

## Fracionamento de proteínas de amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo por eletroforese bidimensional

Thiago S. Oliveira(IC)<sup>1</sup>, Amanda U. Machado(IC)<sup>1</sup>, Paula M. Lima(PG)<sup>2</sup>, Felipe A. Santos\* (PG)<sup>2</sup>, Renato C. F. Neves(PG)<sup>2</sup>, Paula M. Moraes (PG)<sup>1</sup>, Bárbara M. Heiras(PG)<sup>1</sup>, Pedro M. Padilha (PG)<sup>1,3</sup>

1 Instituto de Biociências -UNESP, Botucatu-SP, 2 FMVZ-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia -UNESP, Botucatu-SP, 3 INCT de Bioanalítica – IQ-UNICAMP, Campinas-SP  
(\*santos\_felipe1@yahoo.com.br

Palavras Chave: Nutrição de peixes, proteômica, eletroforese bidimensional

### Introdução

A produção mundial de pescado procedente da aquicultura é estimada em 47 milhões de toneladas, das quais 28 milhões são decorrentes do cultivo em águas continentais, principalmente dos países tropicais, como o Brasil. Das espécies ícticas criadas em ambientes tropicais de água doce destacam-se as tilápias com uma produção mundial que supera dois milhões de toneladas [1]. Nos últimos anos no Brasil ocorreu um considerável aumento na produção de tilápias, o que tem levado os pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição dessa espécie de peixe [2]. O estudo das proteínas presentes em diferentes tecidos da espécie tilápia poderá trazer informações importantes para os pesquisadores que trabalham com essa espécie. Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar procedimentos de preparação de amostras de tecido muscular para fracionamento de proteínas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE), como etapa inicial do estudo proteômica dessa espécie de peixe.

### Resultados e Discussão

A amostra de tecido muscular (pool de amostras) foi macerada em água deionizada utilizando-se almofariz e pistilo e o extrato protéico obtido foi centrifugado a 13000 rpm durante dez minutos em centrífuga refrigerada. Posteriormente as proteínas foram precipitadas com acetona na proporção 1:4. Após este procedimento o precipitado protéico foi ressolubilizado em tampão contendo uréia, tiouréia, CHAPS, anfólitos, azul de bromofenol e DTT. O extrato contendo as proteínas ressolubilizadas foi aplicado em fitas de focalização isoeletrica de 13 cm, com o gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH 3-10. Estas fitas foram hidratadas durante 12 h e em seguida foram levadas ao sistema de focalização isoeletrica, para corrida em primeira dimensão. O tempo médio dessa etapa foi de 4,5 h.

Para a corrida em segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio contendo SDS, tris-HCl pH 8,8, uréia, glicerol, azul de bromofenol, DTT e iodoacetamida, durante 30 min. Em seguida, as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5% (m/v), juntamente com padrões protéicos de massa molar. Os padrões e as fitas foram então selados no gel de poliacrilamida com agarose 0,5% (m/v). O tempo médio na separação em segunda dimensão foi de 12 horas. As corridas dos géis foram feitas em triplicata. Após as separações, as proteínas foram fixadas no gel e coradas com Coomassie Blue.

A análise de imagem dos géis obtidos em três corridas eletroforéticas, utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 7.0, demonstrou uma boa resolução para as três repetições, o que indica que a separação das proteínas ocorreu de forma eficiente. Nos três géis analisados observou-se uma grande diversidade de proteínas com pI (ponto isoeletrico) entre 5 e 10 e massa molar entre 14,40 e 97,00 kDa, destacando-se algumas proteínas de massa molar entre 30,00 e 45,00 kDa que apresentaram maior expressão. A análise de correlação entre os géis indicou que 71,7% das proteínas estavam presentes nos três géis, o que representa aproximadamente 272 spots protéicos. O número médio de spots obtidos nos géis foi de 380±16.

### Conclusões

A boa correlação obtida nas repetições de géis nas separações por 2D PAGE possibilitará o início do estudo de caracterização das proteínas dos spots protéicos por espectrometria de massas por tempo de voo acoplado à ionização dessortiva de matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS), etapa seguinte do estudo proteômico inicial da espécie tilápia do Nilo.

### Agradecimentos

FAPESP (Processo 59778-0), ao CNPq (Processos: 474371/2007-7 e 300302/2008-8) e ao LNLS.

<sup>1</sup>Sa, M., Pezzato, L.E, Barros, M.M. Aqua. Nut, **2005**, 11, 273.

<sup>2</sup>Garcia, J. S.; Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2006**, 69, 1.