

Otimização da extração de proteínas de grãos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para análise proteômica

Optimization of protein extraction of cowpea (Vigna unguiculata) for proteomic analysis

Tuany Camila Honaiser^{1,2*}, Gabriela Barbosa Rossi¹, Karina Gonçalves Silveira¹, Maurisrael de Moura Rocha³, Ana Carolina Maissonave Arisi¹.

RESUMO: O estudo da proteômica consiste em analisar o conjunto de proteínas de um organismo. Todas as etapas deste processo são fundamentais para a correta análise dos resultados. Destas etapas, a extração adequada de proteínas é fundamental para obtenção de bons resultados eletroforéticos, e em função da variedade de tipos e origens de amostras biológicas, o procedimento de extração necessita de otimização individual. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi a otimização da extração de proteínas de grãos de feijão-caupi. Foram realizados 03 testes, observando a influência de quantidade inicial de amostra, exclusão de lavagens com metanol e realização do protocolo em microtubos (dividindo a amostra durante a análise) ou em tubos tipo falcon. Foi verificado que o melhor resultado consistiu em, realizar o protocolo já estabelecido, alterando apenas o uso de microtubos para tubos tipo falcon. Além disso observou-se a possível necessidade de realização de um protocolo adicional de limpeza para remoção de interferentes que prejudicaram a focalização isoelétrica em duas amostras. Com as imagens dos géis, concluiu-se que foram obtidos extratos de proteínas em quantidade e qualidade suficiente para análise bidimensional das cultivares BRS Aracê e BRS Itaim.

Palavras-chave: Feijão-de-corda. SDS-PAGE. Proteoma. 2-DE.

ABSTRACT: *The proteomics study consists of analyzing the set proteins of an organism. All steps in this process are fundamental to the correct analysis of results. These steps, adequate extraction of proteins is fundamental to obtain great electrophoretic results and depending on the variety of types and origins of biological samples, the extraction procedure requires individual optimization. Therefore, the aim of this work was the optimization of protein extraction of cowpea beans. Three tests were carried out, observing the influence of initial sample amount, exclusion of washes with methanol and protocol execution in microtubes (sharing samples during the analysis) or falcon tubes. It was checked that the best result consisted in accomplishing the already established protocol, changing only the use of microtubes for falcon tubes. In addition, it was observed the possible need to carry out an additional cleaning protocol for the removal of interferents that impaired the isoelectric focusing in two samples. The gel images showing that protein extracts were obtained in quantity and quality enough for two-dimensional analysis of the cultivars BRS Aracê and BRS Itaim.*

Key words: *Black-eyed pea. SDS-PAGE. Proteome. 2-DE.*

¹ Departamento de Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil.

² Instituto Federal de Santa Catarina - Câmpus São Miguel do Oeste, São Miguel do Oeste-SC, Brasil.

³ EMBRAPA Meio-Norte, Teresina-PI, Brasil.

* tuany.honaser@ifsc.edu.br. Rodovia Admar Gonzaga, 1346/ bloco A, Itacorubi, Florianópolis-SC.

INTRODUÇÃO

A análise proteômica tem por objetivo estudar o conjunto de proteínas de um organismo e permite uma visão abrangente de sua estrutura, função e regulação nos sistemas biológicos (ABREU et al., 2014). A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma das principais técnicas, juntamente com espectrometria de massas (MS) aplicadas ao estudo e identificação destas proteínas (GORG, WEISS E DANN, 2004). Um fluxo de trabalho proteômico característico consiste em (1) extração de proteínas, (2) separação e quantificação de proteínas ou peptídeos, (3) identificação das proteínas e por fim (4) análise e interpretação de dados (CARPENTIER et al., 2008).

A fim de aproveitar a alta resolução da eletroforese bidimensional, a etapa de extração de proteínas é primordial pois, durante esta etapa, as proteínas devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas de modo a interromper completamente as interações moleculares e assegurar que cada ponto representa um polipeptídeo individual (GORG, WEISS E DANN, 2004). Além disso, é necessário garantir que possíveis interferentes, como sais, lipídios, ácidos nucleicos, enzimas proteolíticas entre outros não interfiram nas etapas posteriores (GORG, WEISS E DANN, 2004).

