

Avaliação de Métodos de Extração de Proteínas de Tecido Foliar e Radicular de Cana-de-açúcar para Estudos de Proteômica





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1678-1953

Dezembro, 2012

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 71

Avaliação de Métodos de Extração de Proteínas de Tecido Foliar e Radicular de Cana-de-açúcar para Estudos de Proteômica

Alessandro Riffel

Luciana da Silva Viana

João Gomes da Costa

Antônio Euzébio Goulart Sant'ana

Aracaju, SE
2012

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Av. Beira Mar, 3250

49001-970 Aracaju, SE

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

www.cpatc.embrapa.br

cpatc.sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Ronaldo Souza Resende*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Ana Veruska Cruz da Silva, Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Joézio Luis dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Paulo César Falanghe Carneiro, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane Talamini*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normalização bibliográfica: *Josete Melo Cunha*

Tratamento das ilustrações: *Ailla Freire de Azevedo*

Foto da capa: *João Gomes da Costa*

Editoração eletrônica: *Ailla Freire de Azevedo*

1ª Edição

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Riffel, Alessandro

Avaliação de métodos de extração de proteínas de tecido foliar e radicular de cana-de-açúcar para estudos de proteômica / João Gomes da Costa ... [et al.]. – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012.

20 p. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 71).

Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/bp_71.pdf

1. Cana-de-açúcar. 2. Análise foliar. 3. Proteômica. I. Riffel, Alessandro. II. Viana, Luciana da Silva. III.

Costa, João Gomes da. IV. Sant'ana, Antônio Euzébio Goulart. IX. Embrapa Tabuleiros Costeiros. X. Série.

CDD 633.61

©Embrapa 2012

Sumário

Resumo	04
Abstract	06
Introdução	07
Materiais e Métodos	08
Quantificação de Proteínas	11
Eletroforese Bidimensional (2-DE)	11
Resultados e Discussão	12
Conclusões	16
Referências	17

Avaliação de Métodos de Extração de Proteínas de Tecido Foliar e Radicular de Cana-de-açúcar para Estudos de Proteômica

Alessandro Riffel¹

Luciana da Silva Viana²

João Gomes da Costa³

Antônio Euzébio Goulart Sant'ana⁴

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e nas últimas décadas, os estudos envolvendo a cultura, principalmente relacionados à biotecnologia e o melhoramento genético têm se acentuado. Uma ferramenta bastante útil para esses estudos é a proteômica. O sucesso dos estudos envolvendo a proteômica, e em específico os que utilizam a eletroforese bidimensional (2-DE), depende principalmente de uma eficiente extração das proteínas que variará com a recalcitrância do material e a remoção dos contaminantes. Nesse aspecto, os tecidos da cana-de-açúcar possuem natureza altamente fibrosa com grande rigidez e apresentam níveis elevados de enzimas oxidativas, compostos fenólicos, carboidratos e outros metabólitos que podem interferir na 2-DE. Portanto, nosso objetivo foi testar três protocolos de extração (1-TCA/Acetona; 2-TCA/Acetona modificado e 3-SDS/Fenol) de proteínas de tecidos de folhas e raízes de cana-de-açúcar que fosse compatível com a 2-DE

¹ Farmacêutico, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros - Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, alessandro.riffel@embrapa.br.

² Bióloga, doutora em Química e Biotecnologia, pesquisadora da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, lsviana@hotmail.com.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros - Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, joão-gomes.costa@embrapa.br.

⁴ Farmacêutico, doutor em Química, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, AL, aegs@qui.ufal.br.

e a identificação das proteínas por espectrometria de massas. O protocolo 3 foi o que resultou em um maior rendimento de extração, gerou géis com spots bem definidos e sem interferentes para a espectrometria de massas. Além disso, esse protocolo mostrou a mesma eficiência para tecidos de raízes e de folhas, mostrando-se como mais indicado para os estudos de proteômica de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: proteínas, fenol, eletroforese bidimensional, espectrometria de massas.

