

Extração de proteínas de tecidos de animais pelo protocolo SDS 2%

Extraction of proteins from animal tissues by the SDS 2% protocol

Extracción de proteínas de tejidos animales por el protocolo SDS 2%

Recebido: 20/10/2020 | Revisado: 24/10/2020 | Aceito: 26/10/2020 | Publicado: 27/10/2020

Tauane Catilza Lopes Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6404-0915>

Universidade Federal do Ceará, Brasil

E-mail: tauanezootecnista@gmail.com

Shaline Séfara Lopes Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8525-404X>

Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: shaline_sefara@hotmail.com

Resumo

Em condições territoriais extensas do Brasil há muitas necessidades de recursos para realização de pesquisas. Muitas Universidades Federais e Estaduais dependem de recursos para investir em tecnologias para análise em sistemas biológicos. Inovações que permitam diminuir os custos na execução da pesquisa, torna-las práticas a nível de campo e responsivas na realização da pesquisa. Para isso foi proposto um protocolo de extração de proteínas a base de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% com o intuito de diminuir a quantidade de solventes orgânicos utilizados, sem prejudicar a viabilidade das proteínas, a viabilidade de outras técnicas de análise proteômica: SDS-PAGE e Espectrometria de massas, justamente pela diminuição do acúmulo de resíduos produzidos pela lise celular. Considerando o SDS como componente no processo SDS-PAGE, este não causa acúmulo de resíduo por solventes orgânicos externos a técnica, além de baratear os custos e de reduzir o efeito toxicológico em laboratório. Os resultados obtidos mostraram que este protocolo se mostra viável para extração de proteínas de tecidos de animais, comprovada pela técnica SDS-PAGE que permitiu a visualização nítida dos fragmentos das proteínas extraídas e ausência de rastros proteicos provenientes ao excesso de lise celular.

Palavras-chave: Protocolo; Inovação; Extração de proteína.

Abstract

Under extensive territorial conditions in Brazil there are many needs of resources to conduct research. Many Federal and State Universities rely on resources to invest in technologies for analysis in biological systems. Innovations that allow reducing the costs in the execution of the research, makes them practical at the field level and responsive in the realization of the research. For this purpose, a 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) protein extraction protocol was proposed in order to reduce the amount of solvents organic scans used, without harming the viability of proteins, the feasibility of other proteomic analysis techniques: SDS-PAGE and Mass Spectrometry, precisely due to the reduction of the accumulation of waste produced by cell lysis. Considering SDS as a component in the SDS-PAGE process, this does not cause accumulation of residue by organic solvents external to the technique, besides cheapening costs and reducing the toxicological effect in the laboratory. The results obtained showed that this protocol proves to be viable for protein extraction from animal tissues, proven by the SDS-PAGE technique that allowed a clear visualization of the fragments of the extracted proteins and the absence of protein traces from excess cell lysis.

Keywords: Protocol; Innovation; Protein extraction.

Resumen

Bajo condiciones territoriales extensivas en Brasil, hay muchas necesidades de recursos para realizar investigaciones. Muchas universidades federales y estatales dependen de recursos para invertir en tecnologías de análisis de sistemas biológicos. Innovaciones que permiten reducir los costos en la ejecución de la investigación, las hace prácticas a nivel de campo y receptivas en la realización de la investigación. Para ello, se propuso un protocolo de extracción de proteínas de dodecilo sulfato de sodio (SDS) del 2% con el fin de reducir la cantidad de disolventes orgánicos utilizados, sin dañar la viabilidad de las proteínas, la viabilidad de otras técnicas de análisis proteómico: SDS-PAGE y espectrometría de masas, precisamente por la disminución de la acumulación de residuos producida por la lisis celular. Considerando al SDS como un componente en el proceso SDS-PAGE, no provoca acumulación de residuos por disolventes orgánicos externos a la técnica, además de abaratar costes y reducir el efecto toxicológico en el laboratorio. Los resultados obtenidos mostraron que este protocolo resulta viable para la extracción de proteínas de tejidos animales, comprobado por la técnica SDS-PAGE que permitió la visualización clara de los fragmentos de proteína extraídos y la ausencia de trazas proteicas por exceso de lisis celular.

