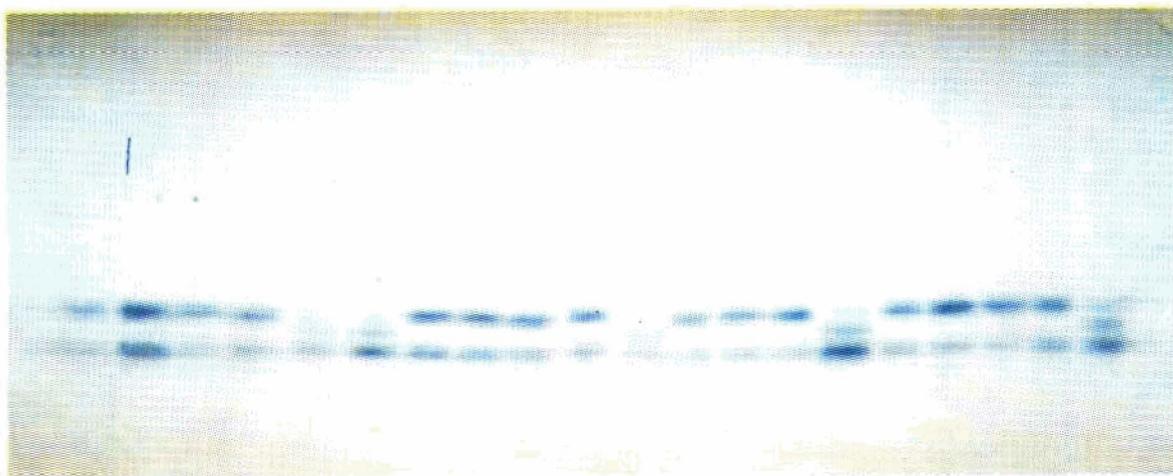


PRINCÍPIOS E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GÉIS DE AMIDO E POLIACRILAMIDA



Embrapa

ISSN 0103-0205

**PRINCÍPIOS E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM
GÉIS DE AMIDO E POLIACRILAMIDA**

Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega
Roseane Cavalcanti dos Santos
Rosa Maria Mendes Freire
Julita Maria Frota Chagas Carvalho



Embrapa Algodão. Documentos, 65

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 - Centenário
Telefone: (0xx83) 341-3608
Fax: (0xx83) 322-7751
<http://www.cnpa.embrapa.br>
algodao@cnpa.embrapa.br
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB

Tiragem: 250 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes
Membros: Alderí Emídio de Araújo
 Eleusio Curvelo Freire
 Francisco de Sousa Ramalho
 José da Cunha Medeiros
 José Mendes de Araújo
 José Wellington dos Santos
 Lúcia Helena Avelino Araújo
 Malaquias da Silva Amorim Neto

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB)

Princípios e utilização da técnica de eletroforese em géis de amido e poliacrilamida, por Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega e outros.
Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999.

103p. (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 65).

1. Eletroforese - Isoenzimas. I. Santos, R.C. dos. II. Freire, R.M.M. III. Carvalho, J.M.F.C. de. IV. Título. V. Série.

CDD 633.51

©Embrapa 1999

APRESENTAÇÃO

No melhoramento genético na atualidade, com base na biologia molecular, várias tecnologias tem sido desenvolvidas, objetivando o aprofundamento dos estudos e também facilitar as escolhas dos genótipos, via estudos enzimáticos e de outros grupos de proteínas para a verificação de vários aspectos, entre os quais, aproximadamente genética entre cultivares e espécies, via isoenzimas e outros produtos do metabolismo vegetal. Entre as tecnologias disponíveis para o estudo enzimático tem-se a eletroforese que é capaz de separar em géis de amido e de poliacrilamida formas moleculares distintas de uma mesma enzima e assim verificar a proximidade genética entre cultivares e espécies. Com esta publicação de quatro pesquisadores da Embrapa Algodão, tendo a Dra. Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega como autora principal, esperamos difundir a técnica da eletroforese para estudos de isoenzimas, uma das ferramentas importantes para o melhoramento genético de plantas.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Geral da Embrapa Algodão

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. POTENCIAL DAS ISOENZIMAS.....	9
3. HISTÓRICO.....	11
4. ASPECTOS DA BIOQUÍMICA E SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	13
5. PRINCÍPIOS DA SEPARAÇÃO.....	18
6. PRINCÍPIOS DA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	22
7. TIPOS DE ELETROFORESE.....	26
8. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA ELETROFORESE....	29
9. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	33
10. PREPARO DE SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE....	36
11. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	57
12. CONFECÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE ZIMOGRAMA	68
13. EXERCÍCIOS DE INTERPRETAÇÃO.....	82
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
15. ANEXOS.....	94

PRINCÍPIOS E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GÉIS DE AMIDO E POLIACRILAMIDA

Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega¹
Roseane Cavalcanti dos Santos¹
Rosa Maria Mendes Freire¹
Julita Maria Frota Chagas Carvalho²

1. INTRODUÇÃO

O uso da técnica de eletroforese para separar múltiplas formas moleculares de uma enzima, com a subsequente coloração das isoenzimas, é de largo uso em ciências biológicas. A técnica tem ajudado a entender problemas referentes à diferenciação celular, ontogenia e evolução, e de outros estudos genéticos, além de ser utilizada para determinação do número e da quantidade de proteínas presentes em uma mistura e para identificar várias enzimas com base na diferença de suas cargas elétricas, tamanho ou conformações, as quais afetam sua mobilidade em determinado campo elétrico (Brewer & Sing, 1970; Asquith, 1977; Medina Filho, 1983; Falcão, 1984).

O uso da técnica pode resultar na redução do tempo, espaço, esforço e dinheiro; todavia, ela não substitui os experimentos de avaliação em campo; a sua grande força está na capacidade de visualizar a enzima diretamente, o que permite a detecção de múltiplos produtos de genes catalizando uma mesma reação; consequentemente, é possível detectar a variação genética independentemente do efeito da mutação (Brewer & Sing, 1970). A variação no padrão de bandeamento

¹Pesquisadora M.Sc. Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB.

²Pesquisadora Drª. Embrapa Algodão

pode ser diretamente igualada à variação na codificação gênica das proteínas.

