

Caracterização de Exoproteínas por Eletroforese Bidimensional Utilizando Cultivo Bacteriano como Modelo de Análise: Adequação de Metodologia

Marilia Penteado Stephan¹
Tatiana de Lima Azevedo²
Leonardo Araujo Terra³
Esdras da Silva⁴
Katia Regina dos Santos Teixeira⁵

Foto: Marilia Penteado Stephan



Introdução

O conjunto de proteínas expressas pelo genoma, conhecido como proteoma, é uma importante fonte de investigação para associações funcionais dessas proteínas e muitas delas são de especial interesse devido ao potencial biotecnológico já conhecido ou a ser identificado. O estudo de proteínas de membrana e/ou presentes no meio extracelular, ou exoproteínas, permite caracterizar os processos de interações que os microrganismos podem estabelecer com o meio em que vivem. Uma das grandes dificuldades de estudar esses exoproteomas é a limitação das técnicas capazes de permitir que proteínas localizadas fora das células (secretadas de forma ativa ou passiva) sejam obtidas em grande quantidade e livres da presença de contaminantes, que interferem nas análises por eletroforese. Nos últimos anos, estudos de exoproteomas de fungos e de diversas bactérias, principalmente patogênicas e de amostras ambientais, têm sido conduzidos (CLAIR et al., 2010; GOHAR et al., 2005; JOSIC; KOVAC, 2008; KAZEMI-POUR et al., 2004; KELLER; HETTICH, 2009; SCHNEIDER; RIEDEL, 2010). Entretanto, pouco se conhece sobre o

exoproteoma de bactérias que têm a capacidade de fixar nitrogênio e de realizar outras funções promotoras do crescimento vegetal. Recentemente, os exoproteomas de *Herbaspirillum seropedicae* e *Rhizobium etli* foram estudados (CHAVES et al., 2009; MENESES et al., 2010). Chaves et al. (2009) reportam que a presença de exoproteínas oriundas de vias de secreção não-clássicas, e outras, são encontradas no proteoma celular de *H. seropedicae*, sugerindo que estas desempenhem também funções quando livres no meio extracelular. A *Gluconacetobacter diazotrophicus*, assim como diversos microrganismos, produz proteínas essenciais para sua sobrevivência e para o estabelecimento de interação com o seu habitat que são secretadas para o meio. Desta forma, essas proteínas passam a exercer uma função importante no processo de interação da bactéria com o meio ambiente e/ou seu hospedeiro, como, por exemplo, enzimas envolvidas no metabolismo de sacarose. Neste trabalho teve-se como objetivo adequar a metodologia de análise de exoproteínas por eletroforese bidimensional utilizando o cultivo da bactéria fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus* como modelo analítico.

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marilia.stephan@embrapa.br

² Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana.azevedo@embrapa.br

³ Graduando em Ciências Biológicas, bolsista do CNPq-Brasil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, leonardoterra@hotmail.com.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, bolsista FAPERJ/TCT/EMBRAPA, Rio de Janeiro, RJ, esdrasagro@hotmail.com

⁵ Bióloga, D.Sc. em Genética, pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, RJ, katia.teixeira@embrapa.br

Preparo e Processamento das Amostras do Meio de Cultivo

Os sobrenadantes dos cultivos em batelada dos microrganismos (estirpe selvagem e mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5) foram obtidos utilizando as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente por Silva et al. (2009). Com o objetivo de obter sobrenadante com menor quantidade de polissacarídeos foram também utilizados sobrenadantes oriundos de cultivo contínuo (estirpe selvagem-PAL5). O sobrenadante de cada cultivo das diferentes estirpes foi obtido após a separação das células por centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Estes sobrenadantes foram liofilizados, para concentrar as proteínas, e mantidos em freezer a -20 °C. A Tabela 1 mostra as condições de cultivo e as cepas utilizadas neste trabalho. Esta foi uma estratégia utilizada visando à produção de sobrenadante contendo menores quantidades de exopolissacarídeos. A grande produção de polissacarídeos extracelulares por este micro-organismo já foi descrita na literatura científica (STEPHAN et al., 1995).

Tabela 1. Cepas selvagens e suas respectivas condições de cultivo.