Evaluation of Different Methods of Protein Extraction from the Leaf and Root Tissues of Sugarcane for Proteomic Studies

Abstract

Brazil is the biggest sugarcane producer in the world. In the recent decades, studies involving this crop, mainly related to biotechnology and genetic breeding, have increased in relevance. A very useful tool for such studies has been the proteomics. The success of proteomics, in particular using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), relies on an efficient method of protein extraction that depends on the recalcitrance of the material and removal of contaminants. Sugarcane tissues are a fibrous nature, high rigidity and presents high levels of oxidative enzymes, phenolic compounds, carbohydrates and other metabolites that may interfere in the 2-DE technique. Here, our goal was to compare three different protein extraction protocols (1-TCA/Acetone; 2- Modified TCA/Acetone and 3- SDS/Phenol) from sugarcane leaf and root tissues for using in 2-DE and Mass Spectrometry analysis. Among all methods tested, protocol 3 resulted in higher extraction yield, produced gels with high-quality spots and reproducibility. Moreover, no interference in the protein identification by mass spectrometry was detected and this protocol was as effective to extract protein from leaves and roots tissue, resulting in the most suitable for proteomics studies of sugarcane.

Index terms: protein, bidimensional electrophoresis, phenol, mass spectrometry.

Introdução

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância nas regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada em mais de 90 países. Além da produção de açúcar, a indústria canavieira brasileira mantém o maior sistema de produção de energia comercial de biomassa no mundo, através do etanol, do uso quase total do bagaço que é utilizado em biorreatores na geração de energia elétrica e ainda da possibilidade do desenvolvimento em curso da tecnologia para produção do etanol de segunda geração. A cana-de-açúcar também vem sendo utilizada, e com possibilidade de expansão, em uma série de outros processos tais como: produção de plásticos biodegradáveis, açúcares não calóricos e compostos de interesse pela indústria química e farmacêutica (MENOSSI et al., 2008).

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* composto por híbridos, em geral altamente poliplóides ou aneuplóides contendo em média 100 a 120 cromossomos, e esse número é bastante variável entre as cultivares comerciais (D'HONT, 2005). A complexidade de seu genoma inibiu por longo tempo grandes investimentos no desenvolvimento da biotecnologia e ferramentas genéticas para esta cultura, mas esta situação tem se revertido na última década a partir da publicação de seu genoma funcional em 2001, trazendo avanços no conhecimento da cultura e culminando no seqüenciamento total do genoma em curso. Uma das ferramentas auxiliares à biotecnologia e ao melhoramento genético que vem sendo utilizada é a proteômica. Esta ferramenta tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e seus mecanismos regulatórios em determinadas condições fisiológicas (CASH, 1998; GYGI et al., 2000). Para estes estudos, a eletroforese bidimensional (2-DE) vem sendo considerada um dos métodos mais eficazes e eficientes (SARAVANAN; ROSE, 2004).

Em qualquer estudo proteômico, a extração e preparo das amostras é a etapa crítica para a realização da 2-DE (WANG et al., 2003; GÖRG et al., 2004; CARPENTIER et al., 2005). As amostras de plantas requerem normalmente condições drásticas de extração devido a robustez da parede celular, grande abundância de metabólitos secundários (compostos fenólicos, pigmentos, polissacarídeos, terpenos e ácidos orgânicos) (HERBERT, 1999), tecidos recalcitrantes, idades das folhas e frutos que geralmente possuem altos níveis

de compostos que podem interferir fortemente nos resultados dos géis da 2-DE (WANG et al., 2003; GORG et al., 2004; CARPENTIER et al., 2005).

