

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE DE PROTEOMAS

Thales Lima Rocha¹
Paulo Henrique Alves da Costa²
José Cesamildo Cruz Magalhães³
Raphael Garcia Souza Evaristo⁴
Érico Augusto Rosas de Vasconcelos⁵
Marise Ventura Coutinho⁶
Norma Santos Paes⁷
Maria Cristina Mattar da Silva⁸
Maria de Fátima Grossi-de-Sá⁹

1- PROTEOMA

O proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma. Esta característica faz com que o estudo do proteoma se torne um grande desafio, pois a expressão gênica de

uma célula é bastante dinâmica, dependendo do estado de desenvolvimento, da presença de ativadores ou inibidores e também das condições do meio ambiente. Apesar disso, a proteômica é a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque

¹ Pesquisador, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bolsista-FACUAL, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Técnico de Laboratório, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Estudante/Graduação, Biologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Bolsista DTI/CNPq, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶ Pesquisadora, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁷ Técnico de Nível Superior, MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁸ Pesquisadora, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁹ Pesquisadora, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

analisa o produto final do genoma (PANDEY e MANN, 2000).

Embora a identificação de todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo pareça uma tarefa bastante difícil de realizar, mesmo em organismos mais simples, são cada vez mais completas as informações obtidas através de estudos proteômicos (SURESH et al., 2005). Esses novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais, bem como outras informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos.

O estudo da proteômica em questão pode levar a três vertentes básicas, com implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia: (1) permite a descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (2) permite viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e (3) permite também a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento.

Atualmente, as principais técnicas usadas na proteômica são a eletroforese bidimensional (2D) e a espectrometria de massa. Este comunicado técnico tem como objetivo principal tornar mais acessíveis os procedimentos envolvidos na técnica de 2D. Para tanto, uma descrição detalhada dos protocolos é apresentada, a fim de que o usuário, independentemente de sua experiência,

possa realizar essa técnica sem maiores dificuldades.

2- ELETROFORESE

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração das moléculas carregadas, numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico. A eletroforese de proteínas foi realizada pela primeira vez em 1937 por Arne Tiselius, que idealizou um método denominado eletroforese livre, o qual consistia na decomposição do soro sanguíneo em cinco frações protéicas principais, trabalho que lhe rendeu um prêmio Nobel. Nas últimas décadas, essa técnica tem sofrido aperfeiçoamentos constantes, possibilitando análises mais precisas. O método mais utilizado hoje se denomina eletroforese zonal, que utiliza uma matriz sólida, um gel de poliacrilamida. A velocidade da migração das proteínas neste suporte depende da força do campo aplicado, da carga, do tamanho e da forma das moléculas, da força iônica, da viscosidade e temperatura do meio.

2.1- Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada. A solução de acrilamida é estável por até um mês. Quando estocada por períodos prolongados, transforma-se em ácido acrílico, que pode causar distorções no gel. É importante frisar que a acrilamida é

fotosensível e neurotóxica, devendo, portanto, ser estocada em frasco escuro e manuseada com o maior cuidado possível.

Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis forma e carga nativa das proteínas devem ser eliminadas para que a separação dependa apenas de sua massa molecular. Para isso, as proteínas são misturadas com SDS, um detergente anfipático cuja função é desnaturá-las, ou seja, convertê-las numa estrutura linear – a forma nativa é geralmente globular – e conferir-lhes densidade de carga uniforme. O SDS tem alta carga negativa e uma cauda hidrofóbica que interage com as cadeias polipeptídicas numa proporção aproximada de 1,4 g de SDS para cada grama de proteína, tornando-as negativamente carregadas. Na ausência do SDS, as proteínas com massas iguais podem migrar diferentemente na malha do gel devido ao diferencial de cargas de suas estruturas tridimensionais. Além da adição do SDS, as proteínas podem ser opcionalmente fervidas na presença de um agente redutor, como ditioneína (DTT) ou 2-mercaptoetanol, que desfazem as pontes dissulfetos, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos.

