

Padronização metodológica para determinação de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* (Chamiso)

Methodological standardization for determination of seed storage protein of Handroanthus albus (Chamiso)

Marília Shibata¹, Cileide Maria Medeiros Coelho^{2*}, Luciana Magda de Oliveira³,
Altamir Frederico Guidolin²

Recebido em 25/06/2010; aprovado em 17/06/2011.

RESUMO

O sistema de eletroforese descontínuo contendo poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é utilizado para separar cadeias polipeptídicas para posterior análise do perfil protéico. No entanto, as metodologias para extração e separação das proteínas em sementes variam conforme a espécie vegetal e pouco se relata a respeito de proteínas de reserva em *Handroanthus albus*. Desta forma, objetivou-se padronizar um método para extração e visualização do perfil protéico de sementes de *Handroanthus albus*. Testaram-se quatro metodologias em sistema de eletroforese SDS-PAGE, onde utilizou-se desde um tampão de extração simples, contendo apenas tris HCl, até um mais complexo com fortes antioxidantes. Realizaram-se, também, modificações na concentração dos géis, no tampão de amostra e no tampão dos eletrodos visando nitidez na visualização do perfil protéico. O método que permitiu a observação do melhor perfil protéico foi o que se baseou no uso de 1 M de tris HCl pH 8,8 no tampão de extração e 20% de glicerol; 1,73 mM de SDS; 1,54 mM tris-HCl-6,8; 0,036 mM azul de bromofenol e 2% de β -mercaptoetanol no tampão de amostra. O perfil protéico observado apresentou proteínas

com peso molecular entre 63 kDa a 25,6 kDa em gel separador de 15% e o concentrador a 3%. Tal padronização metodológica serve de base para futuros trabalhos que objetivem estudar o perfil protéico associado a determinados eventos metabólicos e ou bioquímicos em semente de *H. albus*.

PALAVRAS-CHAVE: SDS-PAGE, ipê, *Tabebuia alba*

SUMMARY

The discontinuous electrophoresis system containing polyacrilamide and sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) is used to separate polypeptide chains for subsequent protein profile analysis. However, the protein extraction and separation methods vary according to the vegetal species and little is reported about storage proteins in *Handroanthus albus*. Because of this, the objective of this work was to standardize a method of extracting and visualizing the protein profile of *Handroanthus albus* seeds. Four methodologies were tested in the electrophoresis SDS-PAGE system, from a basic method, using a simple extraction buffer containing only Tris-HCl, to the most complex method with

¹ Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

² Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/ UDESC). Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil. Email: a2cmm@cav. udesc.br. *Autora para correspondência.

³ Departamento de Engenharia Florestal, CAV/UDESC, Lages, SC, Brasil.

strong antioxidants, were used. Also, various modifications were made to the gel concentration in the sample buffer and the electrode buffer, in order to obtain neatness in the visualization of the protein profile. The method which allowed the best visualization of the protein profile was the one based on the use of 1 M of tris-HCl pH 8.8 in the extraction buffer and 20% glycerol; 1.73 mM of SDS; 1.54 mM tris-HCl-6.8; 0.036 mM bromophenol blue and 2% of β -mercaptoetanol in the sample buffer. The protein profile observed showed proteins with a molecular weight between 63 kDa and 25.6 kDa in separating gel 15% and the concentrator at 3%. Such methodology standardization serves as a basis for future works which have the objective of studying the protein profile associated with certain metabolic and or biochemical events in *H. albus* seed.

KEY WORDS: SDS-PAGE, ipê, *Tabebuia alba*.

INTRODUÇÃO

A eletroforese vem sendo utilizada no estudo de proteínas e isoenzimas com relação às mudanças na qualidade fisiológica de sementes, e também nas regulações gênica, bioquímica e ontogênica, entre outros (ISTA, 1992).

Durante a eletroforese, as moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo, e moléculas com carga positiva migram para pólo negativo, em resposta a um campo elétrico. Geralmente, o sistema de eletroforese utilizado para análises protéicas é o sistema SDS-PAGE. Nesse sistema, utiliza-se gel de poliacrilamida (PAGE), que é formado por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônia (APS), tetrametiletlenodiamina (temed) e dodecil sulfato de sódio (SDS), o qual auxilia neste processo. Basicamente, a proteína é extraída em tampão com controle de pH, desnaturada por aquecimento na presença de 2-mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), que rompe as ligações dissulfeto, e os polipeptídios adquirem a carga negativa do SDS (BRAMMER, 2001), permitindo a separação das proteínas em função do seu peso molecular

(ALFENAS et al., 1998).