Vários métodos de extração de proteínas para 2-DE foram desenvolvidos e adaptados para o uso em estudos de proteômica para uma série de diferentes espécies de culturas importantes, tais como: arroz (*Oryza spp.*) (DOOKI et al., 2006; YAN et al., 2006; YI et al., 2007), milho (*Zea mays* L.) (SAUER et al., 2006; LI et al., 2007), banana (*Musa spp.*), soja (*Glycine max*) (XU et al., 2008), maçã (*Malus domestica* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.) (SARAVANAN; ROSE, 2004), e colmos de cana-de-açúcar (ASKARI et al., 2006). Já para tecidos de folhas e raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) poucos protocolos adequados para extração de proteínas são conhecidos, pois os tecidos da cana possuem grande rigidez, uma natureza altamente fibrosa, níveis elevados de enzimas oxidativas, compostos fenólicos, carboidratos e outros metabólitos que interferem na extração (ASKARI et al., 2006).

Devido à importância econômica da cana-de-açúcar, a necessidade do entendimento de seus processos fisiológicos específicos e a carência de estudos envolvendo o proteoma dessa cultura, o objetivo deste estudo foi testar protocolos de extração de proteínas totais de tecidos de folhas e de raízes de cana-de-açúcar para sua utilização na 2-DE, visando a obtenção de um maior número de spots de proteínas, alta reprodutibilidade e maior resolução dos géis. Foram comparados os três métodos para a extração de proteínas mais comumente utilizados em tecidos vegetais: método 1 - ácido tricloroacético/acetona (DAMERVAL et al., 1986); método 2 - ácido tricloroacético/acetona modificado (SHEN; MATSUBAE, 2002) e o método 3 - fenol / SDS/acetato de amônio (WANG et al., 2003).

Materiais e Métodos

Plantas e Reagentes

Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar, oriundas de gemas após 60 dias de crescimento. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 10 L, com substrato comercial e irrigação manual. Para todos os métodos testados as folhas e raízes foram coletadas separadamente, maceradas em almofariz previamente resfriado com N₂ líquido contendo PVPP 0,02 g/g

de tecido. Aliquotas do material pulverizado (1 g) foram imediatamente transferidos para tubos centrífuga de 10 mL e armazenados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Extração de Proteína

Foram testados três diferentes métodos de extração de proteínas para os tecidos de folhas e raízes de cana-de-açúcar. Cada procedimento de extração de proteínas foi realizado em três replicatas biológicas.

Método 1. Extração TCA/acetona

O protocolo foi desenvolvido com modificações do método descrito por Damerval et al. 1986. Ressuspendeu-se o material pulverizado em 10 mL tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), β -mercaptoetanol 14 mM e PMSF 1 mM (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil). Após 10 minutos de leve agitação em gelo, o material foi centrifugado a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo acrescentando-se 10 mL de solução de 10% TCA em acetona e incubadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas para a precipitação das proteínas. Em seguida, o extrato protéico foi novamente centrifugado a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e o precipitado lavado duas vezes com solução aquosa de acetona a 80% gelada. A cada etapa de lavagem o precipitado foi agitado por 1 minuto e centrifugado por 15 minutos a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse procedimento, o precipitado foi seco e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Método 2. Extração TCA/acetona modificado

O método 2 foi baseado na metodologia descrita por Shen et al. (2002) com modificações. O material pulverizado foi ressuspendido em 10 mL de tampão de extração contendo Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), Polivinil polipirrolidona (PVPP) 0,2% (m/v), sacarose 250 mM, EDTA 10mM, triton X-100 1% (v/v), PMSF 1 mM e β -mercaptoetanol 2% (v/v). A amostra foi mantida sob agitação constante em gelo por 2 horas seguido de centrifugação a 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo e acrescentando-se mais 10 mL do tampão de extração. Centrifugou-se novamente a 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e o sobrenadante foi novamente transferido a um novo tubo ao qual foram acrescentados 10 mL de solução

10% de TCA em acetona. O material foi incubado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima e lavado por três vezes com solução de 10% de TCA/acetona e uma vez em etanol 80%. O precipitado foi seco e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Método 3. Extração com Fenol/SDS

