

## Fatores que interferem na quantificação de proteínas em culturas de bactérias fixadoras de nitrogênio em meio semi-sólido

R.J. Silva<sup>1</sup>; M.P. Stephan<sup>2</sup> e K.R.S. Teixeira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, CEP 23891-000, Seropédica - RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba, CEP 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

\* Autor correspondente: katia.teixeira@embrapa.br

### Abstract

The colorimetric quantification of proteins presents several limitations according with the biological sample. To quantify proteins directly into cultures of microorganisms is necessary to validate the method of your choice, to guarantee that reagents and other compounds accumulated during growth do not interfere with the reaction. This technical note reports the interferences observed during protein quantification of nitrogen fixing bacteria grown into semi-solid media when glucose or gluconic acid was used as carbon source. The results shown here illustrate the limitations of methods considered validated and recommended when certain modifications are introduced or occur during the execution of an experiment.

**Keywords:** Interfering agents, protein quantification, glucose, gluconic acid.

### Resumo

A determinação colorimétrica de proteínas apresenta limitações de acordo com o material biológico utilizado como amostra. Para quantificar proteínas diretamente em culturas de microrganismos é necessário validar a metodologia escolhida para garantir que reagentes e outros compostos produzidos durante o cultivo não apresentem ação interferente na reação. Nesta nota relatamos as interferências observadas durante a quantificação de proteínas em cultivos de bactérias fixadoras de nitrogênio em meio semi-sólido em presença de glicose ou ácido glicônico. Os resultados apresentados servem para ilustrar as limitações de métodos considerados validados e recomendados quando certas modificações são introduzidas, ou ocorrem, durante a execução de um experimento.

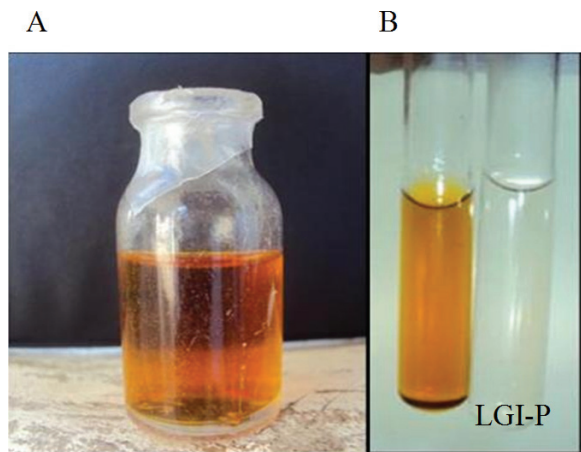
**Palavras-chave:** Agentes interferentes, quantificação de proteínas, glicose, ácido glicônico.

Para avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em diferentes mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultivados em meio semi-sólido foi utilizada a associação de duas técnicas: 1) redução de acetileno, para avaliar a atividade de nitrogenase; e 2) quantificação de proteínas totais. Diversos métodos espectrofotométricos como o de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), do Biureto (Itzhaki e Gill, 1964), de Bradford (Bradford, 1976) e do *Ácido Bicinonínico* (Smith *et al.*, 1985) foram descritos para a quantificação de proteínas. Porém, a maioria apresenta interferência de reagentes utilizados para extração de proteínas e outros compostos como detergentes, polímeros e ácidos como tampões (CHAPS, Tris, MOPS, etc), além de outras substâncias presentes em amostras de fluidos biológicos e também em meios de cultivo como açúcares e diversos sais (Ji, 1973; Krohn, 2001; Barbosa *et al.*, 2009). No caso de quantificação de proteínas em meio de cultivo semi-sólido as limitações estão associadas à viscosidade do meio devido a presença de agar-agar e também a forma de crescimento realizado por certas bactérias fixadoras de nitrogênio. Durante