Palabras clave: Protocolo; Innovación; Extracción de proteínas.

1. Introdução

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um solvente orgânico pertencente a classe de surfactantes aniônicos (carga polarizada negativa), também denominados de tensoativos. Os surfactantes são muito utilizados em ampla escala nos diversos setores industriais (Franzetti et al., 2010; Fu et al., 2014), apresenta capacidade de alterar propriedades superficiais e interfaciais da solução. Tais substâncias exigem uma análise do seu descarte no ambiente, além de uma caracterização em níveis ecotoxicológicos (Johann et al., 2016).

Segundo Doyle (2010), a sociedade Americana de Câncer deixa claro que o SDS não apresenta relação de efeito carcinogênico aos vertebrados superiores e animais selvagens, além de apresentar baixa toxicidade para seres humanos. Em algumas situações o SDS também é utilizado nos processos de biorremediação de solos contaminados (Doong et al., 1998). Deve -se atentar que o impacto da toxicidade do SDS é dependente do tipo e concentração do composto e do organismo (Lewis, 1990).

Sabendo que o SDS tem propriedades aniônicas, este foi empregado em técnicas eletroforéticas por permitir condições ao meio a transferência de cargas elétricas. A técnica de SDS-PAGE é utilizada para separação de fragmentos biológicos (Saromán et al., 2016).

Nos protocolos de extração proteica geralmente está presente o Triton X-100, outro surfactante com ação não-iônica que permite desdobrar e manter a conformação da estrutura das proteínas. No ambiente este surfactante recebe uma degradação primária, caracterizada pela perda do éster ligado ao grupo sulfato promovendo metabólitos recalcitrantes e tóxicos (Roig et al., 1998). Apesar do comportamento biodegradante do Triton X-100, o subproduto resultante deste processo de degradação causa toxicidade potencialmente alta no ambiente aquático (Sidim, 2016).

Dessa forma considerando o menor impacto que o SDS tem no ambiente, por sua baixa toxicidade e por apresentar menor acúmulo de resíduo a técnica SDS - PAGE, foi desenvolvido o protocolo para extração de proteínas de tecidos animais, dentro do que é proposto pela metodologia de pesquisa científica (Pereira et al., 2018).

2. Metodologia

Protocolo SDS 2%

Para a realização deste protocolo de extração de proteínas de tecidos de animais por solventes orgânicos, foi realizada uma simplificação de protocolos e metodologias já estabelecidas na literatura científica para extração e purificação de proteínas (Scopes, 1982; Scopes & Smith, 2006; Sperotto, 2014).

Para testar o protocolo foi utilizado amostras do aparelho reprodutivo de *Gallus gallus domesticus*. As amostras foram submetidas ao processo de liofilização para retirada de água dos tecidos. Para a obtenção de um extrato proteico as amostras foram maceradas em solução de lise celular, com o intuito de romper a membrana celular. Para realizar este processo foi utilizado um vórtex para homogeneizar as amostras. Após 20 minutos, foram realizadas centrifugações para separar os debris celulares e proteínas eluidas na solução. As amostras processadas foram quantificadas por método quantitativo de Bradford (Bradford, 1976) e analisadas por SDS-PAGE (Gallagher, 2006).