O método foi desenvolvido adaptando-se protocolo descrito por Wang et al. (2003). O material pulverizado foi ressuscitado em 10 mL de solução contendo PVPP 1% (m/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e PMSF 1 mM em acetona gelada e mantido sob homogeneização constante em gelo por 2 horas. Após a centrifugação por 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado cinco vezes com acetona gelada e seco por liofilização. Após liofilização, o material foi lavado por quatro vezes com 10 mL de TCA 10% em acetona gelada e centrifugado por 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Para cada etapa de lavagem o material foi agitado por 30 segundos em vórtex, lavado duas vezes com 10% TCA em água, lavado duas vezes em acetona 80% e uma vez em etanol 80% e novamente liofilizado. O precipitado foi então ressuscitado em 10 mL de tampão de extração contendo SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M e pH 8,0), PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v). Após agitação por 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado tampão tris-fenol saturado (pH 8,0) e o material foi agitado novamente em gelo por 10 minutos. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e a fração fenólica foi coletada e transferida para um novo tubo. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas por 12 horas a -20°C . Em seguida o extrato foi centrifugado por 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes em acetato de amônio 0,1 M em etanol, duas vezes em acetona 80% e mais uma vez em etanol 80%. A cada etapa de lavagem o precipitado foi ressuscitado e centrifugado por 12.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. O precipitado final foi seco e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Para todos os métodos, após extração, as proteínas foram dissolvidas em tampão de solubilização contendo 7 M de uréia, 2 M de tiuréia e 2% de triton x-100. As amostras foram sonicadas três vezes por 30 segundos e centrifugadas. Após ressolubilização, as amostras foram armazenadas em alíquotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Quantificação de Proteínas

A concentração de proteína foi determinada utilizando método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A eletroforese bidimensional foi realizada utilizando fitas de gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip®) de 13 cm, pH 4-7 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Para cada fita, o equivalente a 800 µg dos extratos protéicos de tecidos de folhas foi ressuspensionado em 250 µL de tampão de reidratação [uréia 7 M, de tiouréia 2 M, Triton X-100 0,4% v/v, CHAPS 4% m/v, ditioneitol (DTT) 1% m/v, tampão IPG 1% v/v, Azul de Bromofenol 0,05% m/v e tampão 4-7 (GE Healthcare). As fitas foram reidratadas por 14 horas a temperatura ambiente. A focalização isoelétrica foi feita em aparelho IPGphor IEF system (GE Healthcare). Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas por 15 minutos em tampão de equilíbrio (Uréia 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8) contendo 10 mg/mL de DTT seguido de 15 minutos em tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida. Após equilíbrio, as fitas foram lavadas com água ultrapura e a segunda dimensão foi adquirida através de SDS-PAGE 12% utilizando sistema Amersham Hoefer SE600 system (GE Healthcare). As condições de corrida foram: pré-corrida a 15 mA/gel por 30 minutos seguido de corrida a 30mA/gel por 6 horas, a 15 °C. Os spots de proteínas foram revelados utilizando *Coomassie Brilliant Blue* G-250 como corante e em seguida digitalizadas em scanner de alta precisão (GE Healthcare) e analisados com o programa Image Master 2D platinum (v.7.0, GE).

Para confirmação de qualidade do gel, alguns spots foram manualmente recortados dos géis e enviados para análise por Espectrometria de Massas MALDI-TOF-TOF MS/MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics Handelsregister, Bremen, Germany) no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Resultados e Discussão

O sucesso do estudo do proteoma de qualquer organismo, utilizando a 2-DE, depende primeiramente de uma eficiente etapa de extração. O resultado da 2-DE, em termos de concentração e qualidade do extrato protéico a ser resolvido no gel vai depender, em grande parte, da escolha do método de extração adotado para o tipo de tecido em estudo, pois este influencia diretamente na primeira dimensão de separação, a focalização isoeétrica (GORG et al., 2004).