o cultivo e multiplicação, as células de bactérias fixadoras de nitrogênio formam uma estrutura característica de crescimento denominado película. Esta película inicia-se em formato de sino ou véu e tende a migrar por aerotaxia para a superfície do meio-semi-sólido quando a relação entre o número de células e a taxa de respiração é compatível para garantir níveis de oxigênio dissolvido que não inibem a FBN. Este comportamento pode variar entre diferentes espécies de bactérias diazotróficas o que implica na classificação dessas bactérias em relação a sua capacidade de fixar nitrogênio em condições *in vitro* de anaerobiose, microaerobiose ou aerobiose. No caso de *G. diazotrophicus*, a FBN em microaerobiose é evidenciada pela formação de película em meio semi-sólido contendo sais de LGI suplementado com açúcar cristal (LGI-P) ou glicose como fonte de carbono. O método de Lowry, que se baseia na reação do cobre com a proteína em meio alcalino, e posterior redução do reagente de Folin produzindo composto detectado com a absorvância máxima em comprimento de onda de 750 nm, foi validado para quantificação de proteínas em culturas de bactérias diazotróficas cultivadas em

diversos meios de cultivo semi-sólido (Guedes *et al.*, 2007). Apesar de um dos grandes problemas deste método ser a susceptibilidade da reação a interferência de inúmeros compostos, dentre eles açúcares, não foi detectado interferência da quantificação de proteínas em cultivo de *G. diazotrophicus* selvagem (PAL5) e de diversos mutantes em meio LGI-P semi-sólido na presença de 100 g de açúcar cristal como fonte de carbono. No entanto, durante cultivo da estirpe selvagem e mutantes, obtidos pela inserção aleatória no seu genoma de um mini-transposon (Vidal *et al.*, 2009), foi detectado interferência na dosagem de proteínas em meio contendo sais de LGI-P suplementado com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose.

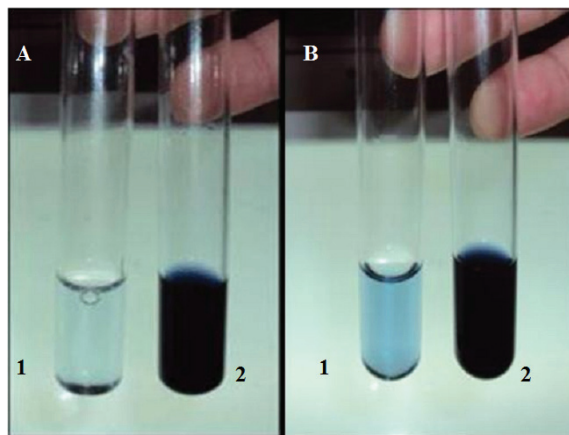
Ação interferente ao método de Lowry por componente do meio de cultivo utilizado foi evidenciada durante preparo da curva de calibração com diferentes concentrações de albumina de soro bovina (BSA) preparada em meio contendo sais de meio LGI-P suplementado com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose como pontos de referência de diferentes concentrações de proteínas. A curva de calibração foi preparada conforme recomendado por Guedes *et al.* (2007), porém foi observado formação de produto com cor que variou de ferrugem a marrom escuro logo após adição de NaOH nas amostras de referência (0-50 µg mL<sup>-1</sup>) e aquecimento a 65°C (Figura 1).



**Fig. 1.** Coloração marrom ferrugem detectada após adição de NaOH 1M na proporção de 1:1 no meio de cultivo semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementado com glicose 50 g.L<sup>-1</sup> (A) e comparação com o meio semi-sólido LGI-P (B).

O uso de uma alíquota da amostra de referência sem adição de BSA (também considerado o Branco da reação) utilizado como um dos pontos de referência para a calibração do método resultou na formação de uma cor azul escuro intensa na presença de meio líquido e também do semi-sólido contendo glicose, ao contrário da cor azulada de tons variáveis observada em curva de calibração preparada em meio LGI-P (Figura 2).