No caso das análises de proteínas de sementes florestais, não foge a regra, primeiramente realiza-se a extração das proteínas por meio da maceração da semente em presença de um tampão para eliminar os compostos fenólicos, seguido pela separação das proteínas em SDS-PAGE, o qual é composto por dois géis, um de maior porosidade (gel empilhador) para um menos poroso (gel separador). O diâmetro dos poros nos géis depende da concentração de acrilamida e Bis, normalmente de 3 – 6 % gel empilhador e 10 – 15% gel separador (ALFENAS, 1998; NERY, 2005).

A espécie *Handroanthus albus*, conhecida como ipê-amarelo, tem sido utilizada na arborização urbana para reposição de matas ciliares e com fins medicinais (CARVALHO, 2003). A propagação do gênero *Handroanthus* ocorre, principalmente, por sementes (CARVALHO, 1994), que apresentam variação gênica e por conseqüente variação na qualidade destas sementes logo após a colheita e durante o armazenamento.

Após a colheita, tanto durante o armazenamento, como após envelhecimento acelerado, as sementes podem apresentar alterações fisiológicas, como formação de compostos químicos e alterações nas proteínas armazenadas na semente (DELL'AQUILA e SPADA, 1994; BETTEY e FINCH-SAVAGE, 1998; DELL'AQUILA e Di TURI, 1999; KOROTAEVA et al., 2001; ALNIEMI e STOUT, 2002; GASHAW e MICHELSEN, 2002; SUN et al., 2002), o que pode favorecer o processo de envelhecimento.

No entanto, as metodologias citadas, tanto para extração como para separação das proteínas, variam conforme cada espécie vegetal (ALFENAS et al., 1991). Particularmente para o gênero *Handroanthus*, existem poucos relatos na literatura sobre a extração das proteínas e análise em gel (SDS-PAGE). Portanto, objetivou-se com este trabalho padronizar metodologia para extração e separação das proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE) para a espécie *Handroanthus albus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Genéticas da Universidade do Estado de Santa Catarina, campus de Lages, SC. Os frutos de *H. albus* foram coletados diretamente de três árvores-matriz, com auxílio de podão, no início da deiscência. A extração e o beneficiamento das sementes foram realizados manualmente, retirando-se as sementes visualmente danificadas. As sementes foram secas a temperatura ambiente por dois dias, e em seguida armazenadas em câmara seca ($\pm 8^{\circ}\text{C}$ e UR $\pm 40\%$).

O ensaio foi conduzido de quatro maneiras distintas, os quais diferiram na forma de extração das proteínas, no tampão de amostra, na composição e concentração do gel ou na composição do tanque dos eletrodos.

No primeiro método (M1) utilizou-se 100 mg de sementes moídas na presença de nitrogênio líquido, colocadas em microtubos com 1600 μL

de tampão de extração e agitados em vortex. No método 2 (M2), 125 mg de sementes foram maceradas com 2 mL de tampão de extração e 0,01 mM de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Já no método 3 (M3), 80 mg de sementes foram maceradas com 1 mL de tampão de extração. Para o método 4 (M4), 125 mg de sementes foram maceradas com 2 mL do tampão de extração (Tabela 1).

Em todos os métodos, após a maceração, as amostras foram centrifugadas por 15000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para microtubos. Utilizou-se 30 μg de proteína na proporção 1:1 com o tampão da amostra e, antes de serem aplicadas no gel, foram fervidas por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada a 70 V, por cerca de 15 horas (Tabela 2).

Para M1, os géis foram corados em solução com 50 % etanol, 10 % ácido acético, 40 % água destilada e azul brilhante-de-comassie 0,05%, durante 18 horas e descorados em solução

Tabela 1 – Composição do tampão de extração e do tampão de amostra das quatro metodologias testadas.

Método	Tampão de extração	Tampão da Amostra	Referência
1	50 mM tris-HCl - pH 7,5 500 mM NaCl 5mM MgCl ₂ 1mM PMSF	25% de glicerol 1,60 mM de SDS 0,30 mM de azul bromofenol Completar o volume para 20 mL do tampão de extração	Nery (2005)
2	0,6173 M tris-HCl pH 6,8	20% de glicerol 1,73 mM de SDS 1,54 mM de tris HCl pH 6,8 0,036 mM de azul-de-bromofenol 2% de β -mercaptoetanol	Alfenas (1998)
3	0,034 M de fosfato de sódio bibásico 0,2 M de sacarose 2,56% de PVP – 40 3 mM de DTT 5,7 mM de L-ácido ascórbico 5,8 mM DIECA (dietilditiocarbamato de sódio) 2,6 mM de bissulfito de sódio 2,5 mM de borato de sódio 0,2% β -mercaptoetanol 1% de polietilenoglicol – 6000 Completar o volume para 100 mL água destilada	Idem método 2	Alfenas (1998)
4	1 M tris-HCl pH 8,8	Idem método 2	

Tabela 2 – Composição do gel empilhador, gel separador e do tanque dos eletrodos das quatro metodologias testadas.