CEPAS (<i>Gluconobacter diazotrophicus</i>)	CULTIVO BATELADA	CULTIVO CONTÍNUO
PAL5 (1) Selvagem	realizado	não realizado
PAL5 (2) Selvagem	não realizado	realizado
PAL 5 (3) Selvagem	não realizado	realizado
PAL5 (4) Selvagem	não realizado	realizado
PAL5 (5) Selvagem	não realizado	realizado
16G6 (mutante)	realizado	não realizado
16D10 (mutante)	realizado	não realizado
K416 (mutante)	realizado	não realizado

- (1) Cultivo realizado com 50g/L de glicose e nitrogênio (1mM de NH₄SO₄)
 (2) Cultivo realizado com 100g/L de açúcar cristal com nitrogênio
 (3) Cultivo realizado com 20g/L de açúcar cristal com nitrogênio
 (4) Cultivo realizado com 100g/L de açúcar cristal sem nitrogênio (fixação biológica do nitrogênio)
 (5) Cultivo realizado com 100g/L de açúcar cristal sem nitrogênio (fixação biológica do nitrogênio)

O protocolo escolhido foi baseado em um dos métodos utilizados para extrair proteínas de frutos de morangos e de outros tecidos recalcitrantes apresentados por Zheng et al. (2007). Após aproximadamente um ano de armazenamento, os sobrenadantes liofilizados foram solubilizados em tampão Tris- HCl 10 mM e Na-EDTA 1mM (pH 8,0), para estabelecer um volume de trabalho comum a todas as

amostras. Posteriormente, o equivalente a 2,5 mL dessa suspensão foi misturado com um volume de tampão de lise gelado (0,7 M de sacarose, 0,1 M de KCl, 0,5 M de Tris-HCl pH 8,5, 50 mM EDTA pH 8,5, 1% de polivinilpolipirrolidona [PVPP] e 40 mM ditioneitol [DTT]). Após homogeneização, foi adicionado um volume de solução de fenol equilibrado com Tris-HCl (pH 8,0) e a amostra foi novamente homogeneizada para a mistura das fases aquosa e fenólica. Em seguida, as fases foram separadas por centrifugação a 10.000g durante 15 min a 4°C para remoção de polissacarídeos, DNA entre outras moléculas. A parte superior correspondente à fase fenólica foi transferida para um novo tubo e extraída duas vezes como descrito acima. Após esse processo, o extrato foi homogeneizado com cinco vezes o volume de solução de acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubado a -20°C durante uma noite para que ocorresse a precipitação e concentração das proteínas. O extrato foi centrifugado a 10.000 g durante 15 min a 4°C, o precipitado obtido foi lavado duas vezes com metanol a 4°C e com solução gelada de 20mM de DTT em acetona (Figura 1). O precipitado obtido foi solubilizado em tampão de reidratação (7 M uréia, 2,0 M tioureia, 2% (p/v) CHAPS, 10 mM DTT) contendo 0,5% do tampão de anfólitos, de acordo com a faixa do gradiente de pH da tira de isoeletrofocalização (IEF).

Quantificação de Proteína pelo Método de Bradford

O método de Bradford (1976) foi aplicado para quantificar as proteínas solúveis nos sobrenadantes. As amostras foram diluídas em solução tampão de reidratação, na proporção de 1:3 e 5 µL de cada. As amostras foram alíquotadas em poços de placa tipo Elisa, em triplicata. A cada uma foi adicionado 250 µL do reagente de Bradford e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura da curva padrão, e das amostras desconhecidas, foi realizada em leitor de placas de Elisa utilizando comprimento de onda de 595 nm. A concentração das amostras desconhecidas foi determinada utilizando a equação da curva padrão. Foi utilizada uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA).

Análise de Proteínas por Eletroforese Uni e Bidimensional

Os extratos proteicos foram analisados unidimensionalmente em gel de poliacrilamida SDS-PAGE na concentração de 10%, para determinar a quantidade de material no extrato. A eletroforese foi realizada pelo período de 4 h e 30 min a 30 mA. O gel foi corado com solução de Coomassie “Blue silver” (CANDIANO et al., 2004) e posteriormente com solução de prata (GE Healthcare Life Sciences).