De acordo com nossos dados experimentais, o método de Lowry não permitiu a quantificação de proteínas em culturas de *G. diazotrophicus* em meio semi-sólido contendo glicose. Isso se deve ao fato de açúcares, principalmente aqueles que são redutores, reagirem com o reagente cúprico e o reativo de Folin-Ciocalteu, principal constituinte do reagente de Lowry, produzindo um falso positivo (Zaia *et al.*, 1998).

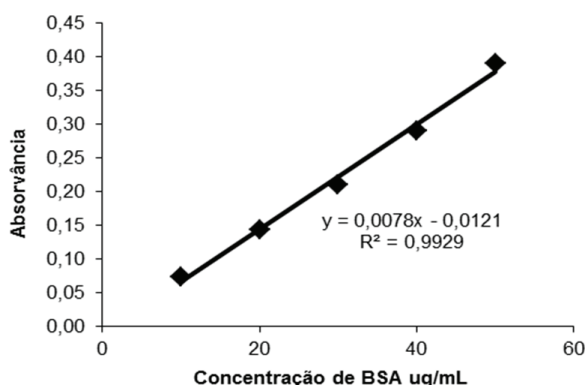


**Fig. 2.** Teste da reação de Lowry para quantificação de proteínas em meios contendo sais de LGI-P líquido (A) e semi-sólido (B), suplementados com 100 g L<sup>-1</sup> de açúcar cristal (1) ou 50 g L<sup>-1</sup> de glicose (2). As imagens A e B se referem ao comportamento observado do ponto de referência zero (sem BSA) considerado o Branco da reação

Como alternativa à quantificação pelo método de Lowry, o método de Bradford foi testado. O método de Bradford é mais sensível que o de Lowry, seu mecanismo de reação é caracterizado pela formação de um complexo em solução ácida entre seu principal reagente, o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, e as cadeias laterais básicas ou aromáticas de aminoácidos (como arginina, lisina, histidina, triptofano e fenilalanina) presentes nas proteínas (Zaia *et al.*, 1998; Georgiou *et al.*, 2008). A quantificação de proteínas nesse caso é dependente dos grupos radicais dos aminoácidos que constituem as proteínas, e que durante a formação do complexo em meio ácido promove uma alteração imediata no comprimento de onda de absorção do corante de 470 para 595 nm e pode ser mensurada por absorvância em comprimento de onda de 595 nm. De acordo com diversos autores, o método de Bradford é um dos menos susceptíveis a ação de agentes interferentes em relação ao método de Lowry, sendo capaz de ser utilizado em presença de diversos sais e açúcares, inclusive 10% de sacarose e 1M de glicose (Krohn, 2001; Antharavally *et al.*, 2009).

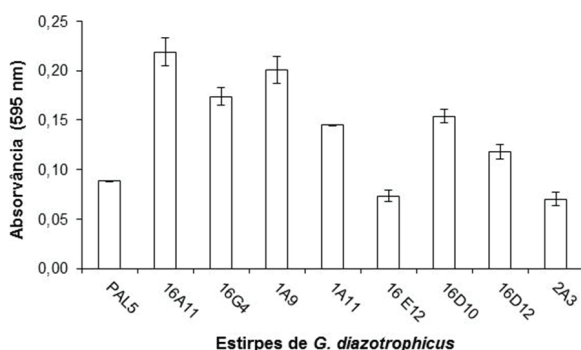
Para a curva de calibração foram preparados diversos pontos de referência utilizando 100 µL de soluções de BSA de concentrações pré-definidas (100 - 500 µg mL<sup>-1</sup>) seguida pela adição de 400

$\mu\text{L}$  de meio semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementado com glicose  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Em seguida, as amostras de referência foram tratadas com 1 volume de NaOH 1N e aquecidas em banho-maria a  $65^\circ\text{C}$ . A reação de complexação do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína ocorreu após a adição de 5 mL de reagente de Bradford e a dosagem de proteína foi feita imediatamente em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm (Figura 3).