Extração de proteínas: Solução de lise

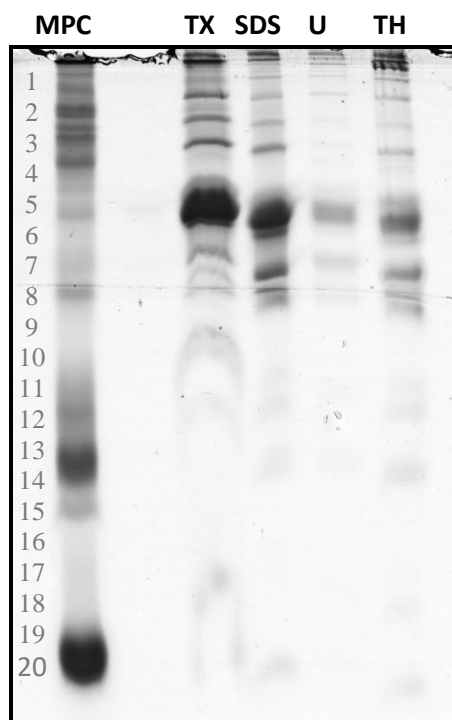
1. Dissecar 1 cm³ de amostra e pesar cerca de 100 mg; Observação: Realizar todo o procedimento com as amostras em contato com gelo para evitar degradação das proteínas.
2. Fatiar a amostra em uma placa de petri utilizando tesoura de ponta fina ou lâmina de bisturi e acondicionar as amostras em microtubos e rotulá-los devidamente;
3. Adicionar 500 µL de Tampão de lise nos microtubos com as amostras;
Para um volume de 50 ml foi utilizado: 2% de SDS que equivale a 1,0g do produto sem inibidor de protease. Observação: pesar o reagente em pó e após ressuspender estes em 40 mL de H₂O ultrapura e completar até 50 mL). Fazer no dia da extração, mantendo-o gelado.
4. Homogeneizar as amostras em homogeneizador, 5x de 1 minuto ou até a obtenção de extrato aquoso. Adicionar 650 µl de álcool etílico 100% gelado e misturar até formar uma emulsão.
5. Centrifugar a amostra a 12.000 rpm, por 1 hora a 4 °C;

- Transferir cuidadosamente o sobrenadante para novos microtubos, separar uma alíquota de 30 μ L para quantificação de proteínas. Identificar e armazenar a -20°C . Descartar o pellet.

3. Resultados

Para testar a eficácia do protocolo de extração de proteínas pelo protocolo de SDS 2%, foi realizado um teste laboratorial (Figura 1) com outros protocolos comumente utilizados para extrair proteínas de origem animal (Scopes & Smith, 2006; Sperotto, 2014). Em comparação aos demais protocolos, o protocolo de SDS 2% se mostrou eficaz, produzindo boa separação dos fragmentos proteicos e ausência de rastros de proteínas.

Figura 1. Amostra: Testículo de *Gallus gallus domesticus*. MPC – Marcador de peso molecular com amostra conhecida de plasma seminal – ovino; Tx – Extração de proteínas pelo protocolo Triton X-100 1%; SDS – Extração de proteínas pelo protocolo SDS 2%; U – Extração de proteínas pelo protocolo Uréia 8M e TH – Extração de proteínas pelo protocolo Tris -HCl. Gel de poliacrilamida 12,5% corados com comassie blue R- 250. Concentração de 30 μ L de proteína por poço amostral.



Fonte: Autores.

Se visualizarmos com atenção cada fragmento (enumerado de 1 a 20) na imagem do gel (SDS-PAGE), é possível perceber com nitidez os fragmentos nas posições de um (1) a oito (8). Os demais fragmentos apresentam distorções ou borrões, resultantes de alguma interferência físico-química durante o processo de migração eletroforética dos fragmentos das proteínas. No geral há eficiência de todos os protocolos testados, porém os protocolos que permitiram melhor visualização dos fragmentos no gel, menor interferência por distorções durante a migração dos fragmentos, e melhor separação dos fragmentos de proteína, foram os protocolos: SDS 2%, Tris -HCl, Uréia e Triton X-100 1% respectivamente.

Por se tratar de um componente que já faz parte do processo de eletroforese o uso do SDS não contribui na quantidade de resíduos adicionais a técnica, assim menor são os riscos de causar dano aos filtros de massas, quando submetidos a técnica de espectrometria de massas (MS). Substrato proteico digerido por ação enzimático com presença de componentes residuais a técnica além de causar entupimentos nos filtros de massa, favorecem a diminuição na identificação do íon carga dos peptídeos produzidos, prejudicando a leitura dos fragmentos de massas (Ewing, 1997).

4. Considerações Finais

A utilização de um novo protocolo para extração de proteínas de origem animal se fez necessário uma vez que há a necessidade constante de economizar recursos públicos, reduzir o uso de componentes tóxicos dentro do ambiente laboratorial e minimizar reduções destes poluentes no meio ambiente.