Um grande número de reações específicas é catalisado por múltiplas formas de enzimas e a disponibilidade de substratos (comerciais) de alta qualidade permite considerável especificidade dos métodos de análise isoenzimática (Brewer & Sing, 1970). Em cada organismo, o número de isoenzimas com uma dada atividade catalítica é pequeno e poucas bandas aparecem no gel (Pasteur et al., 1988).

Uma outra característica é a diferença encontrada em isoenzimas de diferentes tecidos dos organismos e durante o ciclo de vida. Esta diferença pode ser usada clinicamente, para detectar danos causados aos organismos ou parte deles, seja mecânico ou fisiológico ou, ainda, se para estudar a diferenciação de tecidos e a ontogenia (Brewer & Sing, 1970).

A enzima pode ser encontrada em vários compartimentos da célula, variando com o tecido e com a fase ontogenética. Alguns fatores que interferem na intensidade de coloração e na atividade das enzimas estão relacionados às alterações no metabolismo do tecido, tais como nutrição mineral, infecção por fitorganismos ou exposição a ambientes adversos.

Uma grande vantagem do uso de isoenzimas é que ela não requer a purificação da enzima, simplificando grandemente o processo e permitindo que este tipo de estudo seja procedido em qualquer laboratório. Embora muitos fatores estejam envolvidos na eletroforese, na maioria dos casos, não é necessário se ter mais que conhecimentos elementares sobre princípios bioquímicos, para se usar a técnica com sucesso. Como a técnica requer pequenas quantidades de material não purificado, ela é facilmente usada para seleção em massa.

O conceito de isoenzimas é conhecido de longa data, e embora disponha-se hoje, de técnicas para identificar DNA a eletroforese de isoenzimas continuará sendo usada, porque apresenta a vantagem de ser simples, barata e capaz de

fornecer respostas para ajudar a solucionar várias questões (May, 1992) principalmente na análise de variabilidade de populações naturais e artificiais de qualquer forma de vida, da bactéria ao homem. Mesmo com outras técnicas de análise de DNA, não há dúvida de que a seleção e o lançamento de cultivares, clones e variedades, irão continuar dependentes do julgamento de um melhorista experiente, sobre a performance no campo e a avaliação continuará ocupando grande parte do tempo deste especialista (Moore & Collins, 1983). O uso de marcadores, como as isoenzimas, ajuda o melhorista, reduzindo o ciclo do melhoramento e aumentando a eficiência dos programas de cruzamento e seleção.

O presente documento tem por objetivo descrever os princípios e a utilização da técnica de eletroforese em géis de amido e poliacrilamida, como forma de contribuir com o entendimento e operacionalização desta ferramenta, amplamente utilizada em vários estudos, genético-bioquímicos de germoplasma vegetal.

2. POTENCIAL DAS ISOENZIMAS

A utilização da heterogeneidade das proteínas, medida por métodos eletroforéticos, como sistema diferenciador de cultivares depende, principalmente, da extensão da variabilidade intervarietal detectada entre elas (Santos, 1989); quanto mais heterogênea for a população analisada, maiores serão as chances de se conseguir variantes eletroforéticas para as análises genéticas.

No melhoramento de plantas, as tais variantes funcionam como excelentes marcadores genéticos porque as plantas podem ser identificadas quanto ao seu tipo de reprodução ou pureza varietal, através de testes em tecidos de qualquer idade ou fase de desenvolvimento (Medina Filho, 1983). Alguns caracteres quantitativos, como produção, altura, peso de frutos

etc, por estarem sob influência ambiental não podem ser utilizados para identificação de cultivares em análise genética convencional; esses indivíduos, entretanto, podem ser caracterizados através de variantes eletroforéticas, uma vez que não estão sob o controle de fatores ecológicos.

As isoenzimas têm sido utilizadas como marcadores genéticos a nível molecular. Em estudos de desenvolvimento, as modificações nos padrões de bandas eletroforéticas são interpretadas como evidência da atividade diferencial de "n" locos nos vários estádios ontogenéticos do organismo. Esses estádios podem estar associados a eventos fisiológicos durante a diferenciação e maturação dos tecidos. Quase todos os genes são regulados diferencialmente. A presença e a ausência de determinadas bandas eletroforéticas durante a fenologia da planta são consideradas resultantes da ativação gênica diferencial, dos genes que controlam ou modificam a síntese da proteína. Quando ocorrem o crescimento e o desenvolvimento da planta, as modificações dos padrões eletroforéticos são freqüentemente drásticas e incluem o aparecimento de outras proteínas.

No melhoramento, os padrões de diferentes isoenzimas e das proteínas têm sido utilizados para identificar espécies, cultivares e linhagens híbridas porque, uma vez que a maioria dos alelos apresenta expressão codominante, torna-se possível distinguir os heterozigotos dos homozigotos e isto representa uma vantagem que poucos marcadores genéticos apresentam. A análise genética permite a distinção entre as diferentes formas de enzimas codificadas por locos estruturais diferentes e sua importância é que permite quantificar exatamente o número de locos envolvidos no estudo e, assim, a quantidade de informação utilizada. Outras potencialidades das isoenzimas são: verificar a pureza de lotes de sementes, no patenteamento e na proteção de cultivares (McMillim, 1983) e a validade de cruzamentos controlados.

3. HISTÓRICO

A técnica da eletroforese foi utilizada pela primeira vez por Arne Tisselius, em 1937, que separou proteínas não enzimáticas por corrente elétrica. O material usado foi a proteína do soro sanguíneo em solução. Por leitura ótica ele foi capaz de distinguir 5 frações em solução aquosa, que foram identificadas por índice de gradiente de refração (Brewer & Sing, 1970; Asquith, 1977; Medina Filho, 1983; Falcão, 1984). A técnica foi denominada "moving boundary".

O passo subsequente foi a utilização da eletroforese de zona, na qual cada componente da proteína é separado em uma zona distinta em um meio estabilizado e não em uma solução. A detecção de zonas de proteínas nesses meios, feita por refração, não era possível devido à dispersão da luz. No início da década de 50, vários estudos conduzidos evidenciaram a existência de enzimas de plantas, em múltiplas formas. Dawson citado por Brewer & Sing (1970) obtiveram 5 amostras de tirosinase purificada do cogumelo comum, *Isalligta campestris* (Brewer & Sing, 1970).