**Fig. 3.** Curva de calibração do método de Bradford utilizando meio semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementado com glicose ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) e pH inicial 5,5. Os valores apresentados correspondem a média de triplicatas e a regressão linear foi calculada utilizando Free Statistics Software (<http://www.wessa.net/>).

O método de Bradford permitiu quantificar proteínas em culturas com 7 dias de incubação (Figura 4), sendo possível estabelecer a atividade específica da nitrogenase da estirpe selvagem e dos mutantes nestas condições. No entanto, durante a realização de um experimento para determinação da curva de crescimento das estirpes selvagem e mutantes, foram realizadas coletas entre o 3º e o 5º dia de incubação. Nestas amostras foram observadas interferências durante a quantificação de proteína.



**Fig. 4.** Proteínas totais em culturas de estirpes selvagem (PAL5) e mutantes de *G. diazotrophicus* 7 dias após inoculação em meio semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementado com  $50 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Os valores apresentados correspondem a média de triplicatas e o erro padrão está indicado.

Para quantificação de proteínas totais das culturas de bactérias no meio semi-sólido aos 3, 4 e 5 dias após inoculação, as culturas foram submeti-

das a tratamento com NaOH 1M na proporção de 1:1, homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a  $65^\circ\text{C}$  por 30 min. Imediatamente após adição de NaOH foi possível observar a formação da coloração marrom ferrugem nas amostras, como descrito durante a preparação da curva de calibração do método de Lowry. A leitura dessas amostras em 595 nm não resultou em detecção de diferenças entre os valores obtidos no espectrofotômetro. Outra observação é que em poucos minutos após homogeneização se formaram precipitados o que também interferiu na quantificação. Relatos publicados em revisões de literatura têm indicado que este método também está sujeito a interferências por agentes surfactantes, caotrópicos, entre outros, principalmente aqueles utilizados para preparação de extratos protéicos para isoeletrofocalização (Chial e Splittgerber, 1993; Krohn, 2001). Portanto, em alternativa ao Coomassie, outros corantes têm sido propostos e aplicados em novos métodos (Antharavally *et al.*, 2009).

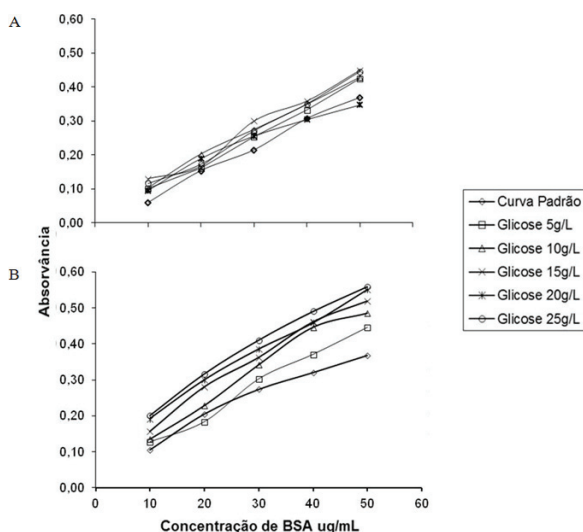
Para identificar qual(is) fator(es) presente(s) na cultura interfere(m) na dosagem de proteínas, diferentes concentrações de glicose e ácido glicônico em presença de  $\text{Fe}^{+3}$  foram testados, usando-se dois pHs distintos: pH 5,5 (correspondente ao pH inicial do meio em que a bactéria é inoculada) e pH 3,5 (correspondente a pH observado durante a condição de cultivo após o crescimento da bactéria).

Para quantificação de proteínas totais foram utilizadas soluções de glicose e ácido glicônico com concentrações de  $5\text{-}25 \text{ g L}^{-1}$ , ambos contendo tampão de fosfato ( $2 \text{ mL L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10% e  $6 \text{ mL L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10%) além de  $1 \text{ mL L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1%, mesmas quantidades presentes na solução de Sais do meio de cultura LGI-P, utilizado para o cultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 e seus mutantes.