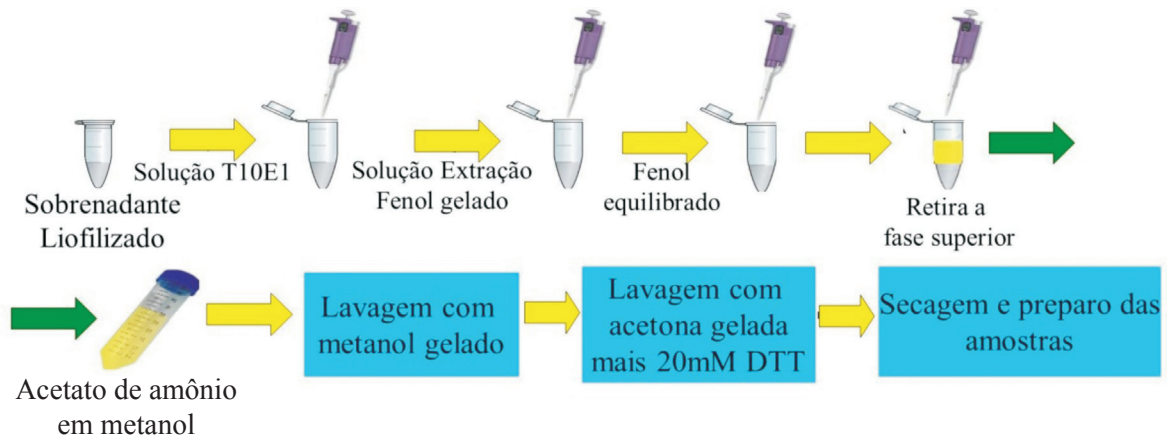


Figura 1. Esquema do protocolo com fenol equilibrado para a obtenção de proteínas presentes nos sobrenadantes (exoproteínas) de culturas de *G. diazotrophicus*.

Para a eletroforese bidimensional, as tiras foram hidratadas durante uma noite com 250 μ L de tampão de reidratação contendo aproximadamente 100 μ g de proteína. As condições de eletroforese aplicadas foram as pré-estabelecidas no programa de controle do IPG-Phor (GE Healthcare) variando apenas em relação ao tamanho, número de tiras e faixa de pH utilizados. Após a eletroforese na primeira dimensão as tiras foram equilibradas e submetidas à eletroforese na segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10% por 4 h a 20 mA. O gel foi revelado utilizando solução de prata como método de coloração, havendo substituição do formaldeído (agente revelador) por uma solução alcalina de borato contendo um açúcar redutor (aldose). Este procedimento permite uma posterior análise deste material por espectrometria de massa (CHEVALLET et al., 2008).

Resultados

O protocolo de extração de exoproteínas com fenol foi aplicado para separar a fração de proteínas presentes no meio extracelular, independentemente do processo de secreção de outros componentes como exopolissacarídeos, DNA e outras moléculas que também são secretadas durante cultivos *in vitro* por diversos microrganismos. Para avaliação do exoproteoma de *G. diazotrophicus* outros protocolos foram avaliados anteriormente (MOLINARI et al., 2010; SILVA et al., 2009). No entanto, os resultados obtidos indicaram interferências na isoeletrofocalização decorrentes do excesso de sais e ineficiência na recuperação de proteínas devido ao excesso de polissacarídeos na fração do sobrenadante. Estas interferências foram evidenciadas pela desidratação das tiras e aquecimento durante a isoeletrofocalização. Além disso, ocorreram alterações no perfil da curva de isoeletrofocalização em relação à curva pré-estabelecida pelo programa de controle do IPG-Phor (Figura 2). Foram observadas distribuições e migração anômala dos spots na segunda dimensão após a isoeletrofocalização, como ilustrado na Figura 3.