Após esse tratamento, as proteínas são aplicadas no topo de um gel de poli(acrilamida) e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que elas migrem através da malha de acrilamida em direção ao pólo positivo. Dependendo do seu tamanho, cada proteína se moverá diferentemente: as proteínas menores migrarão mais rapidamente, enquanto que as maiores terão mais dificuldade em atravessar a malha do gel e, assim, se moverão mais lentamente. Quando se representa a mobilidade eletroforética frente ao logaritmo dos pesos moleculares conhecidos de diversas cadeias polipeptídicas (proteínas marcadoras), obtém-se uma reta que pode ser

utilizada como padrão para o cálculo do peso molecular das subunidades da proteína de interesse.

2.2- Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional (2D) foi inicialmente desenvolvida por O'Farrell e Klose em 1975. A metodologia original consistia na preparação de géis cilíndricos de poli(acrilamida), em que um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrida com anfóteros específicos (também chamados de anfólitos), que apresentam alta capacidade tamponante em pHs próximos aos seus pontos isoelétricos (pIs). As proteínas eram, então, submetidas a uma focalização isoelétrica (IEF - Isoelectric Focusing) e, posteriormente, a uma eletroforese na presença de SDS, por meio de um sistema convencional descrito por Laemmli (1970). Dessa forma, as proteínas eram separadas na primeira dimensão de acordo com seus pIs (IEF) e na segunda dimensão em função de sua massa molecular (SDS-PAGE).

Apesar de engenhosa, a metodologia era muito trabalhosa, demorada, difícil de ser reproduzida em diferentes laboratórios e dependia da habilidade do pesquisador para obtenção de resultados consistentes (PANDEY e MANN, 2000). Atualmente, muitos desses problemas foram resolvidos com o desenvolvimento de novas tecnologias. Um avanço importante que contribuiu para o aumento da reprodutibilidade da eletroforese 2D foi o desenvolvimento dos géis em forma de tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG - *immobilized pH gel*) (GÖRG et al., 1985). As tiras são feitas pela copolimerização da acrilamida com o reagente Immobiline™ (Amersham Biosciences/GE Healthcare), que contém grupos tamponantes ácidos e básicos. Outro avanço importante foi o

aperfeiçoamento dos métodos de preparação de amostras protéicas, os quais consistem das seguintes etapas: (1) a extração, usando-se diferentes tampões para amostras específicas; (2) a precipitação, para concentrar as proteínas e eliminar as substâncias interferentes, e (3) a solubilização destas proteínas. No que se refere às duas últimas etapas, a precipitação das proteínas a -20°C com ácido tricloroacético (TCA) a 10% em acetona (DAMERVAL et al., 1986), seguida pela solubilização das proteínas em um meio com altas concentrações de uréia (8,0 - 9,5M) ou uma combinação de uréia 5-7M com tiouréia 2M (RABILLOUD et al., 1997), tem sido amplamente utilizada para obtenção de extratos protéicos totais, principalmente em tecidos vegetais e microorganismos. Na presença de altas concentrações de uréia, a tiouréia adquire uma eficiente ação caotrópica, aumentando, portanto, a solubilidade das proteínas de membranas. Além disso, a descoberta de novos detergentes não iônicos, tais como os surfatantes CHAPS e SB 3-10, usados juntamente com agentes redutores adequados para a IEF, como ditioneitol (DTT) e tributilfosfina (TBP) têm fortemente contribuído para a solubilização de um maior número de proteínas a serem separadas na eletroforese 2D (HERBERT, 1999). A partir daí, a eletroforese 2D passou a ser a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massa. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análises de expressão gênica por meio da comparação dos padrões protéicos. Pelo exposto acima, conclui-se que a eletroforese 2D é uma técnica quantitativa e qualitativa.

Entretanto, há um consenso de que não é possível a visualização, num

único gel, de todas as proteínas expressas num tecido complexo como o de organismos pluricelulares (HERBERT et al., 2001). Proteínas com pesos moleculares muito altos ou muito baixos não são bem separadas nas eletroforeses 2D. Proteínas altamente hidrofóbicas e alcalinas também necessitam de métodos específicos de preparação das amostras. Além disso, proteínas com um pequeno número de cópias dentro da célula, como as proteínas sinalizadoras, não são reveladas pelos métodos convencionais de coloração, tais como nitrato de prata e azul brilhante de coomassie. Com base nestas dificuldades, algumas estratégias para se indentificar um maior número de proteínas foram propostas: o pré-fracionamento das amostras por meio de extrações seqüenciais, o estudo do proteoma organelar em frações subcelulares, a utilização de tiras com faixas estreitas de pH e a sobreposição destes, além de técnicas de colorações específicas utilizando reagentes fluorescentes, radioativos ou imunoquímicos (GÖRG et al., 2000; HERBERT et al., 2001).