Método	Gel empilhador	Gel separador	Tanque dos eletrodos
1	0,12 M de tris-HCl - pH 6,8	0,63 M de tris-HCl - pH 8,8	0,052 M de tris-HCl
	6% bis acrilamida	12,5% bis acrilamida	0,053 M de glicina
	0,013 mM de APS	0,066 mM de APS	3,47 mM de SDS
	0,21% de temed	0,08% de temed	
	0,14 mM de SDS	0,14 mM de SDS	
	Completar o volume para 10,5 mL	Completar o volume para 30 mL	
2	0,06 M de tris-HCl - pH 6,8	0,38 M de tris-HCl - pH 8,9	Ídem método 1
	4% bis acrilamida	10% bis acrilamida	
	0,022 mM de APS	0,044 mM de APS	
	0,66% de temed	0,33% de temed	
	0,035 mM de SDS	0,07 mM de SDS	
	Completar o volume para 15 mL	Completar o volume para 30 mL	
3	Ídem método 2	Idem método 2	Idem método 1
4	0,125 M de tris-HCl - pH 6,8	0,45 M de tris-HCl - pH 8,8	0,192 M de glicina
	3% bis acrilamida	15% bis acrilamida	0,025 M de tris-HCl
	0,07 mM de persulfato de amônia	0,105 mM de persulfato de amônia	5 mM EDTA - pH 8,8
	0,13% de temed	0,13% de temed	8,7 mM de SDS
	0,104 mM de SDS	0,14 mM de SDS	
	2,5 mM de EDTA	2,58 mM de EDTA	
	Completar o volume para 15 mL	Completar o volume para 31 mL	

de ácido acético 10%, etanol 50% e água destilada 40% (Tabela 2).

A coloração dos géis para os métodos M2, M3 e M4 foi realizada com o uso de solução fixadora (45 % de metanol, 10% de ácido acético e 45% de água destilada) contendo 0,1% de azul-brilhante-de-comassie por 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram descorados com a mesma solução fixadora na ausência do corante.

A análise das bandas das frações protéicas foi qualitativa, e foram identificadas, visualmente, a presença ou ausência de bandas e o aumento ou diminuição na intensidade destas, nos diferentes métodos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois de realizadas as análises, observou-se que o M1 não foi eficiente na obtenção do perfil protéico (Figura 1), o que pode estar

associado ao tampão de amostra que não contém β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), visto que ambos auxiliam no rompimento das ligações dissulfídicas e evitam a oxidação das amostras (ALFENAS, 1998). Resultados semelhantes foram observados por Nery (2005) em sementes de *H. serratifolius*, sendo observada a presença de proteínas resistente ao calor apenas em sementes de soja, a qual foi utilizada como controle nesse estudo, o que reforça a hipótese de que em função da espécie pode ter ou não êxito metodológico.

O M2 foi mais eficiente que o M1, pois se observou bandas protéicas com 116 kDa, 26,3 kDa e 12,9 kDa, mas de baixa resolução, pouco nítidas, difusas e com manchas de arraste, indicando degradação protéica. Este padrão de bandeamento pode ser explicado devido a ineficiências dos componentes presentes tanto no tampão de extração como no tampão de amostras (ALFENAS, 1998). Em função da degradação

das proteínas, adicionou-se o PVPP (forte antioxidante) para realização da extração das proteínas, porém não houve diferença no perfil protéico (Figura 2), o que foi um indício de que a composição do tampão de extração deveria ser modificada.



Figura 1 - Perfil eletroforético de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em função do uso do método 1 (M1).

Por conseguinte, testou-se um tampão de extração mais complexo (M3) com a finalidade de assegurar a nitidez das bandas protéicas das amostras, com fortes antioxidantes e elevado poder tamponamento para pH 8,8. No entanto, o M3 também não foi eficiente, não sendo observada diferença em relação ao M2. Foram observadas um menor número de bandas, apenas numa faixa de aproximadamente 65 kDa (Figura 3), indicando que o uso da composição mais complexa do tampão de extração não foi eficiente na observação do perfil protéico.