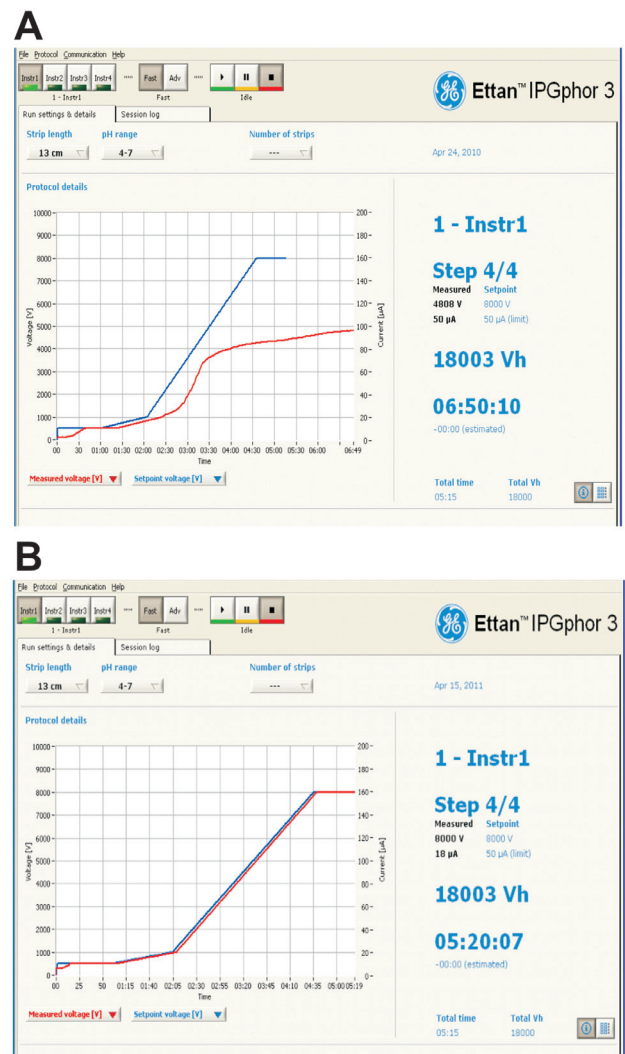


Figura 2. Perfil de curva de isoeletrofocalização dos extratos obtidos por diálise, precipitação com TCA e acetona (A) e pela extração com fenol (B). Linha azul indica o perfil de corrente teórica esperada, a linha vermelha representa o comportamento observado.

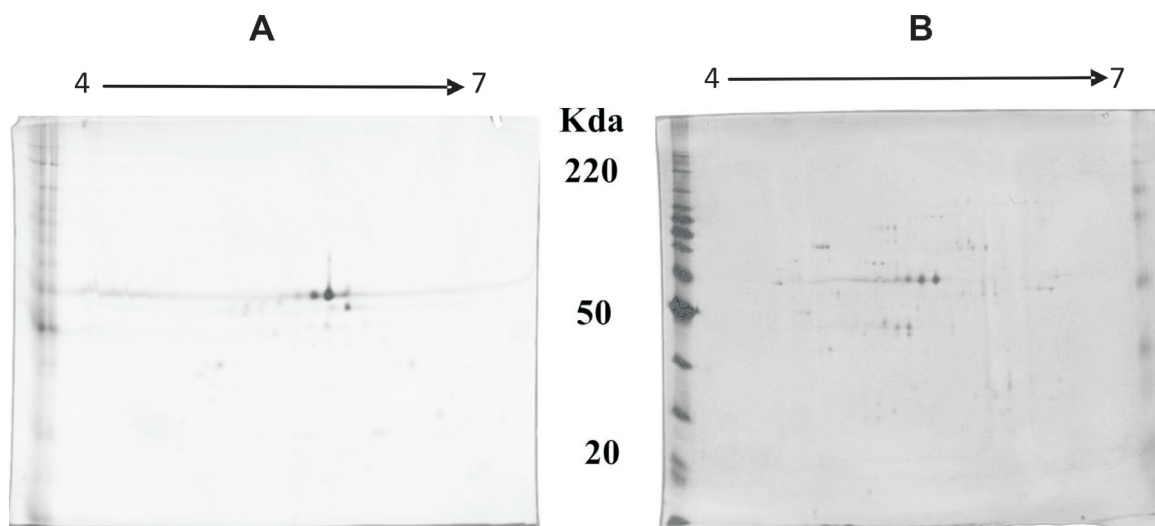


Figura 3. Segunda dimensão da eletroforese bidimensional do exoproteoma do mutante 16G6 obtidos por diálise, precipitação com TCA e acetona (A) e pela extração com fenol (B).