Embora seja conhecida desde os anos 70, a eletroforese 2D só passou a ter grande notoriedade na década de 1990, após uma revolução silenciosa da química de proteínas, com o surgimento da proteômica (WILKINS et al., 1997). O termo proteoma foi proposto apenas em 1995 por Wilkins como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma. Após a euforia provocada pelo seqüenciamento dos genomas de vários organismos, a comunidade científica percebeu que, para se compreender a função gênica em toda a sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Constatou-se que, embora importante, a análise das seqüências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade

biológica (GYGI et al., 1999). A razão disso é que o controle da expressão gênica ocorre desde a transcrição do mRNA até as modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação, acilação, hidroxilação, carboxilação, ubiquitinação, entre outras, as quais alteram a atividade protéica. Pelos motivos expostos, a análise proteômica é hoje um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes e genomas de organismos complexos.

3- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A eletroforese bidimensional consiste em cinco etapas principais:

- 1) Preparação da amostra
- 2) Primeira dimensão: focalização isoelétrica
- 3) Segunda dimensão: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
- 4) Detecção das proteínas
- 5) Digitalização e análise de imagem

3.1- Preparação da Amostra

O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra e deve ser estabelecido para cada caso em particular (HERBERT, 1999). Apesar disso, alguns passos essenciais devem ser seguidos: as proteínas devem ser parcialmente purificadas, completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas.

O processo de solubilização tem como objetivos quebrar as interações macromoleculares (incluindo todas as interações não covalentes e as pontes dissulfeto), prevenir modificações nas proteínas e mantê-las em solução durante a eletroforese da segunda dimensão. Para o rompimento de interações não covalentes, são utilizados agentes caotrópicos, como a uréia, que altera os parâmetros do

solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes. A tiouréia é um agente caotrópico mais eficiente do que a uréia, mas pouco solúvel em água. A mistura uréia-tiouréia tem sido muito utilizada, pois é mais eficiente do que a uréia sozinha (RABILLOUD et al., 1997).

O β -mercaptoetanol foi o agente redutor mais usado no princípio da técnica de 2D. Sua ação tamponante, contudo, destrói o gradiente de pH na região básica das tiras de gel (*strips*). Posteriormente, o DTT passou a ser utilizado por ser mais eficiente e apresentar melhores resultados – embora haja proteínas com muita cisteína que não são totalmente reduzidas com DTT. A tributilfosfina (TBP) é o mais potente agente redutor disponível no mercado atualmente. É volátil, tóxica e requer solvente orgânico para dissolver em água. Para romper as interações hidrofóbicas, são usados detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (com carga líquida neutra), como o Triton X-100 e, mais recentemente, o CHAPS.

Nosso laboratório vem obtendo excelentes resultados na preparação de amostras de raízes de algodoeiro, uma planta bastante recalcitrante, usando o seguinte protocolo: (1) extração com tampão Tris-HCl 40mM, pH 7,0, sacarose 250mM, Triton X-100 1%, EDTA 10mM, DTT 1mM e PMSF 1mM; (2) precipitação das proteínas a -20°C com ácido tricloroacético 10% em acetona; (3) ressolubilização em solução de uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 2% e DTT 65mM (Figura 1).

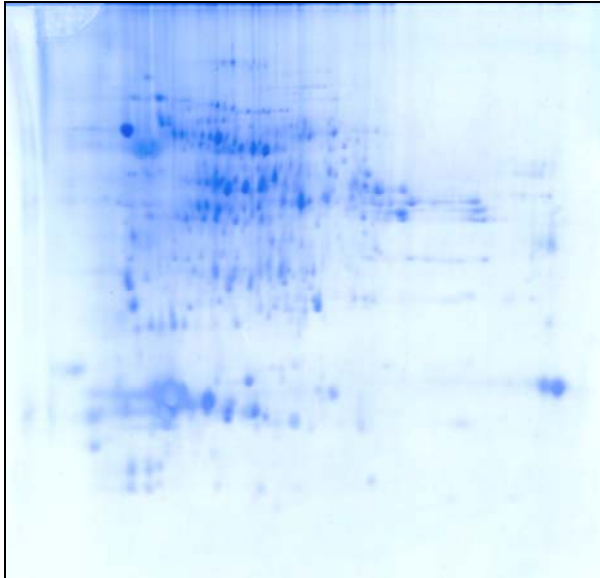


Figura 1. Eletroforese bidimensional das proteínas de raízes de algodoeiro resistente a *Meloidogyne incognita*.

3.2- Primeira Dimensão: Focalização Isoelétrica (IEF):

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Esta propriedade depende da força iônica, da natureza do tampão usado e qualquer outro soluto presente no meio, mas não depende da concentração da proteína. O ponto isoelétrico de uma proteína é determinado por uma técnica conhecida como focalização isoelétrica (eletrofocalização). Esta técnica consiste em uma separação eletroforética, na qual as proteínas são separadas de acordo com as diferenças de seus pontos isoelétricos. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (BERKELMAN e STENSTED, 1998).

3.2.1- Rehidratação das tiras de gel (*strips*):

As tiras de IPG (*immobilized pH gel*) são obtidas comercialmente na

forma desidratada com diversas faixas de pH e tamanhos e devem ser rehidratadas antes da focalização isoelétrica. As amostras podem ser misturadas à solução de rehidratação ou aplicadas sobre a tira usando o acessório denominado copo de carregamento (*sample cups*). O primeiro procedimento permite a aplicação de uma maior quantidade de proteínas (~1mg), minimiza a precipitação durante a entrada no gel, principalmente para proteínas de membrana, e evita a manipulação exigida durante a aplicação usando o segundo procedimento.

Quando o sistema Multiphor II é utilizado para a IEF, as tiras de IPG devem ser rehidratadas na bandeja de rehidratação (*DryStrip Reswelling Tray*). Nessa etapa, aplica-se a solução de rehidratação diretamente nas fendas da bandeja, e então se coloca as tiras com a superfície do gel virada para baixo. Em seguida, aplica-se 2mL de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*) em cada fenda, para evitar a cristalização da uréia. Usando-se o novo equipamento da GE Healthcare, denominado IPGphor II, é possível fazer a rehidratação e, imediatamente, a focalização isoelétrica, evitando perda de tempo e manipulações desnecessárias das tiras. O período necessário para a rehidratação das tiras é de, no mínimo, 10 horas e deve ser realizada a temperatura ambiente.

Solução de rehidratação (BERKELMAN e STENSTED, 1998):

Reagentes	Concentração final
Uréia*	8M
CHAPS	2%
Pharmalyte 3-10 ou IPG Buffer 3-10	2%
Azul de bromofenol	0,002%
Dissolver em H ₂ O milli-Q	

Estocar a -20°C em alíquotas de 0,5mL.
Obs.: o DTT (7mg para cada 2.5mL) deve ser adicionados no momento do uso.

3.2.2- Focalização Isoelétrica (IEF):

A focalização isoelétrica é feita em temperatura constante de 20°C no sistema de eletroforese Multiphor II, usando o *Immobiline DryStrip Kit* da Amersham Bioscience/GE Healthcare. A corrida é realizada com a fonte de eletroforese EPS 3501 XL, em três etapas:

Programa para o Multiphor II (tira de 18 cm; pH 3-10 linear)

Fase	Voltagem	Amperagem	Potência	Tempo
1	300V	2mA	5W	0:01h
2	3500V	2mA	5W	1:30h
3	3500V	2mA	5W	5:00h

Programa para o IPGphor II (tira de 18 cm; pH 3-10 linear)

Fase	Voltagem	Volt/horas	Tempo
Rehidratação	-	-	12h
1	500V	500	1:00h
2	1000V	1000	1:00h
3	8000V	16000	4:00h

A utilização do sistema IPGphor II para a IEF apresenta algumas vantagens: (1) bandeja de rehidratação, fonte de eletroforese e regulador de temperatura integrados em um só sistema; (2) redução do tempo de focalização; (3) menor manipulação das tiras.

Obs.: O programa para IEF varia de acordo com o tamanho da tira e a faixa de variação de pH. Após a focalização, as tiras podem ser congeladas a -80°C para posteriormente realizar a segunda dimensão.