A evolução do meio foi fator importante no processo; por esta razão, alguns comentários serão feitos a seguir: o uso de papel de filtro, como meio suporte, para a eletroforese de zona das proteínas do soro sanguíneo, foi estabelecido em meados dos anos 50; um dos primeiros estudos com eletroforese em papel inclui a fosfatase alcalina realizados por Beker & Pelegrino, Wieland et al., citados por Brewer & Sing (1970).

Outros meios que passaram a ser usados foram os géis, de ágar, amido, poliacrilamida e agarose.

Segundo Brewer & Sing (1970) o gel de ágar foi desenvolvido por Bordo et al. (1949), e usado pela primeira vez para separação de isoenzimas, em 1959, dez anos depois do seu desenvolvimento. O gel de amido foi introduzido por Kunkel & Slater em 1952, e o primeiro ensaio com isoenzimas

foi feito em 1957, por Vesell & Bearn com lactato desidrogenase e malato desidrogenase, usando amido em blocos. Esta técnica hoje é utilizada em eletroforese preparativa, ou seja, na separação de uma quantidade de proteínas para outras análises.

Em 1955, Smithies introduziu a técnica de eletroforese em gel de amido em lâminas, usada até hoje; este tipo de gel, assim como o de acrilamida, contribuiu com um fator adicional para a separação de proteínas, que não se encontrava nos outros meios. Os poros na matriz do gel que têm a mesma forma e tamanho das moléculas de proteína resultam em uma "peneira molecular" (Markert & Moller, 1959), esta característica contribuiu bastante, para melhorar a resolução de bandas de proteínas. Desenvolveram técnicas histoquímicas de detecção de isoenzimas usando suas atividades catalíticas, nas quais, o produto da reação da enzima produz, de alguma maneira, uma área colorida, tornando-se possível, então, identificar, em um extrato não purificado, contendo centenas de proteínas diferentes, apenas moléculas com a mesma atividade catalítica; eles introduziram também o termo zimograma para descrever as bandas formadas no gel após a coloração (Brewer & Sing, 1970; Alfenas et al., 1991).

Em 1959, sete anos depois de introduzido o gel de amido, Raymond & Weintraub; Ornstein & Davis, introduziram o gel de acrilamida, que é um gel de maior poder de resolução e atualmente, usado também quando se deseja obter maior resolução em análises de DNA.

Um marco histórico na isoenzimologia foi a demonstração da herança da variação eletroforética. Os primeiros relatos datam de 1960 e 1961, através de vários estudos em insetos (Allen, 1960), em milho (Schwartz, 1960) citados por Brewer & Sing (1970).

A eletroforese de isoenzimas passou então a ser usada em diversos estudos, com os mais diferentes organismos porém na década de 70, com a popularização dos computadores,

associada ao desenvolvimento de modelos matemáticos para avaliação de um grande número de dados, os estudos em plantas, principalmente de taxonomia e genética de populações, tiveram uma verdadeira explosão.

A rotina dos métodos de detecção de isoenzimas permanece fundamentalmente a mesma, desde a década de 70. O uso desta técnica continua a crescer, mesmo com o desenvolvimento de técnicas moleculares para o estudo direto dos genes, devido às suas vantagens.

Em plantas, a técnica é usada até hoje para diversas finalidades de estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos, o que é visto, mundialmente, em periódicos científicos.

4. ASPECTOS DA BIOQUÍMICA E SÍNTESE DE PROTEÍNAS

As proteínas são componentes celulares que exercem papel importante, tanto estrutural quanto funcional, dentro das células, e representam cerca de 50% de seu peso seco.

Elas consistem de uma ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades) podendo ser idênticas ou diferentes, algumas vezes acopladas a um elemento não-protéico, conhecido como grupo prostético (Pasteur et al., 1988).

Cada cadeia polipeptídica é composta de uma série de aminoácidos agrupados por ligações covalentes ou peptídicas, que diferem na forma de seu “radical” (aqueles partes que não são envolvidas nas ligações covalentes). A ordem e a natureza desses aminoácidos determinam a estrutura primária de um polipeptídeo. Esta seqüência depende da informação contida no DNA do gene que codifica para um polipeptídeo particular (Pasteur et al., 1988).

Esta informação é transcrita em mRNA que, ao chegar ao citoplasma, converte a mensagem em seqüência de aminoácidos no polipeptídeo, ou seja, uma proteína. Este é o

processo conhecido como tradução. Cada triplet ou códon dos nucleotídeos do mRNA (Quadro 1) corresponde a um mesmo aminoácido na proteína (Pasteur et al., 1988; Alfenas et al., 1991). O código genético é redundante; muitos códons correspondem a um mesmo aminoácido. Portanto, para 64 códons possíveis, tem-se apenas 20 aminoácidos.

A medida em que a síntese prossegue, a cadeia polipeptídica desenvolve uma estrutura tridimensional, primeiro pela formação de uma espiral (alfa-hélice) formando uma

Quadro 1. O código genético. Cada aminiacido em uma proteína é codificado por uma seqüência de nucleotídeos. No DNA de um gene existem quatro diferentes nucleotídeos, que diferem na sua base nitrogenada, classificadas como purinas (adenina (A) e guanina (G) ou pirimidinas (citosina (C) e timina (T)).

1º Nucleotídeo	2º Nucleotídeo				3º Nucleotídeo
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Cadeia terminal	Cadeia terminal	A
	Leu	Ser	Cadeia terminal	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	GluN	Arg	A
	Leu	Pro	GluN	Arg	G
A	Ileu	Thr	AspN	Ser	U
	Ileu	Thr	AspN	Ser	C
	Ileu	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Ala-alanina; Val-valina; Leu-leucina; Ileu-Isoleucina; Pro-prolina; Phe-fenilanina; Trp-triptofano; Met-metionina; Gly-glicina; Ser-serina, Thr-treonina; Cys-cisteína, Tyr-Tyrosina; AspN-asparagina; GluN-glutamina; Asp-ácido aspártico; Glu-ácido glutâmico; Lys-lisina; Arg-arginina; His-histidina.

Fonte: Conny & Stumph (1990).

estrutura secundária, e depois pelo envolvimento em torno de si, originando a estrutura terciária (Figura 1). A forma desse enrolamento depende das propriedades fisico-químicas dos aminoácidos que formam a cadeia polipeptídica (Pasteur et al., 1988). Finalmente, algumas proteínas só são funcionais após muitas cadeias polipeptídicas estarem ligadas, formando a estrutura quaternária (Alfenas et al., 1991).

