



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1679-0154

Dezembro, 2005

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 02

**Bioquímica Molecular como
Ferramenta para Conservação e
Uso da Biodiversidade Agrícola
Tropical: desenvolvimento de
marcador imunoquímico para
identificação de bactérias
endofíticas do milho**

Sete Lagoas, MG
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

Fone: (31) 3779 1000

Fax: (31) 3779 1088

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães

Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia Teixeira

Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio

Antônio Rezende Monteiro

Supervisor editorial: Clenio Araujo

Revisor de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira

Normalização bibliográfica: Maria Tereza Rocha Ferreira

Editoração eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira

1ª edição

1ª impressão (2005): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

Figueiredo, José Edson Fontes

Bioquímica molecular como ferramenta para conservação e uso da biodiversidade agrícola tropical: desenvolvimento de marcador imunológico para identificação de bactérias endofíticas do milho / José Edson Fontes Figueiredo... [et al.]. – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005.

12 p. ; 21 cm. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo.

ISSN 1679-0154; 2)

1. Milho. 2. Marcador imunológico. 3. Bactéria endofítica. I. Figueiredo, J. E. F. II. Série.

633.15 - CDD

© Embrapa 2005

Sumário

Introdução	5
Material e Métodos	6
Purificação do polipeptídeo de 42 kDa por eletroeluição	6
Purificação por FPLC	6
Seqüenciamento amino-terminal do polipeptídeo de 42 kDa	8
Produção de anticorpos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões	12

Bioquímica Molecular como Ferramenta para Conservação e Uso da Biodiversidade Agrícola Tropical: desenvolvimento de marcador imunológico para identificação de bactérias endofíticas do milho

José Edson Fontes Figueiredo¹, Vinício Tadeu da Silva Coelho²; Eduardo Antônio Ferraz Coelho³; Jamil Silvano de Oliveira⁴; Marcelo Matos Santoro⁵; Pedro Luiz Bezerra de Almeida⁶; Henrique Cestari De Paoli⁷; Guilherme Vitor Corrêa⁸; Marta Aparecida Teixeira⁹; Ana Cláudia F. Motta¹⁰

Introdução

Marcadores moleculares estão sendo amplamente utilizados na agricultura. Entre as várias aplicações práticas, destacam-se a identificação de raças, linhagens e estirpes, eliminação de réplicas em bancos de germoplasma, identificação de genes associados com a performance da planta, entre outros. Em todos esses casos, a definição da estratégia que deverá ser adotada precisa considerar os custos para a obtenção dos marcadores. Ênfase crescente tem sido dada para identificar marcadores menos onerosos. Marcadores bioquímicos constituem um tipo especial de marcador molecular que se caracteriza pela análise do produto da

¹ Biólogo, Doutor. Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151. CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: jeff@cnpms.embrapa.br; ² Estudante de Mestrado da UFMG/Dep. de Bioquímica e Imunologia; ³ Doutor, Prof. da UFMG/Dep. de Patologia Clínica; ⁴ Biólogo. Dep. de Bioquímica e Imunologia/UFMG. ⁵ Doutor, Prof. do Dep. de Bioquímica e Imunologia/UFMG; ⁶ Estudante Bolsista Proj. UFMG-Escola; ⁷ Estudante de Mestrado da USP/Ribeirão Preto; ⁸ Bolsista Estudante do Curso Téc. em Química, Sete Lagoas; ⁹ Bolsista, Estudante do Curso Téc. em Meio Ambiente, Sete Lagoas; ¹⁰ Estudante de Graduação em Engenharia de Alimentos da UniBH

expressão gênica. Destacam-se dois tipos principais: isoenzimas e proteínas. Esses marcadores também são definidos como marcadores fenotípicos, pois podem resultar da interação genótipo/ambiente. Embora de aplicação limitada, o uso desses marcadores em algumas áreas ou em casos especiais fornece informações seguras e úteis para a identificação de indivíduos. Recentemente, as técnicas de SDS-PAGE, RAPD-PCR, ARDRA e seqüenciamento de genes ribossomais foram empregadas no Laboratório de Bioquímica Molecular de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, para identificar bactérias endofíticas isoladas do milho. Naquele estudo, foi verificada, em todos os isolados, a presença de um polipeptídeo de aproximadamente 42 kDa e cuja expressão era bastante elevada (Figura 1). O objetivo deste trabalho consistiu em aprofundar os estudos sobre o polipeptídeo de 42 kDa, visando o desenvolvimento de marcadores imunquímicos para identificar e estudar a dinâmica de colonização bactérias endofíticas em plantas de milho.