Na Tabela 1, constam os dados de quantificação de proteínas totais nos extratos de tecido de folhas e de raízes de cana-de-açúcar, obtidos utilizando-se os três diferentes métodos de extração previamente descritos. De acordo com os resultados obtidos, os métodos 2 e 3 foram os que proporcionaram maiores rendimentos na extração de proteínas totais de folhas. O método 3 se mostrou, ainda, com a mesma eficiência para a extração de proteínas de tecido de folhas e de raízes. Os tecidos de raízes e folhas apresentam-se geralmente tanto morfológico quanto fisiologicamente distintos. Folhas apresentam como principais estruturas para a fotossíntese e em alguns processos de defesa, os cloroplastos (HOWE; BROWSE, 2001), enquanto que em raízes possuem os leucoplastos, (ITOH; FUJIWARA, 2010), que não são pigmentadas e apresentam-se como organelas de armazenamento. Além disso, folhas apresentam normalmente barreiras extracuticulares, como ceras e tricomas (VALKAMA et al., 2005), enquanto que as raízes interagem com o ambiente diretamente via espaço apoplástico, que é separado do sistema vascular pelas bandas de caspari (WAISEL et al., 2002). Apesar dos tecidos apresentarem diferentes composições protéicas, o método 3 foi extremamente eficiente na remoção dos compostos interferentes de ambos.

Tabela 1. Rendimento de extração de proteínas de tecido de folha e raiz de cana-de-açúcar utilizando os 3 métodos de extração testados. Método 1: (ácido tricloroacético/acetona). Método 2: (ácido tricloroacético/acetona modificado). e Método 3: (SDS/fenol/acetato de amônio). As quantificações foram realizadas utilizando método de Bradford e os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão (n=3).

	Concentração de Proteína (mg/g de tecido fresco)		
	Método 1	Método 2	Método 3
Folhas	13,33 \pm 0.72	17,26 \pm 0.64	22,41 \pm 0,46
Raízes	-	5,10 \pm 0.30	24,98 \pm 1,20

A extração de proteínas das raízes utilizando o método 1 (ácido tricloroacético/acetona) não foi realizada, haja vista a baixa eficiência de extração para tecidos foliares. Pela mesma razão os extratos de tecidos foliares obtidas pelo método 1 não foram submetidas a 2-DE.

Analisando os constituintes dos diferentes métodos, observa-se que o método 1 é seletivo para proteínas solúveis, pois não há a força iônica média do tampão Tris sem a adição de detergentes, portanto uma baixa recuperação de proteínas no extrato. O método 2 é seletivo para proteínas solúveis e aquelas de membrana solúveis no detergente não iônico Triton X-100, com capacidade de solubilização moderada. O método 3 foi desenvolvido para, apesar da possibilidade de excluir algumas proteínas que possam ser descartadas no primeiro sobrenadante, solubilizar as proteínas restantes em condições mais severas, em razão do uso do detergente iônico SDS. Portanto é de se esperar uma maior concentração de proteínas utilizando este método. No entanto, em estudos que utilizem a 2-DE, deve-se considerar, além da concentração no extrato, uma série de outros fatores. Entre eles, a compatibilidade com os agentes desnaturantes e dissociantes utilizados (uréia e tiouréia), os graus de proteólise sofridas em cada método de extração (WANG et al., 2003) e as particularidades dos constituintes dos tecidos de cana-de-açúcar, como a sua rigidez e natureza fibrosa, níveis extremos de enzimas oxidativas, carboidratos, compostos fenólicos e outros metabólitos interferentes (ALMARAJ et al., 2010), ou seja a determinação da qualidade dos extratos para a 2-DE dos extratos necessitou ser testada.

Para analisar a qualidade dos géis, primeiramente os extratos foram separados na focalização isoelétrica em uma faixa de pH 3-10. A qualidade na resolução e separação dos spots foi muito baixa, estando as proteínas quase que em sua totalidade localizadas na faixa de pH 4-7 (Dados não mostrados). Almaraj et al. (2010) demonstram resultados similares para proteínas de colmo de cana-de-açúcar. Portanto, passou-se a adotar este intervalo de separação para as proteínas de cana-de-açúcar.