3.3- Segunda Dimensão: Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

Como as bandas protéicas tendem a se sobreporem, os métodos unidimensionais de separação, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas em um único gel. Na primeira dimensão (IEF), as proteínas

são separadas em função das suas cargas nativas (pI). Posteriormente, a tira de gel é mergulhada em uma solução de equilíbrio contendo SDS e depois colocada no topo de um gel de poli-acrilamida – cuja espessura é geralmente de 1mm – para a realização da eletroforese de segunda dimensão, através da qual cada cadeia polipeptídica migra em função de sua massa molecular. O resultado final consiste em um gel com diversos discos (*spots*) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína particular. O poder de separação é tão grande que duas proteínas que diferem em apenas um aminoácido carregado podem ser prontamente distinguidas.

3.3.1- Reagentes e soluções estoques

- a) Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8): 29,2g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida para 100mL de solução aquosa (H₂O Milli-Q). Filtrar em papel de filtro Whatman n°1 (0,45µm) e estocar a 4°C em frasco escuro por até um mês.

- b) Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (gel de separação): 18,167g de Tris + 48mL de HCl 1M, ajustar o pH se necessário, completar com água para 100mL. Filtrar em papel de filtro Whatman n° 1 (0,45µm). Estocar a 4°C por até três meses.
- c) SDS 10% (p/v): 10g de SDS em 100mL de água. Estocar a temperatura ambiente por até seis meses.
- d) TEMED 10%: 1mL de TEMED em 10mL de H₂O milli-Q; estável a 4°C em frasco escuro.
- e) Persulfato de Amônia 10% (p/v): 0,5g para 10mL de solução aquosa. Melhor usar solução fresca.
- f) Tampão de corrida Tris 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1% (pH 8,3): Para uma solução concentrada (10X) - 30,3g de Tris, 144,13g de glicina e 10g de SDS em 1000mL de solução aquosa. Diluir 10 vezes na hora de usar. Estocar a temperatura ambiente por até um mês.

3.3.2- Preparação do gel 12,5% (SDS-PAGE):

Reagentes	Volume pipetado
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	188mL
Tampão Tris-HCl pH 8,8	113mL
H ₂ O milli-Q	117,5mL
Glicerol	22,5mL
SDS 10%	4,5mL
Persulfato de Amônio 10%	4,5mL
TEMED 10%	0,62mL

3.3.3- Equilíbrio da tira (strip):

Após a primeira dimensão (IEF) a tira deve ser equilibrada por duas vezes de 15 minutos antes de correr a

segunda dimensão (SDS-PAGE). O primeiro equilíbrio é feito com DTT a 1% e o segundo com iodoacetamida a 2,5%.

Solução de equilíbrio:

Reagentes	Concentração final
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	50mM
Uréia	6M
Glicerol (87%)	30%
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,002%
Dissolver em H ₂ O milli-Q	

Estocar a -20°C em alíquotas de 5mL.
Adicionar o DTT e a iodoacetamida apenas no momento de usar.

pode ser feita no sistema eletroforético Ettan Daltsix (Amersham Biosciences/GE Healthcare) com amperagem ou potência constante em baixa temperatura (10°C) para evitar o aquecimento. A corrida deve ser interrompida quando o azul de bromofenol atingir o final do gel.

3.3.4- Corrida SDS-PAGE:

A tira de IPG deve ser colocada no topo do gel e selada com agarose a 0,5%. A corrida da segunda dimensão

Programa:

Fase	Voltagem máxima	Amperagem máxima	Potência/gel*	Tempo
1	600V	400mA	5W	0:30h
2	600V	400mA	17W	4:00h

*Para mais de um gel multiplique a potencia pelo número de géis a serem corridos.

Solução de agarose:

Reagentes	Concentração final
Agarose	0,5%
Azul de bromofenol 1%	0,002%
Dissolver em tampão de corrida	

Aquecer a mistura até dissolver completamente a agarose. Estocar a 4°C em alíquotas de 5mL.

fluorescência ou autoradiografia, ou por métodos específicos como a coloração de glicoproteínas ou detecção com imunológicos.