Tendo em vista a relevância desta etapa inicial e a grande variedade de tecidos vegetais, o estabelecimento de um protocolo de extração se torna um trabalho necessário e importante. Além disso, o feijão-caupi constitui-se de excelente fonte de proteínas principalmente nas regiões Nordeste e Norte do Brasil (NEVES et al., 2011). O aumento da utilização da espécie aliado ao potencial produtivo, tem gerado aumento nas pesquisas (BEZERRA et al., 2008). Nesse sentido a análise proteômica pode incrementar o conhecimento e consequentemente a qualidade dos grãos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo ajustar um protocolo de extração de proteínas já existente para outras matrizes, de modo a torna-lo eficaz para a realização de análise proteômica em quatro cultivares de grão de feijão-caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia molecular da Universidade Federal de Santa Catarina. Os grãos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) das cultivares BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique foram fornecidos pela Embrapa Meio-Norte. Aproximadamente 5 gramas de cada cultivar foram moídos em moinho analítico (IKA, Staufen, Alemanha) com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em -80°C até o momento da extração. A otimização do protocolo de extração proteica foi desenvolvida em 03 testes subsequentes, descritos a seguir.

Teste 1

O primeiro teste de extração de proteína das 04 cultivares de feijão-caupi foi realizado tal e qual a metodologia de extração proteica para feijão comum estabelecida por Rossi et al. (2017). O teor de proteínas totais solúveis foi mensurado através de 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Teste 2

Com base nos resultados obtidos com o teste 1, foram realizadas algumas modificações no protocolo acima descrito, de modo a verificar a melhor condição para extração de proteína. A cultivar escolhida para o teste foi BRS Xiquexique por apresentar o menor teor de proteína no teste anterior. Todo o procedimento foi realizado em tubos tipo falcon com capacidade para 15 mL, evitando a divisão das amostras durante o protocolo. Também foi avaliado a influência do peso inicial da amostra, além de 300 mg, uma segunda amostra de 500 mg foi utilizada neste

teste. E por fim na terceira variável estudada, optou-se por excluir as etapas de lavagens com metanol, observando se isso reduziria a perda de proteínas no processo. A maneira como as amostras foram identificadas pode ser verificado na tabela 1:

Tabela 1 – Identificação das amostras do teste 2.

BRS Xiquexique		
Identificação	Massa (mg)	Etapas
300 CM	300	Com metanol
300 SM	300	Sem metanol
500 CM	500	Com metanol
500 SM	500	Sem metanol

Todo o restante do procedimento ocorreu conforme descrito no teste 1.

Teste 3

A melhor condição verificada no teste 2, foi aplicada as demais cultivares. Sendo assim, o teste 3 consistiu em pesar 300 mg de amostra previamente moída das cultivares BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú. Todo o procedimento descrito no teste 1 foi repetido utilizando tubos tipo falcon de 15 mL.

Eletróforese bidimensional (2-DE)

Conforme metodologia descrita por Rossi et al. (2017), para a focalização isoeétrica (IEF) foram utilizados tiras de 13 cm com gradiente linear de pH 4-7 (*Drystrip Immobiline*, GE Healthcare). Cada tira foi reidratada com 250 µg de proteína total solúvel diluída em 250 µL de tampão de reidratação, durante 16h e 30min. Após a reidratação, as tiras foram submetidas a IEF no equipamento IPGphor III (GE Healthcare®), até um total de 24 926 Vh, a um limite de 50 mA por tira, por 7h e 39min onde somente as cultivares BRS Aracê e BRS Itaim finalizaram a IEF. Ao final da primeira dimensão, as tiras foram mantidas a -80 ° C. Para a segunda dimensão, as proteínas nas tiras IPG foram incubadas em 5 mL de tampão de equilíbrio com DTT por 15 min seguido por alquilação com 2,5% (m/v) de iodoacetamida nas mesmas condições. As tiras foram então colocadas no topo do gel de 12% SDS-PAGE juntamente com marcadores moleculares Precision PlusProtein (Bio-Rad, Hercules, CA) (10 - 250 kDa). A segunda dimensão ocorreu em um sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare) ea corrente elétrica aplicada foi de 15 mA por gel por 30 min e 30 mA por gel até o final da corrida (6h). Os géis foram corados com 0,1% (m/v) de Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad) de acordo com Ferrari et al. (2014).