Por uma série de enovelamentos, proteínas solúveis geralmente têm uma estrutura que se aproxima, em forma, da globular (Pasteur, 1988).

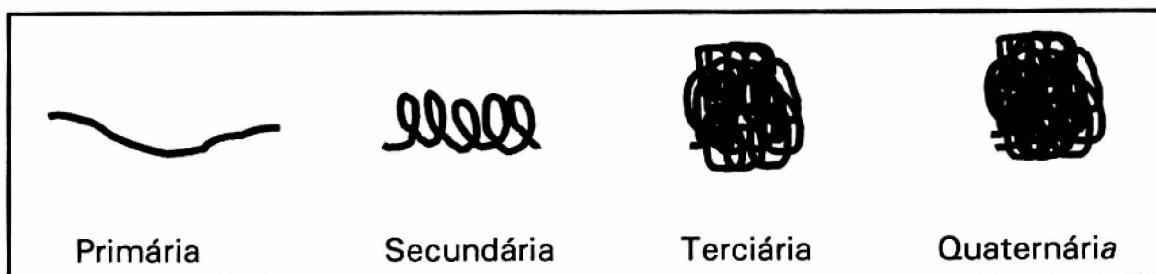


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da proteína.

O padrão representado por bandas coloridas no gel dá indicação das áreas localizadas de proteínas não catalíticas ou de enzimas de uma reação particular. As diferenças na mobilidade eletroforética das proteínas resultam de alterações na seqüência dos seus aminoácidos, determinadas por modificações de seqüências nucleotídicas de genes estruturais. Assim, as variações eletroforéticas são o resultado direto de diferenças genéticas (Burdon & Marshall, 1983)

A enzima ativa pode ser constituída por um ou mais polipeptídeos; portanto, as proteínas estruturais e as enzimas podem ser monoméricas, diméricas, triméricas, tetraméricas etc, quando constituídas por 1, 2, 3, 4 ou mais polipeptídeos, respectivamente (Alfenas et al., 1991). Cada polipeptídeo constitui um monômero. Os monômeros podem ser iguais (homopolímeros) ou diferentes (heteropolímeros) (Alfenas et al., 1991). Conhecer o número de subunidades ou de polipeptídeos que formam uma proteína, é informação importante para a interpretação do gel, porque ele afeta o zimograma.

A variação no tamanho de uma molécula resultante da variação do número de subunidades iguais, pode produzir isoenzimas, particularmente no meio que tem efeito de peneira molecular. Nos heteropolímeros, as isoenzimas podem resultar da variação na combinação dessas subunidades. Essas subunidades podem se combinar ao acaso ou não (Brewer & Sing, 1970).

As múltiplas formas moleculares de uma proteína (isoenzima) podem ocorrer mesmo quando a estrutura primária (seqüência de aminoácidos) é idêntica em todas as formas. Dependendo do tipo de enovelamento causado pelo enrolamento das cadeias polipeptídicas, ocorrem diferenças conformacionais, e uma proporção diferente de grupos amino e carboxila carregados, fica exposta resultando em diferenças na carga líquida (Brewer & Sing, 1970) razão pela qual a conformação da molécula também afeta a migração do gel.

5. PRINCÍPIOS DA SEPARAÇÃO

O fracionamento protéico pela eletroforese depende, basicamente, da passagem de corrente elétrica através de um meio condutor da carga elétrica das proteínas que serão separadas e também, como se viu anteriormente, da conformação do peso molecular e da carga elétrica da mesma (Falcão, 1984; May, 1992). Para transmitir corrente, o meio deve conter uma solução ionizada ou tampão (Brewer & Sing, 1970).

As proteínas são capazes de adquirir carga em função do pH do meio e por isso são tidas como anfóteras (Alfenas et al., 1991). Para cada proteína existe um pH específico, denominado ponto isoelétrico (PI), o qual estabiliza o movimento da proteína quando submetida a um campo elétrico, por não apresentar carga. Cada espécie, pode diferenciar-se de uma outra, por uma ou mais proteínas, podendo ser potencialmente distinguida através da eletroforese.

5.1. O papel da estrutura primária

Em géis com pH fixo, as proteínas se movem constantemente através do gel. Em géis com um gradiente de pH, as proteínas se movem até encontrarem um ponto isoelétrico e então param (focalização isoelétrica) (Pasteur et al., 1988).

A carga líquida das moléculas de proteína é função somatória dos aminoácidos que as constituem (Alfenas et al., 1991). A carga depende da proporção de seus grupos carboxila e amino, que são carregados. Os grupos carboxila desenvolvem uma carga negativa e os grupos amino uma carga positiva. No seu ponto isoelétrico, uma proteína é neutra, tem o mesmo número de grupos carboxila e amino carregados. À medida que o pH decresce, os grupos amino são progressivamente ionizados e a proteína assume uma carga positiva. Com o

aumento do pH os grupos carboxila são progressivamente ionizados, dando às proteínas uma carga mais negativa; assim, a carga elétrica de uma proteína em um pH irá depender do número de grupos amino e carboxila, que são ionizados. Quanto maior a carga de uma proteína, mais rápido ela irá se mover em um campo elétrico na direção do eletrodo que tem a carga oposta (Brewer & Sing, 1970).

No exemplo, citado por Pasteur et al., 1988, da Figura 2, verifica-se uma proteína formada por uma cadeia polipeptídica (I) formada por nove aminoácidos (Figura 2A).

Em um solvente ou tampão, os radicais dos aminoácidos, 1, 2, 5, 7 e 9 estão positivamente ionizados e os radicais dos aminoácidos 3 e 6 estão negativamente ionizados. A carga líquida desta proteína é: $1 + 1 - 1 + 0 + 1 - 1 + 1 + 0 + 1 = 3$. O aminoácido 5 é lisina, codificado no gene pelo códon TTC. Muitos diferentes tipos de mutação podem ocorrer neste códon, em particular a troca de um nucleotídeo por outro (veja no Quadro 1 as mudanças que ocorrem com a troca de uma base no códon).

- 1) Se o códon TTC mudar para TCC, o aminoácido na posição cinco (que é lisina) passará a ser arginina e o gene terá um novo alelo, que irá codificar para uma nova proteína ou aloenzima, com a mesma função enzimática; assim como a lisina, a arginina pode ser positivamente ionizada e a nova proteína (II) irá ter a mesma carga que a molécula original (Figura 2B e F).
- 2) Se o códon TTC muda para TGC, a nova aloenzima (III) terá a treonina na posição 5. Como a treonina é ionicamente neutra, a carga será de + 2 (Figura 2C e F).
- 3) Se a mutação for para a 1ª base (T) e ficar CTC, a nova proteína (IV) terá glutamina, ionicamente negativa, na posição cinco, e a carga será + 1 (Figura 2D e F).

4) Se o códon TTC mudar para TTT ele continuará codificando para lisina (Figura 2E) e a mobilidade não será afetada (V) (Figura 2F).

Se as aloproteínas do exemplo anterior forem submetidas a eletroforese, elas irão migrar na direção do catodo (-) com velocidades proporcionais à sua carga (Figura 2F).

Em resumo

A carga de uma proteína muda quando uma mutação ocorre no DNA, resultando da substituição de um aminoácido por outro com carga diferente. No exemplo, de 4 mutações consideradas, apenas duas foram deste tipo. De modo geral, estima-se que a eletroforese detecta cerca de 1/3 das substituições de aminoácidos e este é o fator mais importante envolvido na subestimação dos níveis de polimorfismo existente por este método.

Portanto, qualquer substituição de aminoácidos, incluindo aqueles que têm a mesma carga, é como mudar a forma espacial do polipeptídeo, devido a diferentes interações dos radicais. Assim, estudos eletroforéticos também produzem variações na mobilidade que não são explicáveis pela carga, mas que são devidos às modificações na estrutura secundária e terciária da molécula.

5.2. A forma e o tamanho da proteína

A forma e o tamanho da molécula são importantes em meios como o amido e a acrilamida, porque esses suportes têm poros, cujos tamanhos se assemelham às moléculas de proteína; então, o tamanho e a forma da molécula de proteína irão afetar sua taxa de migração, porque o meio funcionará como peneira molecular.

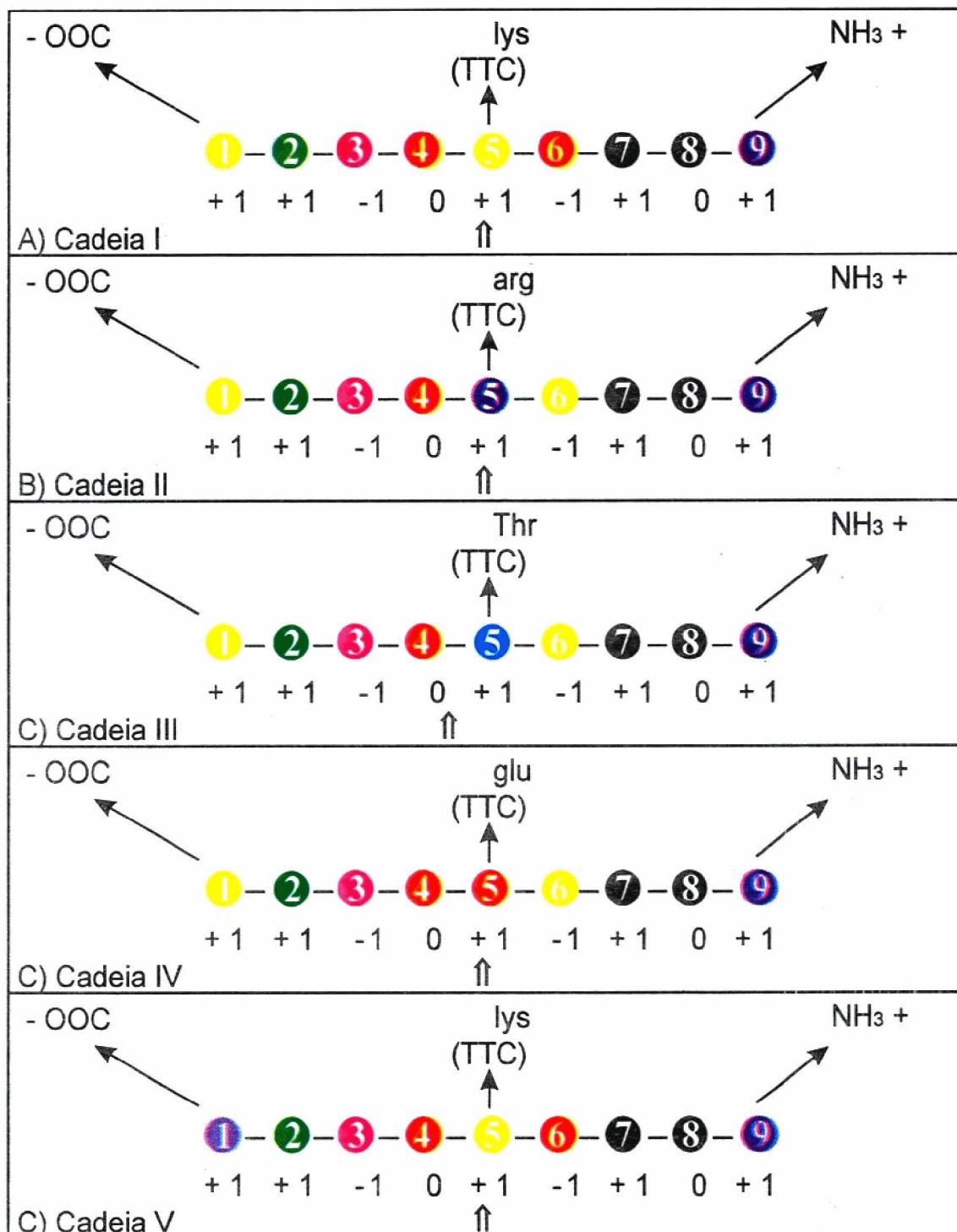


Figura 2. Representação esquemática de cadeias polipeptídicas, indicando as modificações decorrentes da troca de uma única base (A, B, C, D e E) e as implicações na carga do polipeptídeo e na migração eletroforética (F). A somatória da carga das moléculas é I) 3; II) 3; III) 2; IV) 1 e V) 3 (Cont.).

Fonte: Pasteur et al. (1988) Adaptado.

