

EXTRAÇÃO E ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FOLHAS DE ALGODÃO

Carlíane Rebeca Coelho da Silva¹, Jéssica Damasceno Rodrigues², Roberto Victor Alves Menezes de Barros², Péricles de Albuquerque Melo Filho³, Liziane Maria de Lima⁴, Roseane Cavalcanti dos Santos⁴

Introdução

Estudos relacionados à proteômica vêm aumentando consideravelmente pelo fato de contribuir para o conhecimento sobre a expressão gênica e seus produtos protéicos.

Em estudos de proteômica, uma boa preparação da amostra, ou seja, a extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo, é o mais importante passo para a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas [1]. Sendo assim, a primeira etapa a ser realizada em estudos de proteômica, consiste na padronização do processo de extração protéica para o tipo de tecido estudado, com o objetivo de se ter um bom rendimento em termos quantitativos, além de uma maior variabilidade de bandas, de forma a maximizar o número de proteínas presentes na amostra a ser avaliada.

Neste contexto, considerando-se a necessidade de amostras protéicas adequadas para estudos de proteômica na cultura do algodão, o presente trabalho teve como objetivo testar diferentes protocolos para a extração de proteínas totais de folhas desta cultura e avaliar os extratos obtidos através de análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Material e métodos

A. Material vegetal

Sementes da cultivar de algodão BRS 293 foram cultivadas em vasos plásticos (20L), contendo solo de textura franco-arenosa previamente corrigido e adubado de acordo com a necessidade da cultura, em telado de vegetação no primeiro semestre de 2011, em Recife, PE.

B. Extração de proteínas totais e quantificação

Foram utilizados 500 mg de tecido de foliar que foram triturados em nitrogênio líquido com a adição de 1 ml de diferentes tampões: 1- tampão salino I, 2- tampão salino II, 3- tampão fosfato de sódio, 4- tampão glicose, 5- tampão tampão glicerol e 6- tampão uréia. A concentração dos extratos protéicos no sobrenadante foi determinada utilizando-se o método de Bradford [2] e quantificadas via espectrofotômetro BioMate (Thermo Science).

C. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sds-page)

Após a extração de proteína, foi adicionado ao extrato protéico o tampão de amostra 4X [Tris base 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; β-mercaptoetanol; glicerol; azul de bromofenol; água destilada]. O material foi aplicado em gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%. Após a corrida o gel foi corado com uma solução de Coomassie Brilliant Blue de acordo com o protocolo descritos na literatura [3].

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 constam os dados de quantificação dos extratos protéicos totais de folhas de plantas algodão obtidos utilizando-se seis diferentes tampões de extração descritos na literatura.

A comparação dos métodos de extração revelou valores de rendimento bastante distintos. De acordo com os resultados obtidos, o tampão glicose é o que proporciona maior rendimento na extração de proteínas totais, quando comparados com os demais tampões. Nos extratos de folhas obtidos com esse tampão foi observado valor de 400, enquanto que o tampão salino II apresentou o menor rendimento sendo de 93 µg/mL.

Desta forma, podemos concluir que em termos quantitativos o tampão glicose é mais eficiente para a extração de proteína total de algodão.

As análises em SDS-PAGE (Figura 1) mostraram que os extratos protéicos de folhas obtidos com os diferentes tampões apresentaram perfis protéicos diferenciados. Comparando-se os padrões das bandas, pode-se observar que a amostra obtida com o tampão glicose apresentou um maior número de bandas. Sendo o mais sugestivo para posterior análise de *western blot*.

Levando-se em consideração os dados das análises quantitativas e qualitativas obtidos neste trabalho, pode-se concluir que para a extração de proteínas totais de folhas de algodão, os tampões glicose e glicerol são os mais indicados, pois produziram amostras com maior rendimento e em termo qualitativo o tampão glicose foi o que apresentou um maior número de bandas quando comparado aos demais tampões.

Este trabalho contribui para identificação do tampão mais eficiente, ou seja, que permita a melhor visualização de bandas, nos estudos em proteômica que auxiliam as

1. Aluna do Programas de pós graduação Renorbio - Rede Nordeste de Biotecnologia Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranajana, 1.700 - Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, CEP 60740-000. E-mail: carliane.rebeca@gmail.com

2. Graduandos de Engenharia Agrônoma, Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

3. Professor Associado do Departamento de Agronomia Universidade Federal do Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

4. Pesquisadora da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143- Centenário, Caixa Postal 174, Campina Grande, PB, CEP 58107-720. Apoio financeiro: CAPES e CNPq.

pesquisas relacionadas à expressão gênica e outros fins moleculares.

Agradecimentos

A Capes e ao CNPq pela concessão das bolsas.

Referências

- [1] Park, K.O. 2004. Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.37, p.133-138.
- [2] BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254.
- [3] MARCELLINO, L.H.; GROSSI DE SÁ, M.F.1998. *Deteção e análise de proteína pela técnica Western Blot*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. *Manual de Transformação Genética de Plantas*, p.239-249.

Tabela 1. Dado da quantificação via espectrofotômetro dos extratos protéicos totais de folhas algodão. Amostras contendo 500 mg de tecidos foram extraídas com 1 mL de diferentes tipos de tampões.

Extrato protéico	Concentração protéica (µg/mL)
Folhas em tampão salino	100
Folhas em tampão salino II	93
Folhas em tampão fosfato	124
Folhas em tampão glicose	400
Folhas em tampão glicerol	320
Folhas em tampão uréia	175

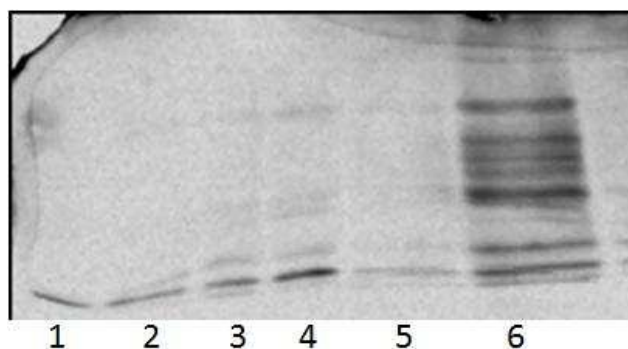


Figura 1 - Análise eletroforética de extratos protéicos de folhas de algodão em gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue. 1 – Extrato protéico obtido com tampão fosfato de sódio; 2 – Extrato protéico obtido com tampão salino; 3 – Extrato protéico obtido com tampão salino II; 4 – Extrato protéico obtido com tampão glicerol; 5 – Extrato protéico obtido com tampão uréia; 6 – Extrato protéico obtido com tampão glicose.