O número médio de spots de proteínas de tecidos de folhas presentes nos géis e detectados pelo software Image Master 2D platinum (v.7.0) (ANOVA, $p \leq 0,01$) utilizando o método 2 de extração foi de 179 enquanto que para os extratos do método 3 a média foi de 517 spots. Já nos géis com os extratos de tecidos radiculares obtidos pelo método 3 foram detectados 633 spots. Quando se observam os géis (Figura 1), além da diferença no número de spots

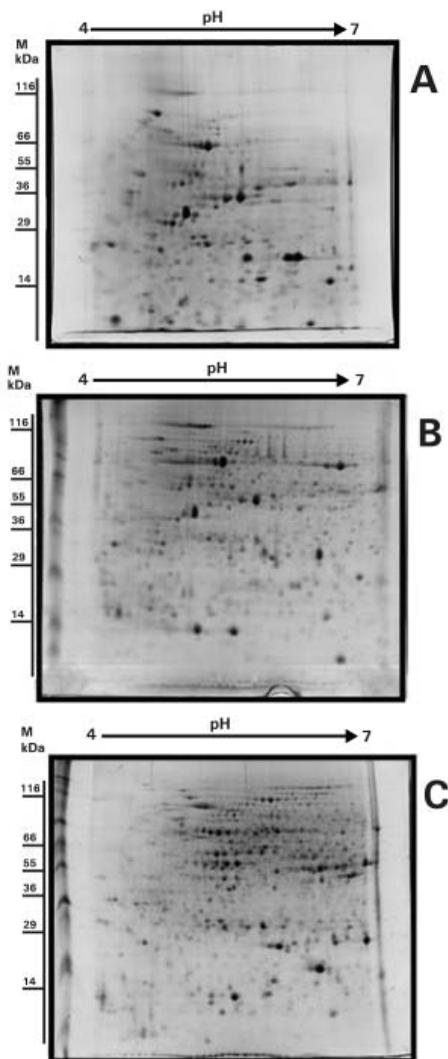


Figura 1. Separação de proteínas totais de tecidos de cana-de-açúcar por eletroforese bidimensional (2-DE). A) Proteínas de tecido de folhas de cana-de-açúcar extraídas utilizando o método 2 (ácido tricloroacético/acetona modificado). B) Proteínas de tecido de folhas de cana-de-açúcar extraídas utilizando o método 3 (SDS /fenol/acetato de amônio); C) Proteínas de tecido de raiz de cana-de-açúcar extraídas utilizando o Método 3 (SDS/fenol/acetato de amônio); Focalização isoeletrica realizada em gradiente linear de pH 4-7. SDS-PAGE realizada em géis de 12% e os géis foram revelados utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 como corante.

de proteínas entre os extratos 2 e 3 (Figura 1A e 1B), verifica-se uma maior resolução das proteínas no gel e também a presença de proteínas de alto peso molecular quando utilizou-se o método 3 além de géis livres de manchas e estrias com spots bem definidos e distribuídos por todo o gel. As mesmas observações de número e qualidade na resolução e distribuição de proteínas no extrato de tecidos de raiz utilizando o método 3 (Figura 1C) podem ser inferidas.

O método 2 (ácido tricloroacético/acetona) modificado tem sido amplamente utilizado em análises 2-DE. Os métodos que usam o ácido tricloroacético são a primeira escolha para extração de proteínas de diferentes órgãos e tecidos vegetais, principalmente devido à sua facilidade de uso, rapidez, alta reprodutibilidade e resolução dos spots de amplas faixas de massas moleculares e de pH (WANG et al., 2003). Há descrições deste método para tecidos de várias outras plantas (SAUER et al., 2006; YAN et al., 2006; LI et al., 2007; YI et al., 2007; XU et al., 2008; ASKARI et al., 2006; WANG et al., 2003). Apesar das vantagens, a ressolubilização das proteínas extraídas, por esse método, tem-se mostrado difícil e pouco eficiente (PLOMION et al., 2006). Saravanan et al. (2004), demonstram que os extratos obtidos de folhas, raízes e flores de plantas tais como banana (*Musa spp.*), laranja (*Citrus spp.*), abacate (*Persea spp.*) e tomate (*Solanum spp.*) utilizando o método 3 (SDS/fenol/acetato de amônio) (ácido tricloroacético/acetona modificado) continham mais proteínas (mg/g peso fresco) do que o com o método 2 (ácido tricloroacético/acetona modificado), além de gerar géis com proteínas melhor resolvidas na 2-DE, inclusive as de altas massas moleculares. O método 3 tem sido o método preferencial para tecidos vegetais mais recalcitrantes (WANG et al., 2003) e resultados similares têm sido encontrados para tecidos de gramíneas como para tecido radicular de milho (ISAACSON et al., 2006), colmo de cana-de-açúcar (ALMARAJ et al., 2010) folhas e raízes de cana-de-açúcar do presente estudo, portanto podendo-se padronizar o mesmo protocolo para extração de proteínas dos diferentes tecidos de cana-de-açúcar.