Para a visualização do resultado da extração, os géis obtidos foram digitalizados (Image Scanner System II e LabScan 5.0) e as imagens analisadas através do *software* ImageMaster 2D Platinum 7.0 (todos da GE Healthcare), com os seguintes parâmetros para detecção dos spots: *smooth* ≥ 4, área ≥ 11 e saliência ≥ 100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização de protocolo de extração de proteína

Os resultados do teste 1 podem ser observados na tabela 2:

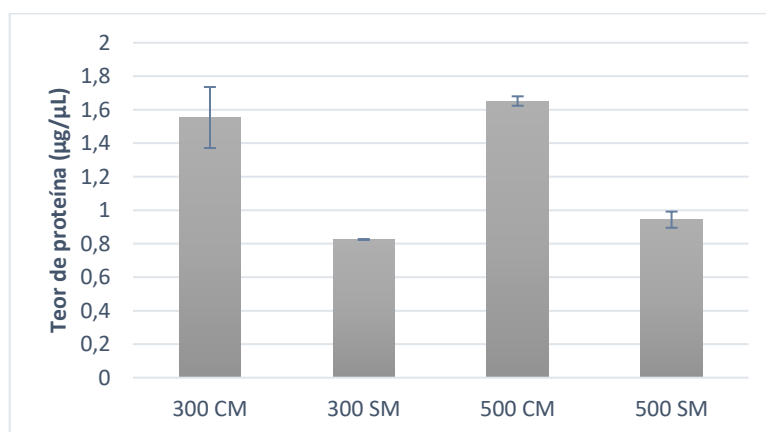
Tabela 2 – Teor de proteínas totais solúveis em grãos de feijão-caupi no teste 1.

Amostra	BRS Aracê	BRS Itaim	BRS Pajeú	BRS Xiquexique
Quant (ug.uL ⁻¹)	0,27	0,66	0,58	0,21

De acordo com a metodologia utilizada, é necessário um mínimo de 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de proteína para a realização da eletroforese bidimensional. Sendo assim os resultados encontrados no primeiro teste apresentaram-se muito abaixo do necessário e algumas hipóteses foram formuladas para possível aumento da extração de proteínas.

Como já citado anteriormente, para o segundo teste, a cultivar BRS Xiquexique foi selecionada por apresentar o menor teor de proteínas. e os seguintes parâmetros foram avaliados: o peso inicial da amostra, a exclusão ou não da etapa de lavagem com metanol e ainda se a divisão das amostras em dois microtubos antes das lavagens com metanol e acetona ou o uso de tubo tipo falcon influenciaria na extração das proteínas. O resultado pode ser observado na figura 1:

Figura 1 – Teor de proteínas totais solúveis nos grãos da cultivar BRS Xiquexique, no teste 2.



300 CM: 300 mg de amostra, com a etapa de lavagem com metanol; 300 SM: 300 mg de amostra, sem a etapa de lavagem com metanol; 500 CM: 500 mg de amostra, com a etapa de lavagem com metanol; 500 SM: 500 mg de amostra, sem a etapa de lavagem com metanol.

De acordo com a figura 1, é possível verificar que a exclusão da etapa de lavagem com metanol não proporciona vantagem no teor de proteína extraída, haja visto que assim como a acetona e outros solventes orgânicos, o metanol atua como agente precipitante de peptídeos hidrofóbicos bem como auxilia na remoção de agentes interferente como sais, lipídios, ácidos nucleicos entre outros (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2013).

Além disso, observa-se que a quantidade de amostra inicial, como já era de se esperar não altera o resultado obtido, tendo em vista que o resultado final se dá em $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, independente da massa inicial.

A hipótese que apresentou diferença entre o teste 1 e o 2 é a de que a divisão das amostras em dois microtubos antes das lavagens com metanol e acetona gera maior perda de proteína, pois durante as lavagens descarta-se o sobrenadante que pode ocasionar a lixiviação

de proteínas. Ao dividir as amostras duplica-se o número de lavagens, ocasionando maiores perdas. Ao realizar o protocolo com tubos tipo falcon não é necessário dividir as amostras para adição de 04 volumes dos agentes precipitantes TCA/Acetona, nem nas etapas subsequentes, de lavagens com metanol e acetona. Comparando o teor de proteína extraído da cultivar BRS Xiquexique no teste 1 (0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) com o resultado do teste 2 nas mesmas condições (1,55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), apenas com a alteração do tamanho do tubo, verifica-se que esta modificação já foi o suficiente para otimizar o processo de extração.

Ao estabelecer a melhor condição do teste 2, este foi repetido para as demais cultivares, e os resultados podem ser observados na tabela 3:

Tabela 3 – Teor de proteína em grãos de feijão-caupi.