3.4 - Detecção das Proteínas

Um grande passo no uso da eletroforese 2D ocorreu com o progresso nas técnicas analíticas de detecção e identificação. As proteínas separadas eletroforéticamente podem ser visualizadas por métodos gerais de coloração, tais como azul brilhante de coomassie, nitrato de prata,

Alguns fatores são importantes na escolha do método de coloração:

- Faixa dinâmica de detecção;
- Linearidade;
- Reprodutibilidade entre experimentos;
- Variabilidade inter proteína;

- e) Compatibilidade com métodos de identificação;

Após a detecção das proteínas, o procedimento subsequente consiste em identificar as macromoléculas de interesse. Nas últimas décadas grandes avanços foram obtidos na identificação das proteínas por meio do uso da espectrometria de massa. As duas principais técnicas espectrométricas para análise de moléculas biológicas grandes são: (1) a espectrometria de massa com base na dessorção e ionização das proteínas com laser, auxiliado por uma matriz (MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (ToF - *Time of Flying*); (2) e a espectrometria de massa baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI - *ElectroSpray Ionization*).

A primeira técnica analisa a massa de fragmentos peptídicos obtidos da digestão das proteínas com uma enzima proteolítica, como a tripsina. O padrão de massas obtido (*peptides mass fingerprint*) é comparado em bancos de dados para a identificação das proteínas. Apesar de rápido e prático, este método dá apenas o grau de similaridade dos padrões de massas de peptídeos entre proteínas anotadas. Portanto, fazem-se necessários métodos complementares, a exemplo do seqüenciamento completo por meios bioquímicos clássicos, tais como a degradação de Edman, para uma certificação mais acurada sobre a identidade da proteína. Por outro lado, a espectrometria ESI analisa a massa dos diversos fragmentos obtidos da colisão dos polipeptídeos contra um gás inerte como o argônio. A massa de todos os fragmentos e a massa teórica dos resíduos de aminoácidos é, então, utilizada num algoritmo computacional para determinar a seqüência dos resíduos de aminoácidos. Neste aspecto a espectrometria ESI é uma

ferramenta eficiente que pode substituir o seqüenciamento clássico.

3.5 - Digitalização e Análise de Imagem

Com a sofisticação da eletroforese 2D e o aumento da sensibilidade dos métodos de detecção e identificação das proteínas, tornou-se uma tarefa muito laboriosa e pouco confiável a análise dos géis 2D apenas por inspeção visual. Atualmente, estão disponíveis no mercado diversos *softwares* que podem oferecer aos pesquisadores um método automático, prático e estatisticamente seguro para análise comparativa dos géis 2D.

Os géis de eletroforese bidimensionais corados com azul brilhante de *comassie* ou nitrato de prata são digitalizados com o auxílio de um scanner específico, como por exemplo, o *ImageScanner™ II*, e analisados com o *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 software* da Amersham Bioscience/GE Healthcare. Este sistema permite a contagem do número de *spots*, a caracterização automática dos valores de pI e massa molecular, a análise dos níveis de expressão, assim como diversos outros recursos para o melhoramento da qualidade da imagem.

5- Referências:

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods.** Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100 p.
DAMERVAL, C.; VIENNE, D. de; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 7, p. 52-54, 1986.

- GÖRG, A. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual.** Germany: Technical University of Munich, 2003. Disponível em: <www.weihenstephan.de/blm/deg>
- GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 21, p. 1037-1053, 2000.
- GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S.; WESER, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 6, p. 599-604, 1985.
- GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature**, v. 17, p. 994-999, 1999.
- HERBERT, B. R. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 20, p. 660-663, 1999.
- HERBERT, B. R.; HARRY, J. L.; PACKER, N. H.; GOOLEY, A. A.; PENDERSEN, S. K.; WILLIAMS, K. L. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 19 (Supplement), p. 3-9, 2001.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humagenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.
- RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 18, p. 307-316, 1997.
- SURESH, S.; MOHAN, S. S.; MISHRA, G.; HANUMANTHU, G. R.; SURESH, M.; REDDY, R.; PANDEY, A. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. **Gene**, Amsterdam, v. 364, p. 13-18, 2005.
- WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. (Ed.) **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics.** Berlin: Springer-Verlag, 1997. 243 p.

<p>Comunicado Técnico, 136</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 http://www.cenargen.embrapa.br e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2005):</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p>Presidente: <i>Maria Isabel de Oliveira Penteadó</i></p> <p>Secretário-Executivo: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p> <p>Membros: Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteadó Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro</p> <p>Supervisor editorial: <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i></p> <p>Normalização Bibliográfica: <i>Maria Iara Pereira Machado</i></p> <p>Editoração eletrônica: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
---	---	--	--