Em função de todos os testes previamente realizados, levantou-se a hipótese de que o uso de tris-HCl em concentração mais elevada (1 M e o pH 8,8) no tampão de extração, associado ao uma concentração de poliacrilamida mais elevada (15%) e a presença de glicina em maior

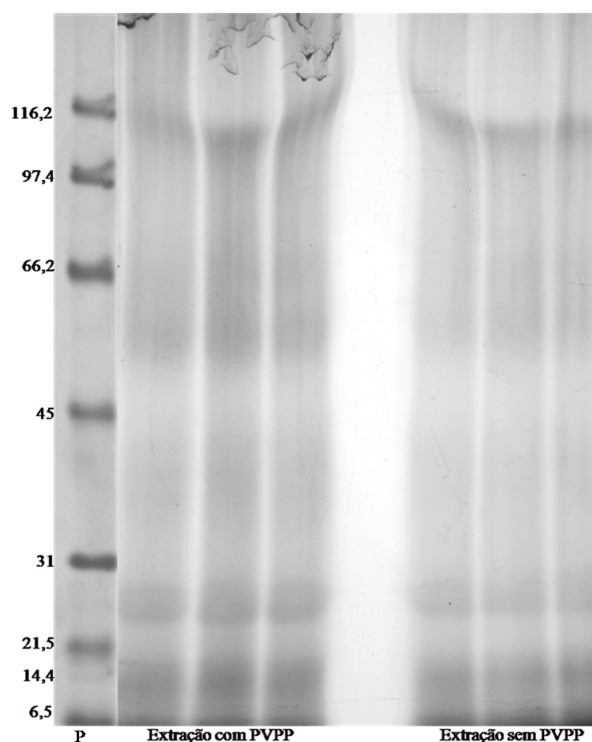


Figura 2 - Perfil eletroforético de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em função do uso do método 02 (M2).

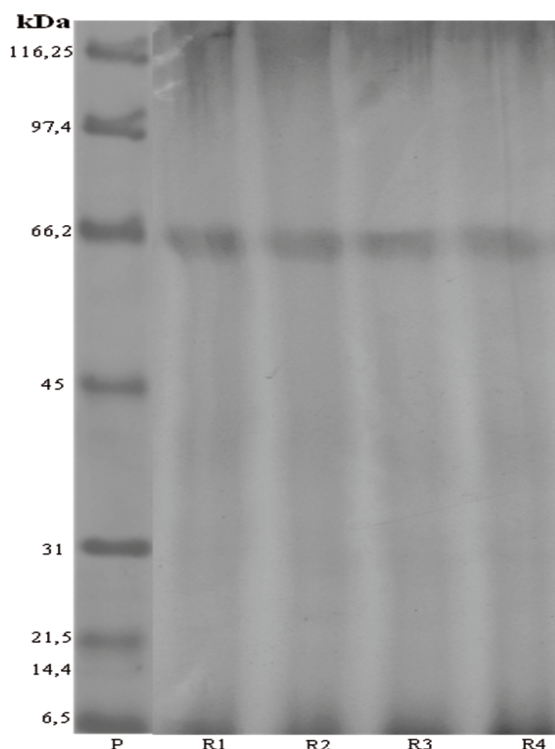


Figura 3 - Perfil eletroforético de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em função do uso do método 03 (M3). P: padrão de peso molecular (6,5 a 116,2 kDa); R1: repetição 1; R2: repetição 2; R3: repetição 3; R4: repetição 4.

concentração (1,92 M) no tampão dos eletrodos permitiria maior estabilidade no extrato protéico durante o processo de extração e na fase de corrida da amostra, visto que a resolução das proteínas dependem da concentração iônica, do pH e do tipo de íons presentes em ambas soluções (ALFENAS, 1998). Com estas alterações, obteve-se êxito na visualização das proteínas no gel (SDS-PAGE) (Figura 4). Observou-se um vasto perfil protéico, com bandas de 63 kDa, 45 kDa, 38 kDa, 36,6 kDa, 29,7 kDa e 25,6 kDa, com destaque para as proteínas 45 kDa, 38 kDa e 25,6 kDa com maior intensidade. Desta forma, o método M4 mostrou-se eficiente na visualização do perfil protéico.