A remoção dos compostos contaminantes que se encontram no tecido macerado é um dos passos cruciais para a proteômica utilizando 2-DE. A remoção desses compostos interferentes envolve sempre a utilização de solventes orgânicos como a acetona ou o 10% TCA em acetona (ZHOU et al., 2002). Para as extrações de tecidos de folhas e raízes de cana-de-açúcar, introduziu-se uma lavagem com metanol e uma lavagem com metanol na

presença de acetato de amônio, pois esse tem sido usado na retirada de compostos fenólicos. Essa última neutraliza os resíduos de TCA aumentando o pH para uma faixa >7 , facilitando a extração das proteínas pelo fenol.

Para confirmar a qualidade dos extratos proteicos obtidos com o método 3, após a 2-DE, alguns spots foram aleatoriamente selecionados para identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF-TOF (Dados não mostrados). A grande maioria dos spots gerou espectros de boa qualidade permitindo a identificação da proteína, apesar de apenas as sequências geradas pelo projeto genoma funcional da cana-de-açúcar (SUCEST) estarem disponíveis nos bancos de dados, portanto a extração utilizando o método 3 foi eficaz também na remoção de possíveis interferentes na aquisição dos espectros de massa que permitem a identificação das proteínas nos estudos de proteômica da cana-de-açúcar.

Conclusões

- Os métodos 2 e 3 de extração promovem bons rendimentos em quantidade de proteína extraída para tecidos de folhas de cana-de-açúcar.
- O método 3 é igualmente eficiente em termos de rendimento para extração de proteínas de tecidos de folhas e de raízes de cana-de-açúcar.
- A eletroforese de proteínas de tecidos de cana-de-açúcar é melhor resolvida quando utilizado gradiente de pH de 4-7, sem prejuízo de perda de proteínas com ponto isoelétrico fora destes limites.
- Os extratos obtidos com os métodos 2 e 3 produzem géis com boa resolução e livres de manchas e estrias com spots bem definidos, satisfatórios para estudos de proteômica.
- Os géis com os extratos obtidos com o método 3 apresentam os melhores resultados em termo de rendimento, qualidade dos géis e número e distribuição de spots em amplas faixas de Peso Molecular.
- O método 3 é eficiente para a utilização em estudos de proteômica que utilizam a eletroforese 2D, especialmente na remoção de contaminantes

e interferentes, haja vista que foi possível a identificação da proteína correspondente a grande maioria dos spots analisados.

Referências

AMALRAJ, R. S.; SELVRAJ, N.; VELUSWAMY, G. K.; RAMANUJAR, R. P.; MUTHURAJAN, R.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; VESWANATHAN, R. Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, Weinheim, DE, v. 31, p. 1959–1974, 2010.

ASKARI, H.; EDQUIST, J.; HAJHEIDARI, M.; KAFI, M.; SALEKDE, G. H. Affect of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 6, p. 2542–2554, 2006.

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, USA, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 52, p. 497–2507, 2005.

CASH F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-bidimensional electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, NL, v. 372, p. 121-145, 1998.