Material e Métodos

Purificação do polipeptídeo de 42 kDa por eletroeluição

Extrato protéico total bacteriano foi inicialmente fracionado em sulfato de amônia. Amostras dos produtos precipitados foram dialisadas, concentradas e resolvidas em géis SDS-PAGE 12%, para identificação da fração que continha o polipeptídeo de interesse. Em seguida, foi realizado um gel preparativo e a banda correspondente ao polipeptídeo de 42 kDa foi cortada do gel, eletroeluída e concentrada com microcon. O polipeptídeo purificado foi aplicado novamente em gel SDS-PAGE, para verificar a pureza e a integridade da preparação (Figura 2).

Purificação por FPLC

Extrato protéico total de cultura da bactéria CMS 23 foi analisada em cromatografia de interação hidrofóbica em coluna C-18 e coletado o pico 11.56 correspondente à proteína de 42 kDa (Figura 3)

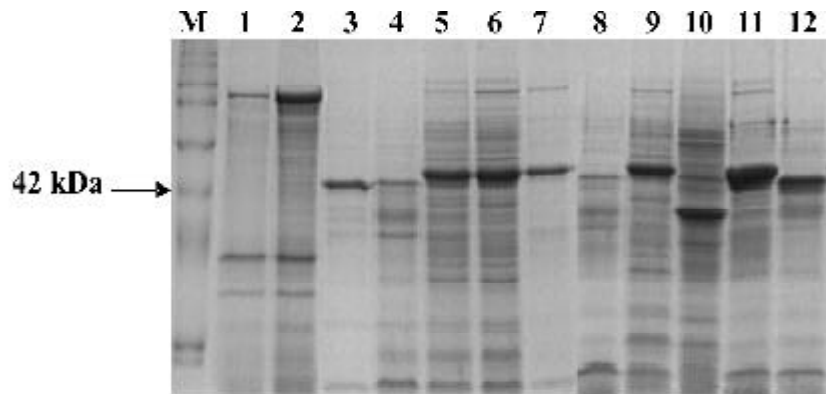


Figura 1. Perfil eletroforético de extrato protéico total de bactérias endofíticas isoladas do milho no agroecossistema Cerrado. As indicações M e 1 a 12 são, respectivamente, Marcador Rainbow e os isolados, CMS 05 a CMS 12.

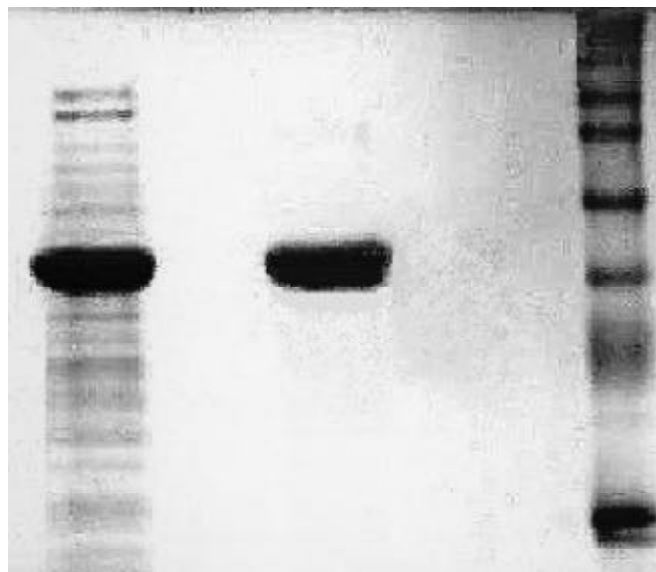


Figura 2. Perfil eletroforético da proteína purificada por eletroeluição. SDS-PAGE de extrato total (1) e da proteína de ~ 42 kDa purificada (2) do isolado CMS23. M indica marcador de peso molecular

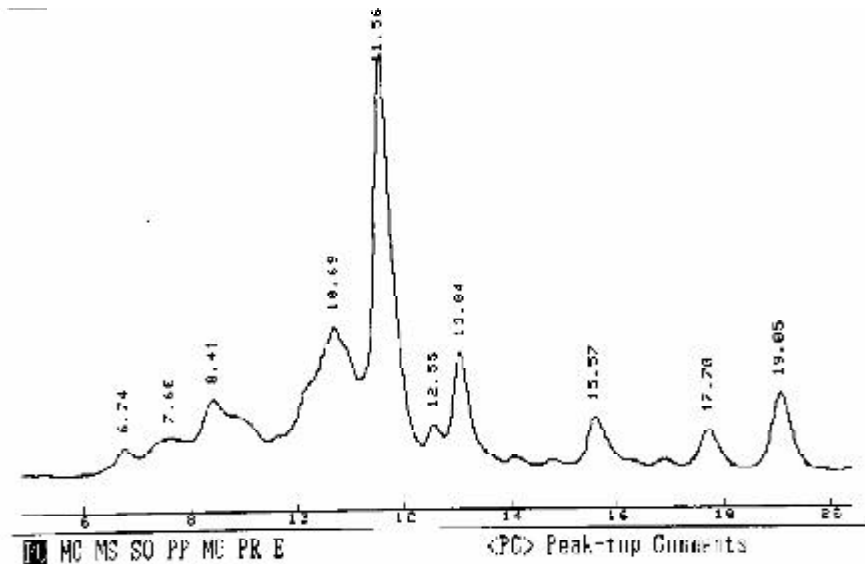


Figura 3. Perfil cromatográfico de extrato protéico total do isolado CMS 23. Extrato total de proteína do isolado CMS 23 foi aplicado em coluna C-18, interação hidrofóbica e o pico 11.56 correspondente à proteína de 42 kDa foi coletado.

Seqüenciamento amino-terminal do polipeptídeo de 42 kDa

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático de proteínas, gerando a seqüência descrita a seguir, contendo 26 resíduos de aminoácidos: GLDMASKNAQDGIS LIQTSEALNET (Figura 4).

Produção de anticorpos

Com o intuito de obter anticorpos específicos dirigidos à proteína flagelina, camundongos BALB/c fêmeas (n= 2) foram imunizados com 5 µg do polipeptídeo de ~ 42 kDa purificado, por eletroeluição e cromatografia, associado ao alumínio, como adjuvante. Os animais receberam duas doses da proteína, em intervalo de 15 dias entre elas. Quinze dias após a segunda dose, os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas,

GLDAASKVAQDGLISLIQTSEGLNET	26	[CMS 23]
.....	76	[<i>Bacillus subtilis</i>] (****)
..E.....A...D..	76	<i>Bacillus subtilis</i>
..E.....A...D..	76	[<i>Bacillus subtilis</i>] (**)
..E.....A...D..	76	<i>Bacillus subtilis</i>
...Q...E...S.....A...D..	82	<i>Bacillus halodurans</i>
..K...K...M.....M.....Q..	82	[<i>Bacillus halodurans</i>]
..Q.....A...D..	83	[<i>Clostridium thermocellum</i>]
..E.....A.....	83	[<i>Clostridium thermocellum</i>]
..NQ...R.....A.....	83	[<i>Clostridium haemolyticum</i>]
..NQ...R.....A.....	83	[<i>Clostridium botulinum</i>]
..NQ...R.....A.....	83	[<i>Clostridium novyi</i>] (***)
..Q...R.....A...S..	83	[<i>Clostridium chabaudi</i>]
..NQ...R.....A.....	83	[<i>Thermosphaerobacter tengcongensis</i>]
..Q...Q...R.....S.....A.....	83	[<i>Desulfotomaculum hafnicense</i>]
..N...T.....A.....A...T..	83	[<i>Thermotoga maritima</i>]
..EQ...R...S.....T.....	83	[<i>Clostridium septicum</i>]
..NQ...E.....S.....A.....	83	[<i>Clostridium tyrobutyricum</i>]
...V...N.....TA...A...M...	85	[<i>Vibrio cholerae</i>]
..NK...S.....VA.....	85	[<i>Robertaria occidens</i>]
..Q...T...R...N.....M...A...D..	85	[<i>Micromolitoria oceanus</i>]
..NQ...R...N.....V...VT...Q...	772	[<i>Maqretococcus</i> sp]
..QQ...T...R...N...F...T...Y...	84	[<i>Bacillus thuringiensis</i>]
...V...VR...N.....IA...A...M...	85	[<i>Vibrio parahaemolyticus</i>]
...V...VR...N.....IA...A...M...	85	[<i>Vibrio cholerae</i>]
...I...VR...N.....M...A...M...	85	[<i>Vibrio vulnificus</i>]
...V...VR...N.....IA...A...M...	85	[<i>Vibrio vulnificus</i>]
..NQ...R...K...N...V...Y...Q...	77	[<i>Yersinia enterocolitica</i>]
...V...MK...N.....A...A...M...S	85	[<i>Vibrio cholerae</i>]

Figura 4. Alinhamento de parcial de seqüência de aminoácidos da proteína flagelina. Os pontos representam aminoácidos idênticos àqueles assinalados no peptídeo seqüenciado (CMS 23) e os resíduos conservados em todas as seqüências foram destacados em azul. Os números indicam a posição da seqüência do peptídeo nas proteínas e os asteriscos correspondem ao número de isoformas para a espécie assinalada e cuja seqüência é idêntica ao peptídeo mostrado na figura.

para a obtenção de soro. Experimentos de ELISA e Western-Blot foram conduzidos para verificar a produção e a especificidade de anticorpos frente à proteína flagelina (Figuras 5 e 6).

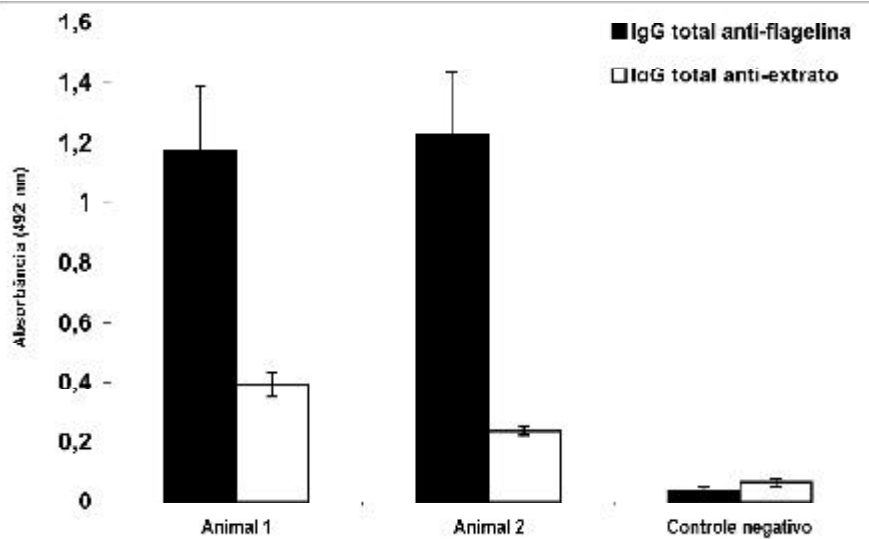


Figura 5. Teste do anticorpo policlonal anti-flagelina produzido em camundongo. As amostras de soro foram diluídas a 1:100. Foram utilizados 70 nanogramas de flagelina (canaleta 1) e 1 micrograma do extrato total de bactérias (canaleta 2). Amostras de soro dos camundongos imunizados apresentaram elevada reatividade frente à proteína flagelina e baixa reatividade frente ao extrato total de bactérias *E. coli*

Resultados e Discussão

Neste estudo, foi verificada, em todos os isolados de bactérias endofíticas do milho, a presença de um polipeptídeo de aproximadamente 42 kDa e cuja expressão era bastante elevada. O isolado CMS 23 (amostra 11 no gel de SDS-PAGE) passou a ser o objeto de estudos para desenvolvimento do marcador imunológico (Figura 1).