Amostra	BRS Aracê	BRS Itaim	BRS Pajeú	BRS Xiquexique
Quant ($\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$)	3,74	3,24	1,96	1,55

Ao comparar as concentrações de proteínas obtidas no teste 3 com os resultados obtidos no teste 1, é possível notar que a otimização no processo de extração proteica ocorreu, haja visto que todas as cultivares apresentaram acréscimo no teor de proteína extraído.

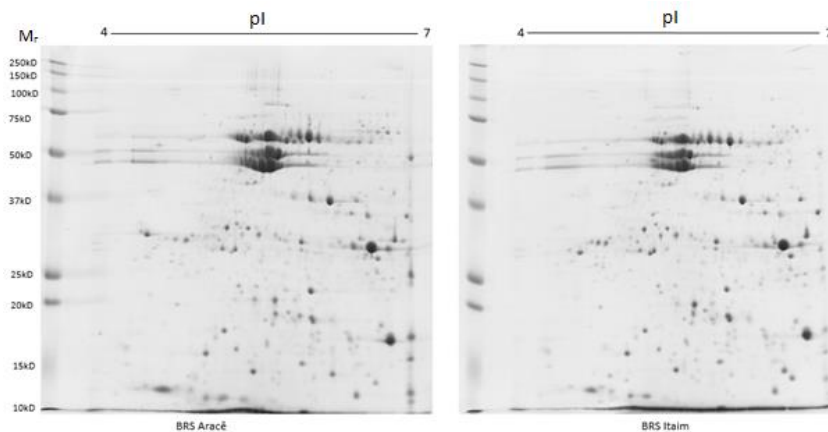
Eletroforese bidimensional (2-DE)

Na primeira dimensão, apenas as amostras BRS Aracê e BRS Itaim migraram até o final da corrida de 7 h e 39 min, possivelmente por conter menos interferentes, como sais. De acordo com Rabilloud e Lelong (2011) quando amostras com diferentes concentrações de sais são dispostas em uma mesma corrida, as amostras mais concentradas podem superaquecer em decorrência do efeito Joule, resultando em uma migração distorcida das demais. Além disso a focalização das proteínas só ocorre quando todos os íons tenham se movido para as extremidades das tiras, ou seja, quanto mais sal, mais lenta é a migração.

Algumas técnicas podem ser aplicadas de modo a solucionar este impasse, como uso de kits que promovam a precipitação/ressuspensão destes interferentes, remoção através de diálise, filtração por gel, entre outros.

Sendo assim, a segunda dimensão foi realizada apenas nas amostras BRS Aracê e BRS Itaim e o resultado dos géis pode ser observado na figura 2:

Figura 2 – Géis resultantes de eletroforese bidimensional das cultivares BRS Aracê e BRS Itaim.



Observando a figura 2 verifica-se que foram obtidos extratos de proteínas em quantidade e qualidade suficiente para análise bidimensional. Com o auxílio do *software* ImageMaster 2D Platinum 7.0, foi possível contabilizar 566 spots para BRS Aracê e 532 spots para BRS Itaim.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as modificações realizadas no protocolo de Rossi et al. (2017), demonstram que a etapa de lavagens com metanol é essencial para a otimização da extração proteica, e que todo o protocolo deve ser executado sem a divisão da amostra em dois recipientes. Além disso, com o resultado da focalização isoeletrica, verificou-se a possível necessidade de metodologias adicionais para remoção de interferentes das amostras BRS Pajeú e BRS Xiquexique.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. E. B. et al. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant cell reports**, v. 33, n. 8, p. 1289-1306, 2014.
- BEZERRA, A. A. de C. et al. Morfologia e produção de grãos em linhagens modernas de feijão-caupi submetidas a diferentes densidades populacionais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 85-93, 2008.
- CARPENTIER, S. C. et al. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 4, p. 354-377, 2008.
- FERRARI, C. S. et al. Expressed proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in maize (DKB240) roots-bacteria interaction revealed using proteomics. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2267-2277, 2014.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.
- MARTÍNEZ-MAQUEDA, D. et al. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In: Toldrá, F.; Nollet, L.M.L. (eds.), **Proteomics in Foods: Principles and Applications**, Springer Science & Business Media, 2012.
- NEVES, A. C. et al. **Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar** (Circular Técnica, 51). Teresina- PI: Embrapa Meio norte, 2011.
- ROSSI, G. B. et al. Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7588-7597, 2017.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.