D'HONT, A. "Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana," **Cytogenetic and Genome Research**, Karger, AG, v. 109, p. 27–33, 2005.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, DE, v. 7, p. 52–64, 1986.

DOOKI, A. D.; MAYER-POSNER, F. J.; ASKARI, H.; ZAIEE, A.; SALEKDEH, G. H. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 6, p. 6498–6507, 2006.

GÖRG, A.; CARSTEN, L.; WEISS, W. Sample prefractionation in granulated sephadex IEF gels. **Methods in Molecular Biology**, New York, USA, v. 424, p. 277-86, 2008.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 4, p. 3665–3685, 2004.

GYGI, S. P.; CORTHAIS, G. L.; ZHANG, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analyses technology. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, USA, v. 97, p. 9390-9395, 2000.

HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, DE, v. 20, p. 660–663, 1999.

HOWE, G. A.; BROWSE, J. **Jasmonate Synthesis and Action in Higher Plants**. Washington, USA: John Wiley & Sons, 2001.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C. M. B.; SARAVANAN, R. S.; HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M. Simple extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, London, UK, v. 1 p. 769–74, 2004.

ITOH, R.; FUJIWARA, M. T. Regulation of leucoplast morphology in roots: Interorganellar signaling from mitochondria. **Plant Signaling and Behavior**, Bethesda, USA, v. 5, p. 856–859, 2010.

LI, K.; XU, C.; ZHANG, K.; YANG, A.; ZHANG, J. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 7, p. 1501–1512, 2007.

MENOSSE, M.; SIVA FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS M. A.; SOUZA, G. M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic

trait development, **International Journal of Plant Genomics**, Cairo, EG, v. 2008, p. 1–11, 2008.

PLOMION, C.; LALANNE, C.; CLAVEROL, S.; MEDDOUR, H.; KOHLER, A.; BOGEAT-TRIBOULOT, M.; BARRE, A.; PROVOST, G. L.; DUMAZET, H.; JACOB, D.; BASTIEN, C.; DREYER, E.; DARUVAR, A.; GUEHL, J.; SCHMITTER, J.; MARTIN, F.; BONNEU, M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 6, p. 6509–6527, 2006.

SARAVANAN, R. S.; ROSE, J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 4, p. 2522– 2532, 2004.

SAUER, M.; JAKOB, A.; NORDHEIM ,A.; HOCHHOLDINGER, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 6, p. 2530–2541, 2006.

SHEN, S., MATSUBAE, M. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, Tokio, JP, v. 132, p.613-620, 2002.

VALKAMA, E.; KORICHEVA, J.; SALMINEN, J. P.; HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K.; PIHLAJA, K. Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi? **Trees Structure and Function**, New York, USA, v. 19, p 191–197, 2005.

WAISEL, Y.; ESHEL, A., KAFKAFI, U. **Plant roots: the hidden half**. New York: Marcel Dekker, 2002.

WANG, W., SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, Weinheim, DE, 24, 2369–2375, 2003.

XU, C.; SULLIVAN, J. H.; GARRETT, W. M.; CAPERNA, T. J.; NATARAJAN, S. Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. **Phytochemistry**, Amsterdam, NL, v. 69, p. 38–48, 2008.

YAN, S. P.; ZHANG, Q. Y.; TANG, Z. C.; SU, W. A.; SUN, W. N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular and Cellular Proteomics**, Rockville, USA, v. 5, p. 484–496, 2006.

YI, L.; TAO, Y.; ZHAO, K.;, SHAO, J.; LI, X.; LIU, G.; LIU, S.; ZHU, L. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. **Proteomics**, Weinheim, DE, v. 7, p. 755–768, 2007.

ZHOU, G.; LI, H.; DECAMP, D.; CHEN S.; SHU, H.; GONG, Y.; FLAIG, M., GILLESPIE, J. W.; HU, N.; TAYLOR, P. R.; EMMERT-BUCK, M. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F., ZHAO, Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. **Molecular and Cellular Proteomics**, Rockville, USA, v. 1, n. 2, p. 117-124, 2002.

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA