

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISADORA LIESKE

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS
DE *Listeria monocytogenes* ATCC 7644**

Porto Alegre

2018

ISADORA LIESKE

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS
DE *Listeria monocytogenes* ATCC 7644**

Revista Brazilian Journal of Microbiology

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2018

RESUMO

As proteínas são fundamentais nos processos biológicos e estudos da sua composição, estrutura e função são importantes para compreendê-los. Estudos de proteoma envolvem diversas etapas e a preparação de amostras de qualidade é essencial. *Listeria monocytogenes* é uma bactéria de importância médica e sanitária, portanto análises de suas proteínas podem abordar conhecimentos acerca de seus processos fisiológicos, patogenicidade e resistência. Foram avaliados métodos de extração de proteínas totais e de superfície de *L. monocytogenes* ATCC 7644, a fim de verificar a eficiência, reprodutibilidade e perfil proteico do microrganismo sob condições ótimas de crescimento. As extrações de proteínas totais foram realizadas pelo método de extração com ultrassom e método de extração com nitrogênio líquido (N₂), para os quais se obtiveram concentrações de proteínas variando de 0,169 a 1,890 mg/mL e 0,273 a 0,778 mg/mL, respectivamente. Para as proteínas de superfície, foram realizadas três metodologias de extração que envolveram tampão Tris Ureia + EDTA, tripsina e BICAM e tripsina e Tris, gerando concentrações de proteínas de 2,609 a 2,868 mg/mL, 3,201 a 3,790 mg/mL e 3,151 a 3,359 mg/mL, respectivamente. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelando que as extrações de proteínas totais foram pouco eficientes e reprodutíveis, porém a extração com N₂ exibiu maior diversidade e quantidade de proteínas. As extrações de proteínas de superfície foram eficientes e reprodutíveis, sendo úteis para estudos do proteoma. A padronização de protocolos de extração é fundamental para obtenção de bons e eficientes resultados, sendo necessárias análises posteriores para identificação das proteínas.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, métodos, extração, proteínas

1. INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares, componentes estruturais, entre outros (Lee et al. 2007; Kessel e Ben-Tal 2018). Além disso, as proteínas são importantes marcadores biológicos de enfermidades e servem como alvos para o desenvolvimento de terapias farmacológicas. Estudos sobre a composição, estrutura e função de proteínas são fundamentais para o entendimento dos diferentes sistemas biológicos e suas interações (Pandey e Mann 2000).

O proteoma pode ser definido como o conteúdo total de proteínas de uma célula, que é caracterizado em relação a sua localização, interações, modificações pós-tradução e *turnover* (Aslam et al. 2017). Os estudos de proteoma permitem identificar e quantificar quais proteínas estão sendo expressas em determinado momento numa célula ou organismo, fornecendo informações abrangentes sobre o funcionamento de sistemas biológicos, e que envolve uma sequência de etapas como (1) extração de proteínas da amostra biológica, (2) identificação dos peptídeos por espectrometria de massas, e (3) análise dos dados usando ferramentas de bioinformática (Chandramouli & Qian 2009).

Independentemente da abordagem utilizada, a quantidade e a qualidade da amostra são partes essenciais do experimento, pois a validade de uma análise proteômica depende das proteínas presentes na amostra (Feist e Hummon 2015). Portanto, a etapa de extração de proteínas deve ser investigada com detalhamento para fornecer a melhor amostra possível. O uso de diferentes procedimentos de preparação de amostras e extração de proteínas de um mesmo microrganismo revelam resultados distintos (Gajdošík et al. 2013) e, segundo Bhaduri & Demchik (1983), para obter-se o

extrato proteico ideal é importante levar em consideração o microrganismo e a quantidade de proteínas necessária para determinado tipo de análise, sendo que as técnicas podem variar em relação à reprodutibilidade e a representação do proteoma total do organismo em estudo (Zhang e Shen 2013).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, patogênica e resistente a diversas condições ambientais, tais como baixas temperaturas, baixo pH e alta concentração salina. É capaz de se aderir e formar biofilme em superfícies abióticas, o que pode aumentar sua resistência à desidratação e à sanitizantes (Bernbom et al. 2011). É um microrganismo de importância sanitária, contaminante de produtos alimentícios que pode causar, em condições severas, infecções na corrente sanguínea e no sistema nervoso central (Gajdošik et al. 2013; Miyamoto et al. 2015). Os componentes da parede celular das bactérias Gram-positivas garantem a viabilidade das mesmas, sendo as proteínas os componentes que interagem com o ambiente e/ou hospedeiro (Cabanes et al. 2002), portanto a extração de proteínas totais e posterior caracterização por análise proteômica utilizando ferramentas de bioinformática, são meios eficazes para adquirir conhecimento mais específico e fiel do comportamento físico, fisiológico e ecológico do microrganismo (Zhang et al. 1999; Norbeck 2006). Segundo Tiong et al (2015), esses estudos podem contribuir para a identificação da base molecular da aderência de *L. monocytogenes* e outros mecanismos de patogenicidade e resistência.

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE é um método analítico, amplamente utilizado para verificar a eficiência das metodologias aplicadas à extração de proteínas e separação os componentes do extrato proteico, que envolve a desnaturação das proteínas presentes em uma amostra com o detergente dodecil sulfato

de sódio (SDS), o que confere carga negativa às proteínas, e o uso de uma corrente elétrica que as impulsiona através do gel de poliacrilamida (Al-Tubuly 2000). Embora seja um método não quantitativo, permite a comparação de perfis de proteínas obtidas de diferentes amostras e/ou por diferentes métodos de extração e, de acordo com Al-Tubuly (2000), constitui o passo inicial para análises proteicas através de técnicas como a espectrometria de massas, *western blot*, entre outras. Sendo assim, o estudo teve como objetivo extrair proteínas totais e de superfície da bactéria *L. monocytogenes* ATCC 7644 utilizando diferentes metodologias, a fim de verificar sua eficiência e reprodutibilidade, sob condições ótimas de crescimento do microrganismo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Curva de crescimento bacteriano

Previamente às extrações de proteínas da cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, foi realizada uma curva de crescimento bacteriano a fim de determinar o início da fase logarítmica. A partir de um pré-inóculo em caldo BHI (Brain Heart Infusion), mantido em incubadora orbital a 37°C, 130 rpm por 24 horas, foi retirada uma alíquota de 100 µL do cultivo bacteriano a qual foi inoculada em 100 mL de um novo caldo BHI, mantida sob as mesmas condições. Deste, foi medida a densidade óptica (OD 600 nm) em espectrofotômetro nos tempos 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h e 24h, possibilitando a determinação da curva de crescimento do referido microrganismo.

2.2. Extração de Proteínas Totais

Para cada metodologia de extração de proteínas totais, foi realizado o pré-inóculo de *L. monocytogenes* em caldo BHI, mantido em incubadora orbital a 37°C, 130 rpm por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi inoculada em novo caldo

BHI (100 mL), o qual foi mantido sob as mesmas condições descritas anteriormente. Quando completadas 6 h de incubação, amostras de 20 mL foram submetidas às metodologias de extração, conforme protocolos específicos, em triplicata.

2.2.1. Extração com ultrassom

Conforme a metodologia de Miyamoto et al. (2015), as amostras foram centrifugadas (4500 rpm) por 10 minutos a 4°C e os pellets de células lavados 5 vezes com Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Após, foram submetidas a tratamento por ultrassom, em banho de gelo, por 6 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 60 segundos entre cada ciclo.

2.2.2. Extração com nitrogênio líquido (N₂)

Seguindo o método descrito por Santi et al. (2014), com modificações, as amostras foram lavadas com PBS (tampão fosfato- salino) pH 7,4 e centrifugadas (10.000 rpm) por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi realizado por mais 2 vezes. Os pellets resultantes foram liofilizados e macerados com nitrogênio líquido (N₂). As amostras foram transferidas para microtubos, as quais foi adicionado 100 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7.5 e Halt Protease) a fim de inibir a atividade de enzimas proteolíticas. A seguir, as mesmas foram agitadas em vórtex 5 vezes durante 1 minuto, intercalados por 1 minuto em banho de gelo. Após, foram centrifugadas novamente (14.000 rpm) por 15 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos e reservados. Aos pellets restantes, foi adicionado 50 µL de tampão de extração e repetidas as agitações em vórtex, como descrito anteriormente. Ao final, as amostras foram centrifugadas e, mais uma vez, o sobrenadante foi coletado e acrescentado àquele previamente reservado. As amostras

finais foram liofilizadas, a fim de concentrar as proteínas, e solubilizadas em 300 µL de tampão PBS.

2.3. Extração de Proteínas de Superfície

Anterior à extração de proteínas, foi realizado um pré-inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em 40 mL de caldo BHI, mantido em incubadora orbital a 37°C, 130 rpm por 24 horas. Após, uma alíquota de 1 mL foi inoculada em 300 mL de um novo caldo BHI mantido sob as mesmas condições descritas anteriormente. Quando completadas 6 h de incubação, foram realizadas as extrações, em triplicata. Os protocolos foram modificados de Tiong et al. (2015). Os pellets formados a partir de 100 mL de cultura em caldo BHI, foram centrifugados (7.000 rpm) por 6 minutos a 10°C e lavados 3 vezes com tampão PBS 10 mM pH 7,4.

A fim de verificar possíveis contaminações com peptídeos citoplasmáticos devido à lise celular, foram preparadas lâminas com amostras do pellet resultante de cada metodologia de extração e os resultados foram comparados com um controle consistindo em células de *Listeria* suspensas em PBS. As amostras foram coradas pelo método de coloração de Gram e visualizadas em microscópio óptico no aumento 1000X utilizando-se óleo de imersão.

2.3.1. Extração com Tris Ureia + EDTA

Os pellets foram suspensos em 300 µL de tampão 8M Tris- Ureia contendo 5 mM de EDTA e incubados em temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos, intercalando 5 minutos de incubação com 1 minuto de agitação em vórtex. Após, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante filtrado através de filtros de 0,22 µm e congelado (-20°C).

2.3.2. Extração com tripsina e BICAM

Os pellets foram suspensos em 300 μ L de tampão 50 mM de bicarbonato de amônia (BICAM) pH 8,5 contendo 0,5 M de sacarose. Foi adicionado tripsina (2 μ g por mg de célula) às amostras, as quais foram incubadas por 45 minutos a 37°C (banho seco), intercalando 8 minutos de banho seco com 1 minuto de agitação em vórtex. Após, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 6 minutos, o sobrenadante filtrado (0,22 μ m) e congelado (-20°C).

2.3.3. Extração com tripsina e Tris

O protocolo segue os mesmos passos de extração da seção 2.3.2, exceto que o tampão BICAM foi substituído por Tris 50 mM pH 7,4.

2.4. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976), em que se realizou curvas padrão usando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 1 e 5 mg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, em triplicata, e, quando necessário, as amostras foram diluídas em tampão PBS 10 mM pH 7,4.

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a concentração de 12%, seguindo o método descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram visualizadas através da coloração por nitrato de prata (Blum et al. 1987) e Coomassie Brilliant Blue G-250.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curva de crescimento bacteriano

A fim de identificar o melhor ponto para a coleta das amostras para a extração das proteínas, foi realizada uma curva de crescimento bacteriano, a qual indicou que a fase logarítmica se inicia em 6 horas de cultivo a 37°C, como indicado pela linha tracejada em vermelho (Figura 1).

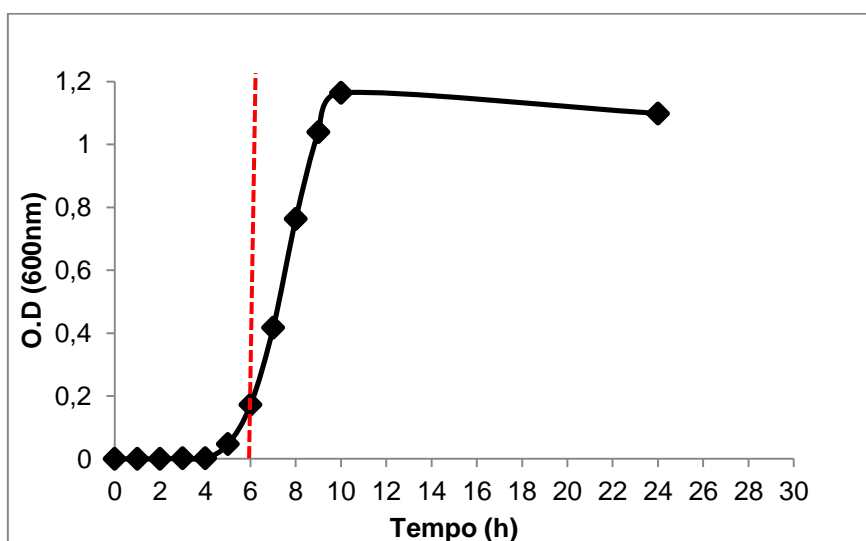


Figura 1: Curva de crescimento bacteriano para *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 37°C.

Nesta fase, ocorre o aumento do número de células bacterianas com alta atividade metabólica e espera-se obter maior quantidade de proteínas. Este mesmo padrão de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi relatado anteriormente, por Miyamoto et al. (2015).

3.2. Quantificação de proteínas e análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.2.1. Quantificação de proteínas

O alto rendimento, a preparação da amostra e a obtenção do maior número possível de proteínas são desafios na busca de técnicas eficientes para extração (Fodor et al. 2017; Mehmet et al. 2011). Para os cinco métodos analisados neste estudo, a quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976) e está apresentada abaixo na Tabela 1. No caso de *L. monocytogenes* ATCC 7644, as extrações de proteínas totais foram pouco reprodutíveis e algumas extrações geraram pequena quantidade por amostra, sendo pouco eficientes. Através da metodologia de extração com ultrassom, as concentrações variaram de 0,169 a 1,890 mg/mL entre as triplicatas; já para a metodologia de extração com N₂ líquido, as concentrações de proteínas variaram de 0,273 a 0,778 mg/mL.

Tabela 1. Valores de concentrações de proteínas obtidas nas triplicatas das extrações de proteínas totais e extrações de proteínas de superfície. Legenda: PT1- proteínas totais extraídas com ultrassom; PT2- proteínas totais extraídas com nitrogênio líquido; PS1- proteínas de superfície extraídas com Tris Ureia + EDTA; PS2- proteínas de superfície extraídas com tripsina e BICAM; PS3- proteínas de superfície extraídas com tripsina e Tris.

PROTEÍNAS TOTAIS					
Amostra	mg/mL	Amostra	mg/mL		
PT1A	1,89	PT2A	0,778		
PT1B	0,955	PT2B	0,273		
PT1C	0,169	PT2C	0,703		
PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE					
Amostra	mg/mL	Amostra	mg/mL	Amostra	mg/mL
PS1A	2,868 ± 0,084	PS2A	3,201 ± 0,218	PS3A	3,195 ± 0,028
PS1B	2,770 ± 0,015	PS2B	3,535 ± 0,019	PS3B	3,359 ± 0,088
PS1C	2,609 ± 0,099	PS2C	3,790 ± 0,199	PS3C	3,151 ± 0,059

Para as amostras de proteínas de superfície, as três metodologias foram eficientes e reprodutíveis, sendo possível obter valores de concentração próximas entre as triplicatas, que variaram de 2,609 a 2,868 mg/mL para extração com Tris Ureia +

EDTA, de 3,201 a 3,790 mg/mL para extração com tripsina e BICAM e 3,151 a 3,359 mg/mL para a extração com tripsina e Tris.

Juntamente às demais substâncias secretadas para o ambiente, a identificação de proteínas de superfície de *L. monocytogenes* são um interessante ponto de partida para entender e possivelmente evitar os eventos de contaminações persistentes no processamento de alimentos, tendo em vista que a formação dos biofilmes ocorre por uma série de sinais secretados através das proteínas ancoradas à parede celular da bactéria (Tiong et al. 2015). Além disso, está comprovado que existem diferenças na capacidade de aderência a superfícies abióticas em *L. monocytogenes* na comparação entre diferentes linhagens, observando-se que aquelas com maior capacidade de aderência, também se mostram as mais invasivas em tecidos vivos (Kushwaha & Muriana, 2010).

3.2.2. Análise do gel SDS-PAGE

A extração de proteínas pode ser difícil, inconsistente e tem sido um problema para os cientistas, porém, muitas técnicas, incluindo métodos físicos e aqueles baseados em detergentes, estão disponíveis e são usados para diversos propósitos (Malafaia et al. 2015). De acordo com Tan et al. (2011), um isolamento proteico eficiente deve ser testado a fim de determinar a eficiência para a amostra utilizada, com o objetivo de obter reprodutibilidade nos resultados.

Neste estudo, foi realizada a análise das extrações de proteínas totais e de superfície de *L. monocytogenes* ATCC 7644 pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em concentração 12%. As amostras submetidas à extração com ultrassom apresentaram padrão de bandas que se repetiram nas duas amostras

reproduzidas (Figura 2, PT1A e PT1B), as quais em sua maioria variaram para proteínas entre 30 a 5 kDa, apresentando também peptídeos menores que 5 kDa. Apesar de não terem sido reprodutíveis e eficientes, com baixa concentração de proteínas, os extratos obtidos apresentaram boa resolução no gel SDS-PAGE.

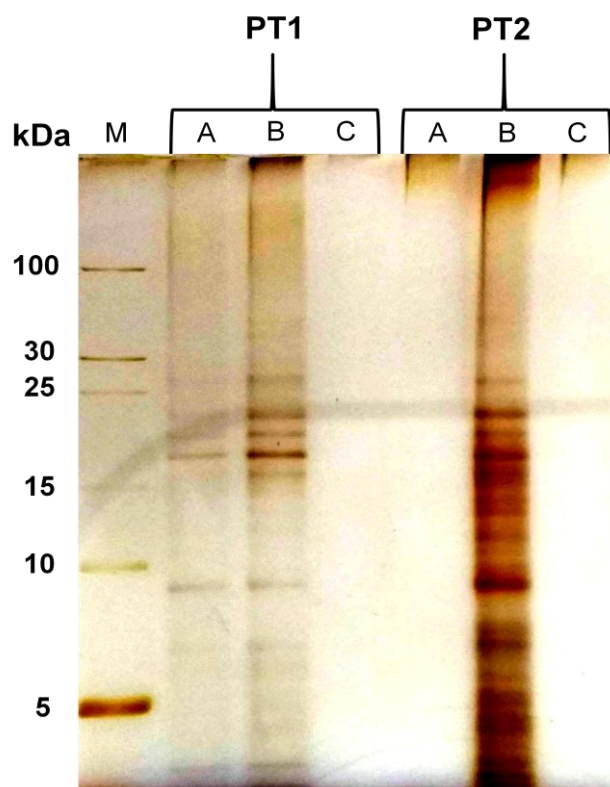


Figura 2: Análise SDS-PAGE de extração de proteínas totais. PT1- extração de proteínas totais com ultrassom, em que A- amostra PT1A, B- amostra PT1B e C- amostra PT1C; PT2- extração de proteínas totais por congelamento, em que A- amostra PT2A, B- amostra PT2B e C- amostra PT2C. M- marcador molecular PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Coloração por nitrato de prata.

Segundo Gajdošik et al. (2013, 2015), é fundamental que, além de seguir os passos de preparação da amostra e extração de proteínas, a ruptura das células seja suficiente para obter a maior quantidade possível de extrato proteico. Ainda, após testar e comparar a extração de proteínas de *L. monocytogenes*, através de ultrassom aliada à ruptura mecânica e adição de tampão de lise, os autores afirmam que, para bactérias

Gram-positivas, o uso de ultrassom pode não ser suficiente para a completa destruição celular, sendo necessária a destruição mecânica e posterior extração (Gajdošik et al. 2013). Alguns estudos utilizaram tampões de lise celular, o que auxiliou na ruptura das células, possibilitou obtenção de maior quantidade de proteínas e uma boa resolução em gel SDS-PAGE e eletroforese 2-D, quando associado ao ultrassom (Pierre-Alain, 2006; De Angelis et al. 2001). Mehmeti et al. (2011) utilizou um tampão a base de Tris HCl para resuspender o pellet de células de bactérias ácido lácticas, submeteu as amostras à tratamento com ultrassom e não obteve resolução em gel SDS-PAGE. Ainda assim, não significa que a metodologia não seja eficiente e sim que, possivelmente, não foi ideal para obter grande quantidade de amostra e concentração suficiente de proteínas para visualização em gel. Uma extração de proteínas eficiente depende da qualidade da disrupção das células (Fodor et al. 2017) e a ruptura por ultrassom possivelmente resulta em maior variabilidade de extração proteica, evidenciada nos diferentes valores obtidos na quantificação de PT1 pelo método de Bradford (Tabela 1).

Outra forma de realizar a ruptura de células e extração das proteínas é a utilização de nitrogênio líquido (N₂). Por imersão em N₂ líquido, Benov & Al-Ibraheem (2002) obtiveram um rendimento de 0,5 mg/mL de proteínas de *Escherichia coli*, enquanto Crestani et al. (2012) obteve cerca de 1,2 mg de frações de proteínas liofilizadas de *Cryptococcus gattii*, também utilizando N₂ líquido. Para proteínas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, a extração com N₂ líquido não gerou resultados reproduzíveis nas triplicatas, porém a amostra com menor concentração foi a única que obteve resolução no gel SDS-PAGE (Figura 2, PT2B). Através da extração PT2, obteve-se proteínas variando de 30 a 5 kDa e, em grande quantidade, peptídeos menores que 5 kDa. A presença e acúmulo de grande quantidade de pequenos peptídeos pode ter

sido significativo para a quantificação pelo método de Bradford, que apresenta resposta anômala para peptídeos de baixa massa molecular (Zaia et al. 1998). Novamente, utilizando a mesma bactéria e procedimento, a ruptura mecânica resulta na obtenção de moléculas de diferentes tamanhos, que não aparecem da mesma forma na análise em gel SDS-PAGE.

Comparando as duas metodologias de extração de proteínas totais, é possível perceber a similaridade de algumas bandas no gel entre as amostras. Proteínas entre 30 e 15 kDa se repetem nas amostras de PT1 e PT2, além de bandas marcando peptídeos em torno de 10 kDa e menores que 5 kDa. Porém a extração com N₂ parece ser mais eficiente quanto à obtenção de maior diversidade de proteínas, de diferentes tamanhos, e de maior quantidade, visto que as bandas têm coloração mais intensa.

De acordo com Cabanes et al. (2002), pelo menos 4,7% da capacidade de codificação do genoma de *L. monocytogenes* é dedicado à expressão de proteínas de superfície, muitas delas relacionadas à virulência da bactéria. Para a adesão ao hospedeiro, segundo Burkholder et al. (2009) há muito fatores envolvidos na aderência da bactéria às células epiteliais, principalmente a expressão de diversas proteínas. Há evidências de que a otimização de procedimentos de extração de proteínas pela alteração de tampões, agentes caotrópicos e detergentes é suficiente para alcançar, com confiança, a visualização em alta resolução de proteínas de membrana (Churchward et al. 2005).

A análise das extrações de proteínas de superfície de *L. monocytogenes* em gel SDS-PAGE revelaram grande quantidade e diversidade de proteínas, de diferentes tamanhos (Figura 3). As três metodologias realizadas para obtenção de proteínas de

superfície apresentaram tamanhos que variaram de 3,5 a 55,4 kDa e muitos peptídeos menores que 3,5 kDa. A extração com tampão Tris Ureia + EDTA apresentou bandas maiores que 55,4 kDa (Figura 3, PS1), exibindo perfil proteico com algumas diferenças em relação aos outros dois métodos testados, como maior quantidade e diversidade de proteínas.

