição das amostras na placa. Em seguida, clicar em "start measurement". Para análise dos resultados, utilizar o software Omega Data Analysis (BMG LABTECH, Alemanha) e exportar os dados brutos clicando em "export table to excel".

5. O valor da absorbância apresentado pelas amostras não poderá ser superior ao valor encontrado para o padrão BSA na concentração de 1,4 mg/mL. Caso ocorra, a amostra deverá ser diluída e a análise, repetida.

6. Subtrair o valor de absorbância obtido para o branco (0 mg/mL de BSA) de cada amostra ou padrão.

7. Plotar um gráfico com as concentrações de proteína do padrão no eixo X (mg/mL) e o valor de absorbância no eixo Y. Calcular a equação da reta ($Y = aX$) e o valor de R^2 que deverá ser superior a 0,98, conforme exemplo na Figura 2.

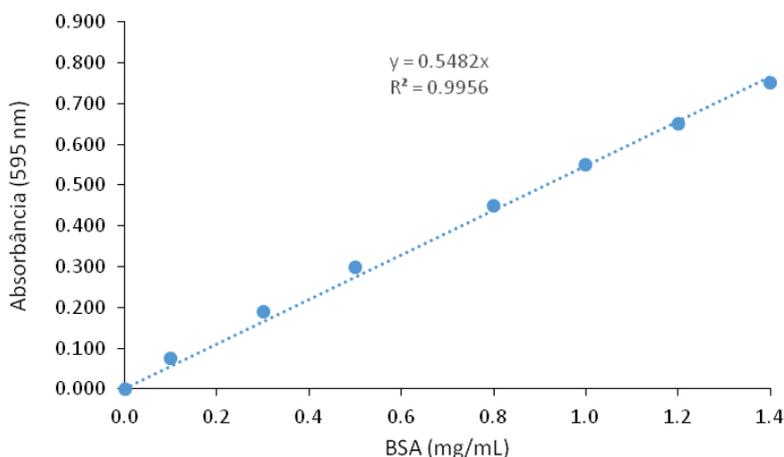


Figura 2. Curva padrão demonstrando a linearidade na faixa de detecção de 0 a 1,4 mg/mL de BSA por espectrofotometria UV/VIS.

8. Com base na equação da reta da curva padrão, determinar a concentração de proteínas totais nas amostras em mg/mL. Multiplicar os valores encontrados pelo fator de diluição de

cada amostra (o valor será igual a 10 se a diluição inicial for de 10 X).

Atividade da Enzima GUS

1. Calcular a atividade da enzima GUS que deverá ser expressa em rmol de MU/min/mg de proteína, conforme descrição abaixo:

a) A concentração de MU será calculada pela curva padrão em μM . Considerando que o volume de extrato utilizado na análise foi de $10 \mu\text{L}$, determinar a quantidade de MU neste volume em rmol . Para isso, basta multiplicar o valor em μM por 10.

b) Para o cálculo da atividade de GUS, dividir o valor em rmol de MU por 20, tempo em minutos utilizado na reação enzimática. O resultado parcial será expresso em $\text{rmol}/\text{minuto}$.

c) Para o cálculo normalizado da atividade de GUS, multiplicar a concentração da proteína em mg/mL por 0,01. O valor encontrado refere-se à massa de proteína em mg presente em $10 \mu\text{L}$ de extrato proteico.

d) O resultado final será encontrado pela relação entre o valor em $\text{rmol}/\text{minuto}$ e a massa de proteína em mg , expresso em rmol de MU/min/mg de proteína.

e) Um exemplo de uma planilha de cálculo utilizando as curvas apresentadas neste trabalho está mostrado na Figura 3.

GUS									
Amostra	Repetição	Fluorescência	Fluoresc média	Fluoresc (-branco)	uM MU (curva)	fator de diluição	uM MU	pmol MU (10 uL)/20 min	pmol MU/min
1	1	18000	18100.0	16116.7	6.546	1	6.546	65.459	3.273
1	2	17900							
1	3	18400							
2	1	3000	3349.3	1366.0	0.555	1	0.555	5.548	0.277
2	2	3050							
2	3	3998							
Branco	1	2000	1983.3						
Branco	2	1900							
Branco	3	2050							
PROTEÍNA									
Amostra	Repetição	Abs (595 nm)	Abs média	Abs (-branco)	mg/mL prot (curva)	fator de diluição	mg/ml prot	mg prot (10 uL)	
1	1	0.301	0.301	0.219	0.400	10	4.001	0.040	
1	2	0.299							
1	3	0.304							
2	1	0.401	0.401	0.319	0.583	10	5.825	0.058	
2	2	0.421							
2	3	0.382							
Branco	1	0.083	0.082						
Branco	2	0.081							
Branco	3	0.082							
ATIVIDADE DE GUS									
Amostra	pmol MU/min/mg prot								
1	81.804								
2	4.762								

Figura 3. Exemplo de uma planilha de cálculo da atividade de GUS utilizando as equações da reta apresentadas nas Figuras 1 e 2 para MU e proteína total, respectivamente.

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 Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

FRANCIS, K. E.; SPIKER, S. Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 464-477, 2005.

GALLAGHER, S. R. Quantitation of GUS activity by fluorometry. In: GALLAGHER, S. R. (Ed.). **GUS Protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 47-59.

HULL, G.; DEVIC, M. The β -glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions, spectrophotometric, fluorometric and histochemical detection. In: JONES, H. (Ed.). **Methods in molecular biology**: plant gene transfer and expression protocols. Totowa: Humana Press, 1995. v. 49, p. 39-48.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 5, p. 387-405, 1987.

JEFFERSON, R. A. The GUS reporter gene system. **Nature**, London, v. 342, p. 837-838, 1989.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