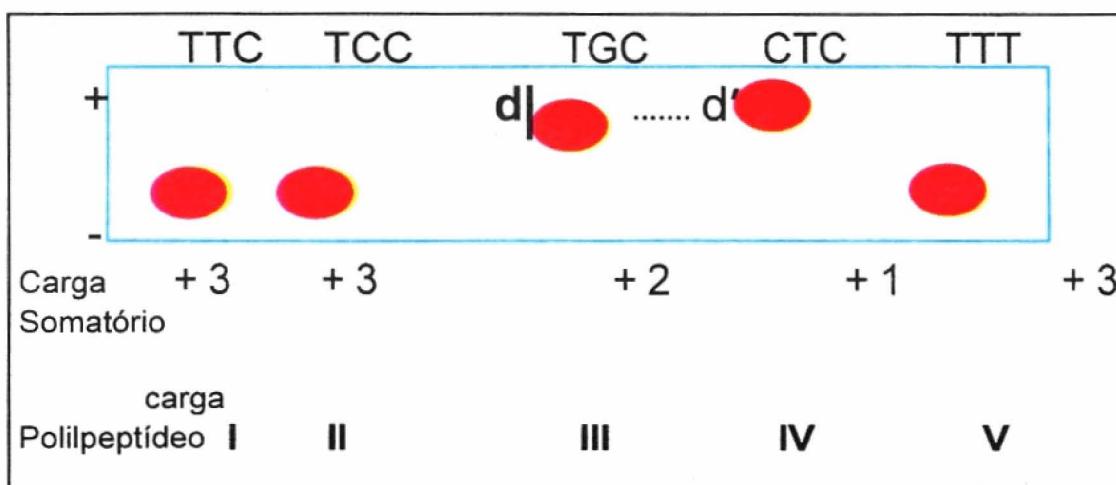


Figura 2. (Cont.) - Representação esquemática de cadeias polipeptídicas, indicando as modificações decorrentes da troca de uma única base (A, B, C, D e E) e as implicações na carga do polipeptídeo e na migração eletroforética (F). A somatória da carga das moléculas é I) 3; II) 3; III) 2; IV) 1 e V) 3.

Fonte: Pasteur et al. (1988) Adaptado.

6. PRINCÍPIOS DA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

A grande maioria das proteínas solúveis é incolor. Para visualização das enzimas, quando a migração eletroforética é finalizada, o gel é submetido a uma reação através da adição de um corante e um substrato específico, no caso de coloração de enzimas. Como resultado da reação, obtém-se um complexo colorido e insolúvel no gel, facilmente visualizado como bandas coloridas e que denotam os pontos de migração das proteínas estudadas (Figura 3).



Figura 3. Gel de poliacrilamida com padrões de esterase em folhas de amendoim corada com fast blue RR salt. 1 - CNPA AM 24; 2 - F1 (CNPA AM 24 x CNPA AM 80); 3 - CNPA AM 80; 4 - CNPA AM 1; 5 - F1 (CNPA AM 1 x CNPA AM 29); 6 - CNPA AM 29; 7 - CNPA AM 116; 8 - F1 (CNPA AM 29 x CNPA AM 116).

A detecção da sua posição no gel após a eletroforese é feita por processos histoquímicos (Pasteur et al., 1988). Esses processos envolvem a coloração dos produtos de desnaturação da proteína ou de uma substância química, associada à proteína ou à produção de um precipitado colorido na posição da proteína, usando suas propriedades catalíticas. A técnica clássica é baseada na produção de um precipitado cromogênico no local da atividade enzimática (Valejos, 1983).

O produto de uma reação enzimática pode ser detectado de muitas formas, conforme se pode observar a seguir:

6.1. Detecção de Proteínas Não-Enzimáticas

6.1.1. Proteínas Totais

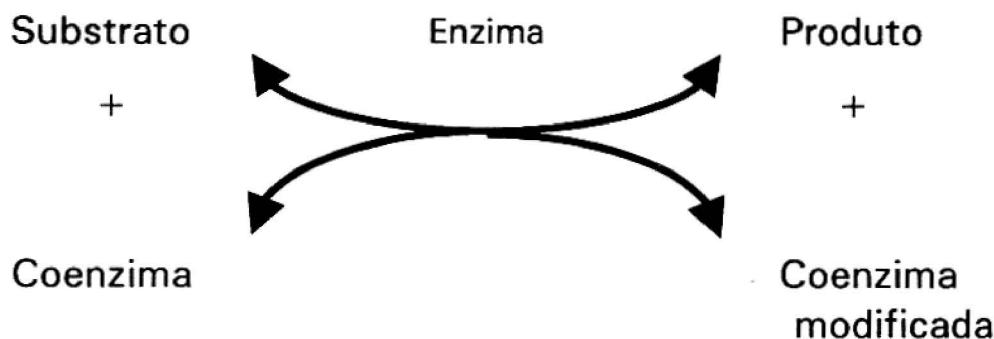
As proteínas contêm um grande número de grupos nitrogenados que podem ser corados, por coomassie blue ou aniline blue (Amido Schwarz) seguindo a liberação desses grupos pela desnaturação da proteína em uma solução ácida. Esta coloração não é específica; na prática, ela apenas revela as proteínas que existem em grande quantidade nos extratos.

6.1.2. Coloração de Substâncias Químicas Associadas às Proteínas

Certas proteínas são associadas a lipídeos, carboidratos ou a outras substâncias químicas que podem ser coradas por uma reação apropriada: a reação de Schiff para glicoproteínas e a reação com Sudan black para lipoproteínas, são exemplos de métodos tradicionais usados.

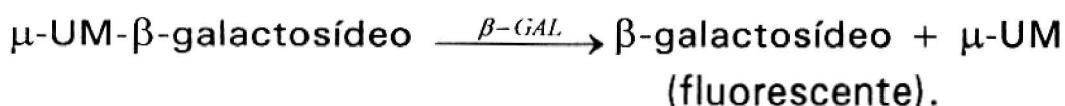
6.2. Detecção de Proteínas Usando-se suas Funções Enzimáticas

Muitas proteínas catalizam reações enzimáticas; quando elas são colocadas em contato com seus substratos e com as várias substâncias químicas necessárias para sua atividade (coenzimas, íons etc.), elas transformam o substrato, de acordo com a seguinte reação:



Se um dos componentes da reação enzimática apresentar cor ou for corado, a posição para qual a proteína migrou pode ser revelada.