As soluções foram tratadas com NaOH 1M na proporção de 1:1, como descrito no item 2 e incubadas em banho-maria a  $65^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi montada com  $400 \mu\text{L}$  de solução a ser testada,  $100 \mu\text{L}$  de padrão de BSA e 5 mL de reagente de Bradford. A avaliação da influência de componentes presentes na solução contendo BSA foi detectada por espectrofotometria em  $\lambda$  595 nm (Figura 5).

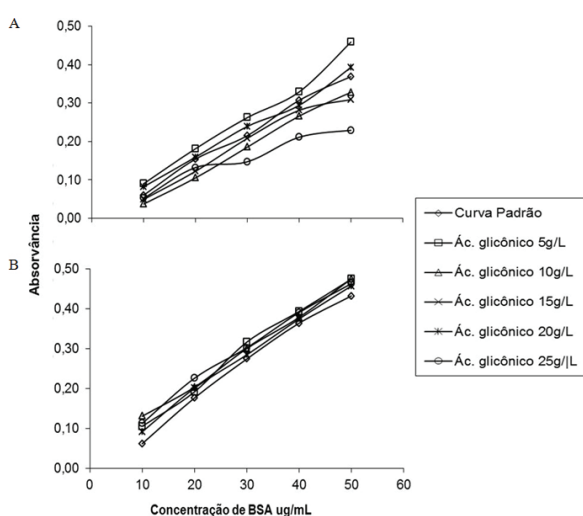
Foi possível observar que nas análises feitas com glicose em pH 3,5 (Figura 5-B) as interferências são bem mais expressivas se comparadas com as análises feitas em pH 5,5 (Figura 5-A). Houve uma crescente elevação de absorvância concomitante a elevação da concentração de glicose em solução. Isso se deve possivelmente ao fato da mesma apresentar-se suscetível a uma

reação com o reagente de Bradford em condições de baixo pH, no entanto o mecanismo para essa possível ocorrência ainda é desconhecido.



**Fig. 5.** Influência do pH 5,5 (A) e pH 3,5 (B) sobre a quantificação de proteínas em presença de diferentes concentrações de glicose. Os valores apresentados correspondem a média de triplicatas.

Ácido glicônico em pH 3,5 (Figura 6-B), não apresentou expressivas variações de comportamento na faixa de concentração estudada ao ser comparada com a curva padrão utilizada. Porém, em pH 5,5 (Figura 6-A), as curvas apresentaram uma variação um pouco maior, porém não foi observada uma tendência que possa ser considerada como resposta para as interferências encontradas durante a análise das culturas, já que neste estágio em que as interferências são detectadas o meio encontra-se em baixo pH devido ao crescimento bacteriano.



**Fig. 6.** Influência do pH 5,5 (A) e pH 3,5 (B) sobre a quantificação de proteínas em presença de diferentes concentrações de ácido glicônico. Os valores apresentados correspondem a média de triplicatas.

De acordo com a revisão de vários métodos colorimétricos, uma das razões apresentada para a interferência no método de Bradford que resul-

tasse em que todos os frascos de reação inclusive o branco ficasse azul escuro foi uma forte ação tamponante alcalina ou devido a alterações de pH do reagente (Krohn, 2001). Além disso, segundo esta revisão a presença de agentes surfactantes também pode ter sido responsável pela precipitação observada durante o preparo da curva de calibração pelo método de Bradford.

Para entender o mecanismo de reação do método de Bradford é importante esclarecer que o corante Coomassie Brilliant Blue G-50 se liga efetivamente nos aminoácidos com grupos radicais básicos ou aromáticos de polipeptídeos quando está em suas formas neutras e aniônicas (cor verde e azul), no entanto em solução em meio ácido, a forma predominante é a forma protonada do corante, a qual apresenta cor avermelhada e absorve luz em comprimento de onda de 470 nm. Portanto, quando ocorre complexação das formas verde e azul com as proteínas por interações hidrofóbicas e eletrostáticas ocorre alteração na absorvância no comprimento de 595 nm (Chial e Splittgerber, 1993; Georgiou *et al.*, 2009).