Na primeira dimensão de eletroforese 2D, a tendência da curva de corrente durante a isoeletrofocalização não indicou a presença de agentes interferentes nos extratos, devido a sucessivas lavagens com metanol gelado e acetona gelada contendo 20 mM de DTT (Figura 2B). Também foi possível observar que a resolução dos *spots* na segunda dimensão foi melhor para a extração contendo fenol (Figura 3B) não tendo sido observado o mesmo padrão de migração arrastada, evidenciada por uma linha de frente na altura de aparecimento dos spots em relação a um dos protocolos testados anteriormente (Figura 3A). Nos testes realizados verificou-se que o protocolo utilizando fenol equilibrado permitiu a quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

Assim, os dados obtidos pela quantificação foram comparáveis com os dados qualitativos observados durante a separação por eletroforese unidimensional (Figura 4), exceto para a amostra 39. A amostra de cepa selvagem PAL5 apresenta como característica três fatores preponderantes que a diferenciam das demais: a) foi cultivada com baixo teor de açúcar b) foi cultivada em condições de fixação biológica do nitrogênio c) foi cultivada em um meio de cultura onde foi utilizado um açúcar comercial (açúcar cristal). Isso pode indicar a presença de contaminantes que interferiram na quantificação pelo método de Bradford, superestimando a quantidade de proteínas presentes no extrato.

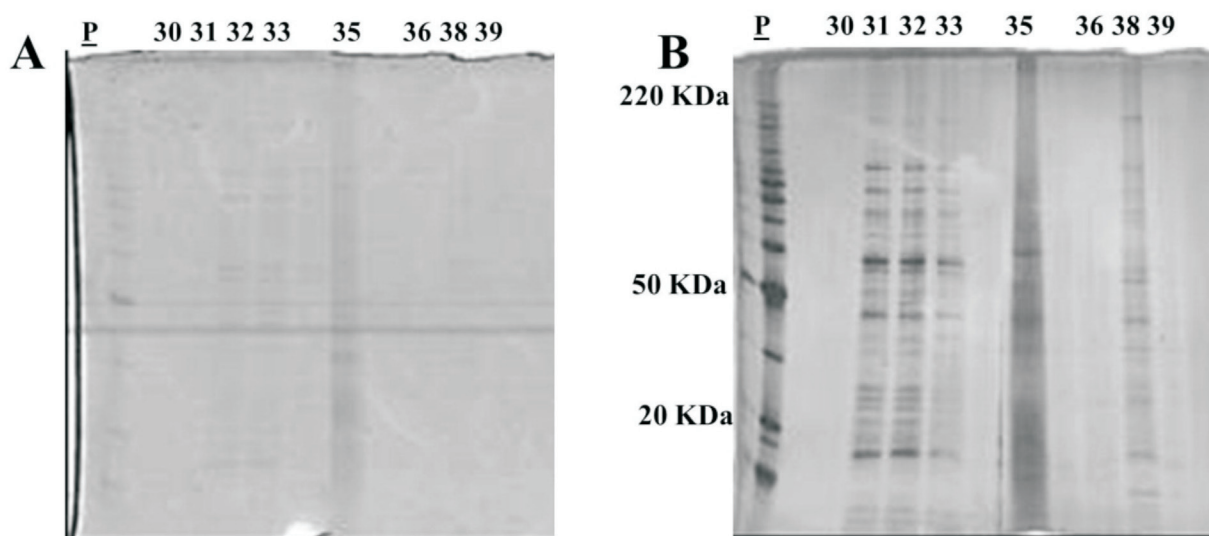


Figura 4. Perfil de exoproteínas de *G. diazotrophicus* selvagem (PAL5) e mutantes em eletroforese SDS-PAGE corado com Coomassie "Blue Silver" (A) e Solução de Prata (B) presentes nos sobrenadantes de cultivos de *G. diazotrophicus*.