Como o intuito do protocolo SDS 2% foi propor o uso da menor quantidade de solvente orgânico, no qual pudesse permitir a lise celular sem comprometer as estruturas das proteínas e sem interferir na migração de proteínas no gel SDS-PAGE, este se provou viável.

Para reforçar o uso deste protocolo seria interessante propor e incentivar pesquisas que demonstrassem o efeito direto deste nas técnicas SDS-PAGE para gel 1D e 2D; submete-los posteriormente a técnica de Espectrometria de massas, e assim verificar como se daria o processo final de identificação e caracterização de proteína extraídas pelo protocolo SDS 2%.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Ceará, pelo apoio técnico para elaboração deste teste laboratorial e todos os envolvidos. A Coordenação de Pós Graduação em Zootecnia pelo

incentivo á realizações de pesquisas que agregassem inovação e sustentabilidade ao meio rural. Em especial a Prof^a Dr^a Elzania Sales Pereira. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999

Doong, R., Wu, Y. W., & Lei, W. G. (1998). Surfactant enhanced remediation of cadmium contaminated soils. *Water Science and Technology*, 37(8), 65-71. doi:10.1016/S0273-1223(98)00235-2

Doyle, C. (2010). *Powerful choices podcast: dispelling cancer myths*. Recuperado de <http://www.cancer.org>

Ewing, G. W. *Métodos Instrumentais de análise química* (1997). São Paulo, Brasil: Ed. Edgar Blucher Ltda.

Franzetti, A., Tamburini, E. & Banat, I. M. (2010). Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 121-134. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_9

Fu, R. H., Wang, Y .C., Liu, S. P., Shih, T. R., Lin, H. L., Chein, Y. M., Sung, J. H., Lu, C. H., Wei, J. R., Wang, Z. W., Huang, S. J., Tsai, C. H., Shyu, W. C. & Lin, S. Z. (2014). Decellularization and recellularization Technologies in tissue engineering. *Cell Transplantation*, 23(4-5), 621-630. doi:10.3727/096368914X678382

Gallagher, S. R. (2006). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 75(1), 1-38. doi:10.1002/0471142727.mb1002as75

Johann, S., Seiler, T., Tiso, T., Bluhm, K., Blank, L. M. & Hollert, H. (2016). Mechanism specific and whole – organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Science of the Total Environment*, 155-163. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.066

Lewis, M. A. (1990). Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20(2), 123-140. doi: 10.1016/0147-6513(90)90052-7

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Pereira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. Santa Maria - RS, Brasil: NTE e-book.

Roig, M. G., Pedraz, M. A., Sanchez, J. M., Huska, J. & Tóth, D. (1998). Sorption isotherms and kinetics in the primary biodegradation of anionic surfactants by immobilized bacteria: II. *Comamonas terrigena* N3H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4(5), 271-281. doi: 10.1016/S1381-1177(98)00006-X

Sanromán, M. A., Iglesias, O., Rosales, E. & Pazos, M. (2016). Electrokinetic Remediation and Hybrid Technologies for the Treatment of Organic Pollutants. In: Albergaria, J. T., Nows, H. P. A. *Soil remediation: Applications and New Technologies* (pp.1-20). New York: CRC Press

Scopes, R. K. (1982). *Protein Purification*. doi:10.1007/978-1-4757-1770-9

Scopes, R. K., & Smith, J. A. (2006). Analysis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76(1), 1-22. doi:10.1002/0471142727.mb1000s76

Sidim, T. (2016). Some physicochemical properties of octylphenol ethoxylate nonionics (Triton x-100, Triton x-114 and Triton x-405) and the temperature effect on this properties. *Trakya University Journal National Science*, 13(2), 101-116. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/en/pub/trkjnat/issue/25385/267891>

Sperotto, R. A. (2014). *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia* *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana*. Lajeado – SC, Brasil: Editora da Univates.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Tauane Catilza Lopes Fernandes – 70%

Shaline Sefara Lopes Fernandes – 30%