Ambas as técnicas de eletroeluição (Figura 2) e de cromatografia por interação hidrofóbica (Figura 3) possibilitaram obter grande quantidade da proteína de 42 kDa (pico cromatográfico de 11.56). O seqüenciamento amino-terminal confirmou o elevado grau de pureza de ambas as amostras,

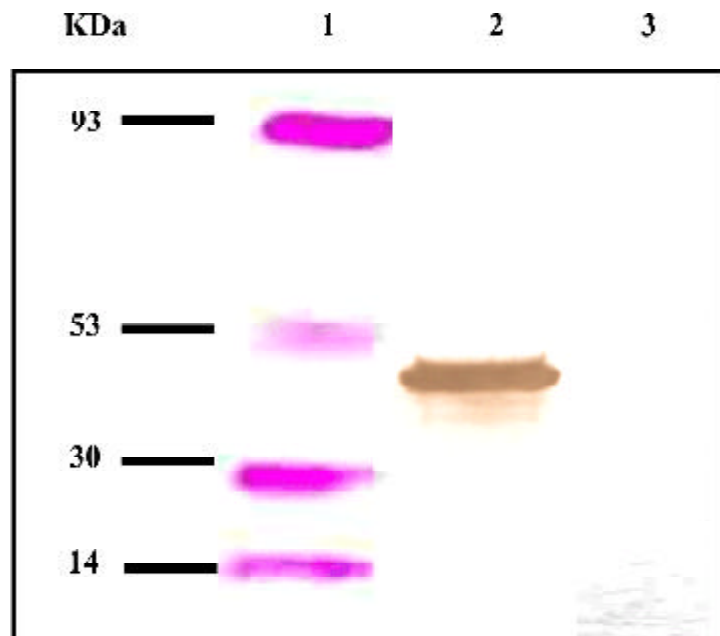


Figura 6. Western-Blot utilizando pool de amostras de soro de camundongos imunizados, em reação à proteína flagelina. Em 1, o padrão de peso molecular, com os respectivos valores indicados; em 2, extrato protéico total do isolado CMS 23 (10 mg) e, em 3, o controle negativo.

em que cada um dos 26 resíduos foi determinado com probabilidade superior a 98%.

A análise de seqüências do peptídeo (GLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNET) com proteínas depositadas no GenBank revelou alta similaridade com flagelina de *Bacillus subtilis*. O alinhamento da seqüência de aminoácidos do peptídeo seqüenciado com proteínas flagelina depositadas no GenBank revelou a presença de resíduos altamente conservados em todas as espécies analisadas, bem como a conservação desse peptídeo entre diferentes estirpes de *B. subtilis* (Figura 4).

Conclusões

A análise do perfil eletroforético do extrato total das bactérias endofíticas isoladas do milho possibilitou a identificação de polipeptídios altamente acumulados e a purificação, a partir de eletroeluição e HPLC, de um polipeptídeo com cerca de aproximadamente 42 kDa.

O polipeptídeo de ~ 42 kDa teve a sua seqüência de aminoácidos amino-terminal determinada indicando, por análises em bancos de dados (BLAST), sua elevada homologia com a proteína flagelina de *B. subtilis*.

Anticorpos específicos à flagelina foram gerados e estão sendo utilizados na identificação de *B. subtilis* em milho.

Análises das seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos codificadores da proteína flagelina possibilitaram a identificação de regiões conservadas em *B. subtilis*, mas variável em outras espécies.

No presente estudo, a análise reversa por *proteomics* possibilitou o desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação e diagnóstico de *B. subtilis* em plantas de milho.