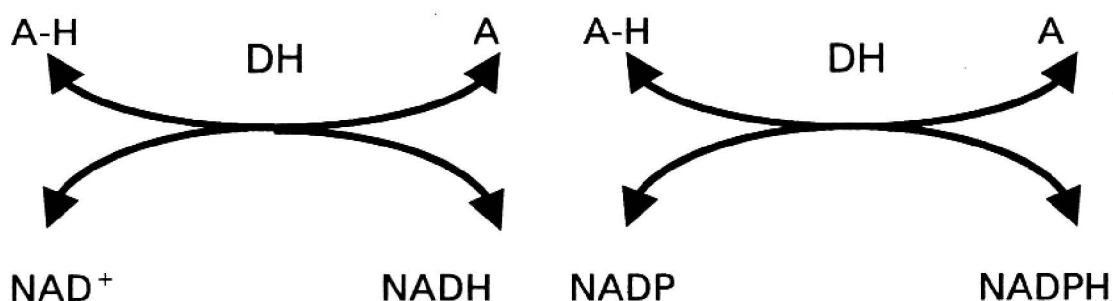
Exemplo de uma reação enzimática que origina um produto colorido-Hidrolases são capazes de degradar substâncias sintéticas, como ésteres μ -metil-umbeliferil (μ -UM), pela liberação de seu grupo álcool, que fluoresce sob luz ultravioleta. Este é o caso da enzima β -galactosidase (β -GAL) e da esterase, quando se usa o produto metil-umbeliferil:



Exemplo de uma reação enzimática que origina um produto corado-Algumas enzimas hidrolisam os “derivados” α - ou β -naftil, liberando o α ou β -naftol. Esta substância pode então combinar-se com um corante “azo” (Fast garnet GBC, Fast blue RR, etc.) para produzir um precipitado colorido. Este é o caso das fosfatas (fos) e da maioria das esterases:



Muitas desidrogenases (DH) catalisam a transferência de um átomo de hidrogênio de seus substratos para uma coenzima (NAD ou NADP)



Com base em uma reação química espontânea que ocorre na presença de fenasina metasulfato (PMS) o átomo de hidrogênio pode ser transferido para um sal de tetrazólio, como o nitroblue tetrazolium (NBT) ou tiazolil blue (MTT), que produzem um precipitado azul insolúvel, denominado formazan.

7. TIPOS DE ELETROFORESE

Toda eletroforese envolve um meio suporte (gel) no qual as amostras são colocadas; as duas extremidades do gel são postas em contato com uma solução-tampão e com os eletrodos (Figura 4).

De modo geral, para obter a melhor separação possível de moléculas, o pesquisador deve modificar as seguintes condições experimentais:

- a) a composição química, a concentração e o formato do gel;
- b) a solução contida nos poros do gel dentro dos quais a molécula estudada irá migrar (tampão);
- c) a composição e concentração da solução usada na extração.

Os géis podem ter as seguintes formas:

- Lâminas de variadas espessuras e dimensões (comprimento e largura);
- géis tubulares (rod géis);
- outras formas.

Vários meios suporte podem ser utilizados para condução da técnica em que alguns apresentam diferenças quanto à resolução da enzima, praticidade e custo operacional. Os mais utilizados são os géis de amido e poliacrilamida, a respeito dos quais será feito um breve comentário.

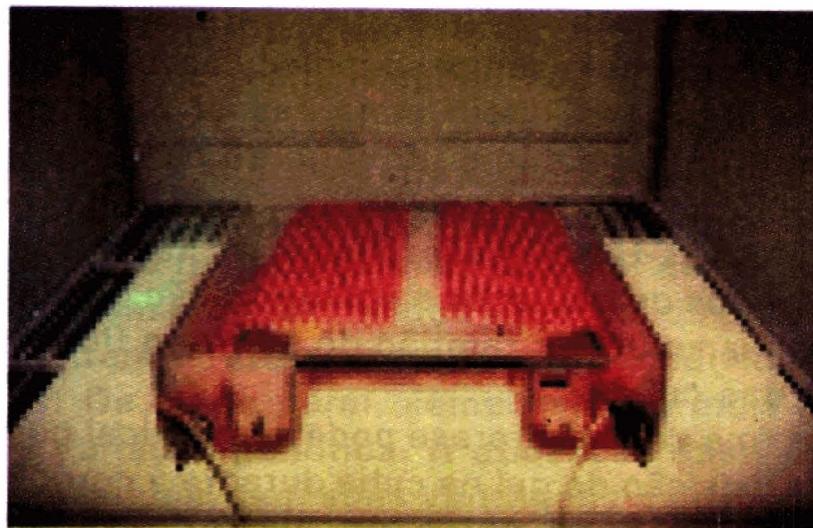


Figura 4. Sistema de eletroforese horizontal mostrando o contato entre o gel, o eletrodo e a solução-tampão, com uso de um tecido.

Na maioria dos métodos de eletroforese de isoenzimas, a estrutura do gel é homogênea; ela consiste de um meio inerte, cujos poros são de tamanho constante, onde a fricção entre as paredes dos poros e as moléculas estudadas é constante durante a migração. O gel deve ser escolhido de forma que a fricção seja mínima, ou mesmo não exista; neste caso, as moléculas estudadas são separadas com base em suas cargas e este é o método mais usado em estudos genéticos. Há casos contudo, em que o gel deve ser escolhido de forma que a fricção seja muito grande; nesses casos, as moléculas estudadas são separadas, principalmente ou totalmente, com base no seu tamanho, pelo efeito de peneiramento molecular.

Seguindo-se este princípio, géis de acrilamida em gradiente de concentração podem ser preparados de forma que o tamanho dos poros diminua de uma extremidade a outra do gel. As amostras são colocadas na extremidade onde os poros são maiores; durante a eletroforese as proteínas se ordenam de acordo com seu peso molecular, parando de migrar quando elas não conseguem mais passar pelos poros, caso em que o gel funciona como um jogo de peneiras, de malhas variadas.

As soluções-tampão são: a) usadas na formação do gel, e ficam nos poros do gel, após a polimerização do meio suporte; b) uma ou duas soluções-tampão do eletrodo ficam no cátodo e no ânodo das cubas.