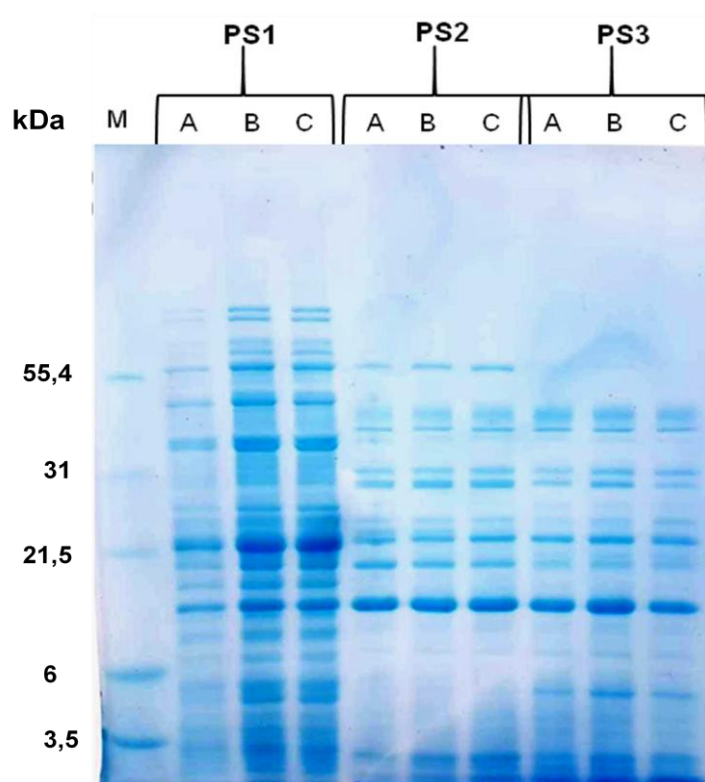


Figura 3: Análise SDS-PAGE de extração de proteínas de superfície. PS1- extração de proteínas de superfície com Tris Ureia + EDTA, em que A- amostra PS1A, B- amostra PS1B e C- amostra PS1C; PS2- extração de proteínas de superfície com tripsina e BICAM, em que A- amostra PS2A, B- amostra PS2B e C- amostra PS2C; PS3- extração de proteínas de superfície com tripsina e Tris, em que A- amostra PS3A, B- amostra PS3B e C- amostra PS3C. M- marcador molecular Mark 12™ Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250.

As proteínas de superfície bacteriana são relativamente hidrofóbicas, variáveis e instáveis, o que dificulta a execução de uma extração eficiente, solubilização, purificação e análise em gel (Esbelin et al. 2018). No entanto, a metodologia de extração com Tris Ureia + EDTA se mostrou eficiente quanto à reprodutibilidade e

eficiência na extração e, apesar de ter menores concentrações de proteínas em relação aos outros métodos (Tabela 1, PS1), apresentou bandas bem marcadas e definidas. De acordo com Cordwell (2008), a utilização de tampões contendo ureia tem a finalidade de solubilizar proteínas hidrofóbicas associadas à membrana. No entanto, Tiong et al. (2015) identificou proteínas citoplasmáticas e de superfície de *L. monocytogenes* em extração utilizando ureia, afirmando que é possível minimizar esse resultado através da precipitação das amostras por etanol e resolubilização no mesmo tampão de extração e, apesar disso, é possível que muitas dessas proteínas citoplasmáticas se comportem como “moonlight”, associadas a variadas localizações, funções ou ambas.

É provável que as amostras de PS1 contenham não apenas proteínas de superfície como também proteínas citoplasmáticas, uma vez que a ureia pode facilitar a ruptura da membrana celular (Silva e Souza, 2009). A fim de verificar a integridade das células de *L. monocytogenes* após a realização das extrações de proteínas de superfície, foram realizadas análises em lâminas do pellet resultante para cada extração, as quais são apresentadas abaixo, na Figura 4. Foi possível observar células com morfologia e coloração de Gram normais, além de aglomerados de células.

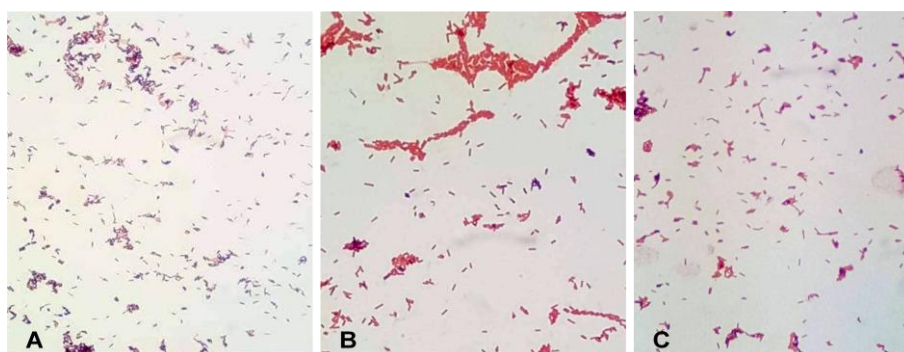


Figura 4: Análise da integridade das células de *L. monocytogenes* ATCC 7644, depois de submetidas às metodologias de extração de proteínas de superfície. A- amostra da extração com Tris Ureia + EDTA; B- amostra de extração com tripsina e BICAM; C – amostra de extração com tripsina e Tris. Aumento: 1000x.

De acordo com Romero- Saavedra (2014), a técnica de extração com tripsina permite uma rápida e seletiva identificação de proteínas de superfície, porém leva a detecção de muitas proteínas citoplasmáticas, sendo necessária posterior identificação por espectrometria de massas. As extrações realizadas nesse estudo aparentemente não ocasionaram a lise celular, sendo assim, é possível que a maior parte das proteínas visualizadas no gel SDS-PAGE sejam realmente proteínas de superfície.