Legendas: P) Padrão de peso molecular 10 μ L (Bechmarker n° cat. 10747-012). Extratos de proteínas obtidas de sobrenadantes de meio de cultivo (LGI-P) contendo 50 g/L de glicose e 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 30) *G. diazotrophicus* PAL5, 31) 16G6, 32) 16D10, 33) K416. Extratos de proteínas obtidas de cultivos contínuos (CC) de *G. diazotrophicus* PAL5: 35) em 100g/L de açúcar cristal com nitrogênio, 36) em 20g/L de açúcar cristal com nitrogênio, 38) em 100g/L de açúcar cristal em condição de FBN e 39) em 20g/L de açúcar cristal em condição de FBN.

Conclusão

A coloração com prata usando aldose, apesar de menos sensível que a coloração com prata tradicional, permitiu a detecção de *spots* que poderão ser utilizados em futura análise exoproteômica por espectrometria de massa.

A metodologia aplicada neste trabalho foi tão eficiente quando àquela observada para morango (rica no polissacarídeo pectina), mostrando que o método com fenol eliminou também os exopolissacarídeos bacterianos que poderiam interferir nesta análise.

Agradecimentos

À Renata Jorge da Silva, responsável pela realização dos cultivos, como parte de seus ensaios durante estágio como Bolsista de IC/PIBIC/Embrapa. Ao apoio financeiro dos projetos e órgãos financiadores que apoiaram e seguem apoiando estes estudos, em especial ao INCT-FBN (CNPq), CBAB/CNPq e Embrapa.

Referências

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, May 2004.
- CHAVES, D. F. S.; SOUZA, E. M. de; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. de O. A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 50-56, Nov. 2009.
- CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; DIEMER, H.; STRUB, J.-M.; VAN DORSSELAER, A.; RABILLOUD, T. Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. **Proteomics**, v. 8, n. 23-24, p. 4853-4861, Dec. 2008.
- CLAIR, G.; ROUSSI, S.; ARMENGAUD, J.; DUPORT, C. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1486-1498, Jul. 2010.
- GOHAR, M.; GILOIS, N.; GRAVELINE, R.; GARREAU, C.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. **Proteomics**, v. 5, n. 14, p. 3696-3711, Sept. 2005.
- JOSIC, D.; KOVAC, S. Application of proteomics in biotechnology—microbial proteomics. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 4, p. 496-509, Apr. 2008.
- KAZEMI-POUR, N.; CONDEMIN, G.; HUGOVIEX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 3177-3186, Oct. 2004.
- KELLER, M.; HETTICH, R. Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 1, p. 62-70, Mar. 2009.
- MENESES, N.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; ENCARNACIÓN, S. The extracellular proteome of *Rhizobium etli* CE3 in exponential and stationary growth phase. **Proteome Science**, v. 8, n. 51, Oct. 2010.
- MOLINARI, M. L.; SILVA, E.; CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L.; TEIXEIRA, K. R. S. From continuous culture to the proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 12.; INTERNATIONAL INCT SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 2., 2010, Búzios. **Proceedings...** Rio de Janeiro: UENF/UFRJ/INCT, 2010.
- SCHNEIDER, T.; RIEDEL, K. Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 785-798, Feb. 2010.
- SILVA, R. J. da; GODOY, R. L. de O.; ROSA, J. S. da; SOUZA, V. T. da S.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Produção de ácidos orgânicos associada à fixação de nitrogênio em mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus***. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 53).
- SILVA, R. J.; SILVA, E.; VIDAL, M. S. STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S. Analysis of protein profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants related with gluconic acid production. In: INTERNATIONAL INCT SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1., 2009, Curitiba. **Program and index...** Brasília, DF: INCT, 2009. p. 67.

STEPHAN, M. P.; FONTAINE, T.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Differentiation of capsular polysaccharides from *Acetobacter diazotrophicus* strains isolated from sugarcane. *Microbiology and Immunology*, v.39, n.4, p.237-242.

ZHENG, Q.; SONG, J.; DONCASTER, K.; ROWLAND, E.; BYERS, D. M. Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 5, p. 1663-1673, Mar. 2007.

Comunicado Técnico, 200

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: André Luis do Nascimento Gomes,
Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg,
Márcia Penteadó Stephan, Michele Belas Coutinho,
Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas

Revisão de texto: Virgínia Martins da Matta

Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo

Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes e
Marcos Moulin