Os resultados experimentais aqui apresentados indicam que a glicose, mesmo em concentração inferior a citada na literatura, foi identificada como principal interferente durante a dosagem de proteínas por método colorimétrico de Bradford em cultivos semi-sólidos. Outros autores também demonstraram o poder sequestrante de glicose, sacarose e outros açúcares sobre o reagente de Bradford competindo com a formação do complexo coomassie – protein (Banik *et al.*, 2009). No entanto, esse efeito pode ter sido maior do que observado anteriormente devido a presença de ácido glicônico e/ou cetoderivados os quais são ácidos fracos (pKa 3,7-3,8), termoestável e apresentam um poder quelante semelhante ou melhor que EDTA e NTA em pH alcalino, sendo portanto capaz de quelar cálcio e outros íons metálicos di e trivalentes (Ramachandran *et al.*, 2006). Sendo assim, o ácido glicônico, um importante metabólito produzido durante o crescimento de *G. diazotrophicus*, interfere indiretamente na dosagem de proteínas.

**Agradecimentos.** Os autores agradecem o suporte financeiro do Agrofuturo/EMBRAPA referente ao projeto 03.06.09.013 e do Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB/CNPq – Processo nº 402551/2008-7) e também ao PIBIC/CNPq pelo auxílio financeiro para a estudante Renata J. Silva.

## Referências

Antharavally B.S., Mallia K.A., Rangaraj P., Haney P., Bell P.A. (2009). Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analy-*

- tical Biochemistry 385:342-345.
- Banik S.P., Pal S., Ghorai S., Chowdhury S., Khowala S. (2009). Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. *Analytical Biochemistry* 386(1):113-115.
- Barbosa H., Slater N.K.H., Marcos J.C. (2009). Protein quantification in the presence of poly(ethyleneglycol) and dextran using the Bradford method. *Analytical Biochemistry* 395:108-110.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chial H.J., Splittergerber A.G. (1993). A comparison of the binding of Coomassie brilliant blue to proteins at low and neutral pH. *Analytical Biochemistry* 213(2):362-369.
- Georgiou C.D., Grintzalis K., Zervoudakis G., Papapostolou I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical Biochemistry*. 391: 391-403.
- Guedes H.V., Perin L., Reis V.M., Baldani J.I., Teixeira K.R.S. (2007). Quantificação de proteínas totais de bactérias diazotróficas crescidas em meio de cultivo semi-sólido. Comunicado Técnico 95. Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ, Brasil, p. 4.
- Itzhaki R.F., Gill, D.M.A. (1964). A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry* 9, 401-410.
- Ji T.H. (1973). Interference by detergents, chelating agents and buffers with the Lowry protein determination. *Analytical Biochemistry* 52(2):517-521.
- Krohn R.I. (2001). The colorimetric detection and quantitation of total protein. En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wrolstad R.E. et al (Eds.). John Wiley & Sons, Inc. pp. B1.1.1-B1.1.28.
- Lowry O.H., Nira J., Rosenbrough A., Farr L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal Biochemistry*. 193:265-275.
- Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology* 44(2):185-195.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.H., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goike N.M., Olson B.J., Klenk D.K. (1985). Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.
- Vidal M.S., Soares C.P., Fernandes S.M.A., Silva R.J., Teixeira, K.R.S. (2009). 25º Congresso Brasileiro De Microbiologia. 8 a 12 de Novembro, Porto de Galinhas-PE. Brasil, Resumos 2263-1 CD-ROM.
- Wessa P. (2012). Free Statistics Software. Em: Office for Research Development and Education - version 1.1.23-r7, <http://www.wessa.net/>, Consulta Setembro de 2012.
- Zaia D.A.M., Zaia C.T.B.V., Lichtig, J. (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quím. Nova* 21(6):787-793.