Assim como em PS1, as proteínas extraídas com tripsina e BICAM (Figura 3, PS2) exibiram bandas de 55,4 kDa, as quais não aparecem na extração com tripsina e Tris (Figura 3, PS3). O bicarbonato de amônia é um bom tampão para a reação da tripsina com a ligação peptídica (Babu, 2013) e a sacarose mantém a membrana celular estável por mais tempo em concentração de 0,25M ou mais (Boone et al. 1969). As extrações em que se utilizou tripsina e BICAM ou tripsina e Tris apresentaram resultados muito semelhantes, em que é possível observar bandas bem definidas de proteínas de 31, 21,5 e 3,5 kDa . As bandas que indicam tamanhos em torno de 6 kDa aparecem apenas em PS3 e nota-se a ausência de proteínas maiores que 55,4 kDa para PS2 e PS3, as quais aparecem bem definidas em PS1.

O uso de tripsina é vantajoso, pois a enzima tem acesso às proteínas expostas na superfície da célula bacteriana, o que pode limitar a contaminação com células do citoplasma (Bohle et al. 2011) e pode ter contribuído para os altos valores obtidos na quantificação de proteínas de PS2 e PS3. Tjalsma et al. (2008) estudou proteínas de superfície de *Bacillus subtilis* utilizando tripsina livre e tripsina ligada à esferas de vidro para a extração, e verificou a presença de proteínas citoplasmáticas nas amostras resultantes das extrações com a enzima livre. No entanto, após testar a integridade das células com o marcador citoplasmático GroEL, concluiu que a presença das proteínas

citoplasmáticas é devido a instabilidade de algumas células e não ao tratamento de extração. Por outro lado, Hempel et al. (2011) atribuiu as proteínas citoplasmáticas encontradas da extração de *Staphylococcus aureus* à lise celular ocasionada pela ação da tripsina e o “corte” das proteínas de superfície, após comparação do tratamento com a enzima ao controle preparado da mesma forma, porém com adição tardia da mesma à solução de extração.

Embora as três metodologias avaliadas para extração de proteínas de superfície apresentaram diversidade de proteínas, as menores concentrações verificadas apresentaram melhor resolução em gel SDS-PAGE (Tabela 1, PS1; Figura 3, PS1). As altas concentrações obtidas nos tratamentos PS2 e PS3 podem ter ocorrido devido à presença da tripsina, visto que a enzima pode ter degradado as proteínas maiores gerando pequenos peptídeos o que, segundo Zaia et al. (1998) gera resposta falha para a quantificação de Bradford.

Portanto, baseado neste estudo, foi possível verificar que as metodologias de extração de proteínas totais não foram reprodutíveis ou eficientes para se obter quantidade e qualidade significativa e suficiente para estudo do proteoma total de *L. monocytogenes* ATCC 7644. Apesar disso, a extração com N₂ apresentou maior diversidade e quantidade de proteínas do que a metodologia de extração com ultrassom, sendo uma possibilidade gerar melhores resultados a partir do aperfeiçoamento e otimização da técnica. Os protocolos de extração de proteínas de superfície apresentaram bom rendimento e reprodutibilidade, visto que as extrações foram bastante similares entre as triplicatas. Esse resultado mostra que os três métodos de extração de proteínas de superfície podem ser utilizados para os estudos de proteoma e de componentes da superfície celular da bactéria. Ressalta-se a importância da

padronização das metodologias para a obtenção de amostras eficientes e fieis aos objetivos dos estudos aos quais se aplicam. Ainda assim, análises posteriores em espectrometria de massas serão fundamentais para identificação das proteínas extraídas e melhor compreensão da ação e eficiência dos reagentes utilizados nas extrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Tubuly A.A. (2000) SDS-PAGE and Western Blotting. In: George A.J.T., Urch C.E. (eds) Diagnostic and Therapeutic Antibodies. Methods in Molecular Medicine, vol 40. Humana Press.

Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. (2017) Proteomics: technologies and their applications. Journal of Chromatography Science (55) 2:182-196.

Bhaduri S, Demchick PH. (1983) Simple and rapid methods for disruption of bacteria for protein studies. Applied and Environmental Microbiology 46(4): 941-943

Benov L, Al-Ibraheem J. (2002) Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 35: 428-431.

Bernbom N, Vogel BF, Gram L. (2011) *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by the presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation International Journal of Food Microbiology 147 : 69- 73.

Blum H, Beier H, Gross HJ. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

Bohle LA, Riaz T, Egge-Jacobsen W, Skaugen M, Busk OL, Eijsink VGH, Mathiesen G. (2011) Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. BMC Genomics, 12:135.

Boone CW, Ford LE, Bond HE, Stuart DC, Lorenz D. (1969) Isolation of plasma membrane fragments from hela cells. The Journal of Cell Biology, v. 41.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Burkholder KM, Kim KP, Mishra KK, Medina S, Hahm BK, Kim H, Bhuina AK. (2009) Expression of LAP, a SecA2-dependent secretory protein, is induced under anaerobic environment. Microbes and Infection v. 11, 859-867.

Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L, Cossart P. (2002) Surface protein and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. TRENDS in Microbiology 10(5): 238-245.

Chandramouli K, Quian PY. (2009) Proteomics: Challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. Human Genomics and Proteomics p.1-22.

Churchward MA, Butt RH, Lang JC, Hsu KK, Coorsen JR. (2005) Enhanced detergent extraction for analysis of membrane proteomes by two-dimensional gel electrophoresis. Proteome Science 3:5.