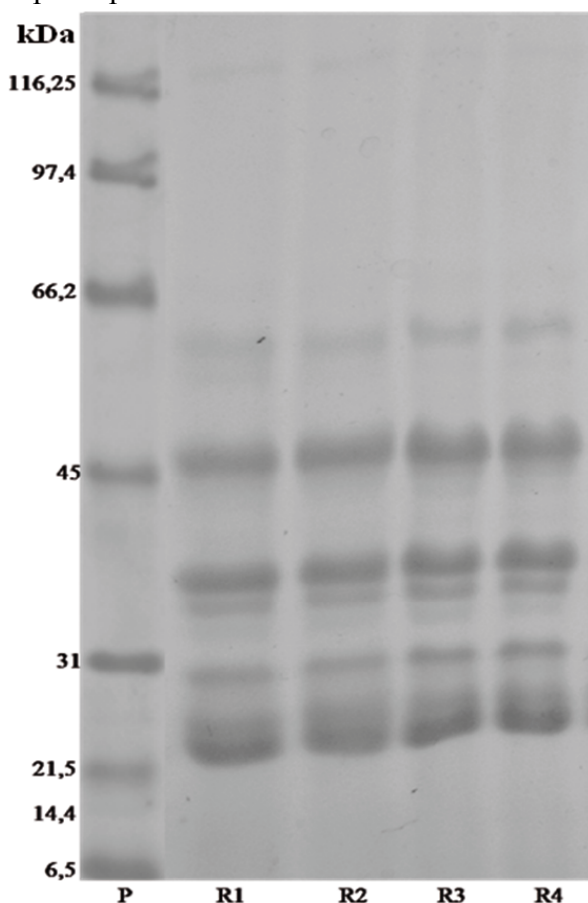


Figura 4 - Perfil eletroforético de proteínas de reserva de sementes de *Handroanthus albus* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em função do uso do método 04 (M4). P: padrão de peso molecular (6,5 a 116,2 kDa); R1: repetição 1; R2: repetição 2; R3: repetição 3; R4: repetição 4.

A caracterização do perfil protéico pode favorecer novas pesquisas no que se refere à

análise das proteínas em pós-colheita para a espécie *H. albus*. Como por exemplo, estudos do perfil protéico associado a alterações no vigor das sementes, em função de estresses biótico e abióticos, ou ainda, estudos do processo de germinação e de armazenamento desta espécie.

CONCLUSÕES

Para extração e separação de proteínas de sementes de *H. albus* a metodologia mais indicada foi a que baseou-se no uso do tampão de extração com 1 M tris HCl-8,8, no tampão de amostra 20% de glicerol; 1,73 mM SDS; 1,54 mM tris-HCl-6,8; 0,036 mM azul de bromofenol; 2% de β -mercaptoetanol, o gel separador a 15% e concentrador a 3% e tampão dos eletrodos contendo 0,025 M de tris-HCl; 0,192 M de glicina, 5 mM de EDTA e 8,7 mM de SDS.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro via PRODOC (Programa de Apoio a Projetos Institucionais), concedido ao segundo autor. E ao professor Arcelino Couto Alfenas e seu laboratorista Renildo de Oliveira, da Universidade Federal de Viçosa pelos auxílios metodológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- AL-NIEMI, T. S.; STOUT, R.G. Heat-shock protein expression in a perennial grass commonly associated with active geothermal areas in western North America. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v.27, p.547-553, 2002.
- BETTEY, M.; FINCH-SAVAGE, W.E. Stress protein content of mature Brassica seeds and their germination performance. **Seed Science**

Research, Wallingford, v.8, p.347-355, 1998.

BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas.**

Passo Fundo. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm. Acesso em: 23 maio 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

DELL'AQUILA, A.; DI TURI, M. Amplification of ageing symptoms in two differently thermal-sensitive wheat (*Triticum durum* L.) genotypes by heat shock: relationship between germination response and embryo protein patterns. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.27, p.467-476, 1999.

DELL'AQUILA, A.; SPADA, P. Effect of low and high temperatures on protein synthesis patterns of germinating wheat embryos. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v.32, p.65-73, 1994.

GASHAW, M.; MICHELSEN, A. Influence of heat shock on seed germination of plants from regularly burnt savanna woodlands and grasslands in Ethiopia. **Plant Ecology**, Dordrecht, v.159, p.83-93, 2002.

ISTA - INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of variety testing: electrophoresis testing.** Zürich, 1992.

KOROTAEVA, N. E. et al. Mitochondrial low-molecularweight heat-shock proteins and the tolerance of cereal mitochondrial to hyperthermia. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.48, p.798-803, 2001.

NERY, M. **Aspectos morfofisiológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.** 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2005.

SUN, W.; et al. Small heat shock protein and stress tolerance in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1577, p.1-9, 2002.