Crestani J, Carvalho PC, Han X, Seixas A, Broetto L, Fisher JSG, Staas CC, Schrank A, Yates III JR, Vainstein MH. (2012) Proteomic profiling of the influence of iron availability on *Cryptococcus gattii*. *Journal of Proteome Research* 11: 189- 205.

Cordwell SJ (2008) Sequential extraction of proteins by chemical reagents. *In: Posch A. 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*. Humana Press, 139- 146.

De Angelis M, Bini L, Pallini V, Cocconcelli PS, Gobbetti M (2001) The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147: 1863 – 1873.

Esbelin J, Santos T, Ribiere C, Desvaux M, Viala D, Chambom C, Hebraud M (2018) Comparaison of three methods for cell surface proteome extraction os *Listeria monocytogenes* biofilm. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v. 22.

Feist P, Hummon AB. (2015) Proteomic challenges: Sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 3537- 3563.

Fodor I, Valasek A, Urbán P, Kovács M, Fekete C, Kerepesi I (2017) A comparative study on optimisation of protein extraction methods for *Saccharomonospora azurea*. *Acta Biologica Szegediensis* 61(1): 45- 50.

Gajdošik MS, Gašo- Sokač D, Pavlović H, Clifton J, Breen L, Cao L, Giacometti J, Josic D (2013) Sample preparation and further proteomic investigation of the inhibitory activity of pyridinium oximes to Gram- positive and Gram- negative food pathogens. *Food Research International* 51: 46- 52.

Gajdošik MS, Andjelković U, Gašo- Sokač D, Pavlović H, Shevchuk O, Martinović T, Clifton J, Josic D (2017) Proteomic analysis of food borne pathogens following the

mode of action of disinfectants based on pyridoxal oximes derivatives. *Food Research International* 99: 560-570.

Hempel K, Herbst FA, Moche M, Hecker M, Becher D. (2011) Quantitative proteomic view on secreted , cell-surface associated, and cytoplasmic proteins of the methicillin-resistant human pathogen *Staphylococcus aureus* under iron-limited conditions. *Journal of Proteomic Research* 10: 1657- 1666.

Kessel A, Ben-Tal N (2018) *Introduction to proteins: Structure, function and motion*. CRC Press, Boca Raton.

Kushwaha K, Muriana P (2010) Analysis of tissue invasiveness of adherent strains of *Listeria monocytogenes* by in vivo mouse assay. *Int. J. Food Microbiol.* 141 (1–2): 104–109.

K. Murugesh Babu (2013) *Silk: processing, properties and applications*. Woodhead Publishing.

Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lee D, Redfern O, Orengo C (2007) Predicting protein function from sequence and structure. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology* 8: 995-1005.

Malafaia CB, Guerra ML, Da Silva T, Paiva PMG, Souza EB, Correia MTS, Silva MV (2015) Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. *Proteome Science* 13(5).

Mehmeti I, Kiran F, Osmanagaoglu O (2011) Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *African Journal of Biotechnology* 10(11): 2178- 2185.

Miyamoto KN, Monteiro KM, da Silva Caumo K, Lorenzatto KR, Ferreira HB, Brandelli A (2015) Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin. *Journal of Proteomics* 24;119: 230-7.

Norbeck AD, Callister SJ, Monroe ME, Jaitly N, Elias DA, Lipton MS, Smith RD (2006) *Journal of Microbiological Methods* 67: 473-486.

Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846.

Pierre-Alain M, Christophe M, Séverine S, Houria A, Philippe L, Lionel R (2007) Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. *Microbial Ecology* 53: 426- 434.

Romero- Saavedra F, Laverde D, Wobser D, Michaux C, Budin- Verneuil A, Bernay B, Benachour A, Hartke A, Huebner J (2014) Identification of peptidoglycan- associated proteins as vaccine candidates for enterococcal infections. *PLoS ONE* 9(11): e111880.

Santi L, Beys-da-Silva WO, Berger M, Calzolari D, Guimarães JA, Moresco JJ, Yates JR 3rd (2014) Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. *J Proteome Res.*13(3):1545-59.

Silva RS, Souza CRB (2009) Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. ACTA AMAZONICA 39 (2) 255- 260.

Tan AA, Azman SN, Abdul Rani NR, Kua BC, Sasidharan S, Kiew LV, Othman N, Noordin R, Chen Y (2011) Optimal protein extraction methods from diverse sample types for protein profiling by using Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). Tropical Biomedicine 3(28) 620- 629.

Tiong H K, Hartson S, Muriana P M (2015) Comparison of five methods for direct extraction of surface proteins from *Listeria monocytogenes* for proteomic analysis by orbitrap mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods 110: 54-60.

Tjalsma H, Lambooy L, Hermans PW, Swinkels DW (2008) Shedding & shaving: Disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. Proteomics 8: 1415- 1428.

Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química Nova 21: 787-793.

Zhang X, Bishop PL, Kinkle BK (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. Water Science and Technology 39(7): 211-218.

Zhang M, Shen S (2013) Effective protein extraction protocol for proteomics studies of Jerusalem artichoke leaves. Journal of Separation Science 36: 2203- 2209.