O sistema de eletroforese pode ser vertical ou horizontal, em relação à posição do gel na cuba durante a corrida; contínuo (quando o tampão do gel e do eletrodo são iguais) ou descontínuo (quando o tampão do gel e do eletrodo são diferentes). Nos sistemas descontínuos, onde a concentração das substâncias é diferente no tampão do gel e do eletrodo, a maior concentração deve estar no tampão do eletrodo. Qualquer que seja o sistema-tampão usado, a difusão do íon da baixa para alta concentração ocorre quando o gel é colocado em contato com a solução dos eletrodos e quando a

fonte é ligada, esta difusão fica associada à migração de ânions na direção do cátodo e de cátions, na direção do ânodo.

Existem outras técnicas de eletroforese, como eletroforese bi-dimensional, e métodos associados a técnicas bioquímicas ou imunológicas, além do método conhecido como focalização isoelétrica, mas estes métodos são pouco usados em genética de plantas (para mais detalhes consultar Alfenas et al., 1998).

8. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA ELETROFORESE

8.1. Tipos de Tecido Usado

Em plantas, pode-se empregar folhas, raízes, ramos, pólen, meristema, sementes, endosperma, embrião ou outros tecidos para os estudos. Esses tecidos podem ser extraídos em diversos estádios de desenvolvimento e de microculturas.

A escolha do tecido depende dos objetivos do estudo, das facilidades de obtenção, de armazenamento e de extração a fim de se obterem amostras com atividade enzimática satisfatória (Alfenas et al., 1991). Observa-se, na literatura, que dois tipos de tecido são mais usados: sementes e tecidos vegetativos; considera-se tecidos vegetativos todos os tecidos que representam diretamente o genótipo individual, coletado das plantas. De modo geral, sementes são mais usadas para estudos de variação genética. A utilização das sementes e de tecidos vegetativos, tem suas vantagens e desvantagens, que se pode observar a seguir, de acordo com Cheliak & Pitel (1984).

Vantagens do uso de sementes:

- 1) As condições de armazenamento são bem conhecidas para a maioria das espécies;
- 2) pequenos espaços são suficientes para armazenar um grande número de genótipos;
- 3) as condições ótimas de armazenamento são facilmente satisfeitas;
- 4) os tecidos são relativamente "limpos" (livres de taninos, fenóis, etc).

Desvantagens do uso de sementes:

- 1) A sazonalidade das sementes, principalmente as recalcitrantes restringe o tamanho e o tipo de amostra a ser coletada, porque elas não ficam disponíveis o ano inteiro;
- 2) o baixo poder germinativo e/ou tratamentos especiais para quebra de dormência, impõem limitações de amostragem e recursos para certas espécies;
- 3) apenas indivíduos sexualmente maduros podem ser amostrados.

Vantagens do uso de tecidos vegetativos:

- 1) O genótipo diplóide é expresso diretamente tanto em angiospermas como em gimnospermas;
- 2) as plantas podem ser amostradas em qualquer estádio de desenvolvimento da plântula, até a maturidade;
- 3) a maioria dos tecidos é disponível durante quase todas as estações do ano e a amostragem pode incluir tantos indivíduos na população quantos forem necessários.

Desvantagens do uso de tecidos vegetativos:

- 1) Condições de armazenamento a longo prazo são desconhecidas para a maioria das espécies;
- 2) o espaço de armazenamento é relativamente maior, se comparado com amostras de genótipos das sementes;
- 3) o armazenamento requer condições especializadas; em geral, freezer ultra-frio ou nitrogênio líquido;
- 4) esses tecidos são, geralmente, ricos em fenóis e quinonas, que dificultam o sucesso dos ensaios;
- 5) a herança e a ligação têm que ser confirmadas por teste de progênie.

8.2. Tipos de Material Vegetativo

8.2.1. Gemas

Muito úteis em áreas de clima temperado onde as gemas estão disponíveis na condição de dormência, por 6-8 meses do ano. Neste caso, é fácil padronizar a posição da amostra e o tipo de gema (reprodutiva ou vegetativa); Cheliak & Pitel (1884) preferem este tecido a qualquer outro material vegetativo porque eles não são ricos em fenóis, metabólitos secundários desnaturantes, como a maioria dos tecidos vegetativos. As condições de armazenamento fornecidas por um freezer comum são suficientes para guardá-los por pelo menos 1 ano; é muito usado em espécies decíduas e em coníferas. A mecanização do processo de homogeneização é bem definida, de forma que 10-50mg de tecido são suficientes para fornecer homogenatos crus para 4 ou 5 wicks.

8.2.2. Folhas Maduras

- a) Angiospermas - O armazenamento de folhas maduras a longo prazo pode vir a ser um problema. Recomenda-se o uso do tecido o mais fresco possível, no máximo uma semana após a coleta. Não se consegue guardar no freezer este tecido e manter sua atividade enzimática, mesmo quando são congelados com nitrogênio líquido antes de serem levados ao freezer. Recomenda-se deixar as folhas em geladeira (2-4°C), com umidade relativa maior que 80% e processá-las durante a semana. Se o armazenamento for necessário, o tecido deve ser previamente homogeneizado com um tampão e congelado imediatamente ou após a centrifugação. No laboratório da Embrapa Algodão costuma-se guardar as amostras em wicks. Alguns laboratórios guardam as amostras centrifugadas, principalmente para utilização em gel de poliacrilamida. A mecanização é possível se acompanhada de alguns preparos adicionais, para evitar aquecimento na Trituração.
- b) Gimnospermas - folhas de gimnospermas, podem ser armazenadas da mesma forma que as gemas.

8.2.3. Raiz, Casca e Câmbio

Pontas de raiz em crescimento, especialmente de plantas jovens, são fontes de tecido das quais as enzimas podem ser extraídas facilmente; a mecanização é possível, o tecido é relativamente limpo (sem fenóis); de 5 a 30mg de tecido fresco com 0,1 a 0,5 ml de tampão são suficientes para 3 a 5 wicks. Quando é necessário usar casca e tecido cambial, a mecanização não é possível; o número de enzimas obtidas da casca é menor que das gemas e folhas; e então, recomenda-se o uso desses materiais apenas quando não se tem outro tecido alternativo. As amostras de cascas podem ser armazenadas em sacos plásticos

a -20°C até o uso. 200mg são suficientes para 3 a 5 wicks e 0,5 ml de solução de extração.

Extrair enzimas de tecidos vegetativos e mantê-las com boa atividade e resolução requer uma série de cuidados, devido à presença de fenóis, quinonas e outros componentes. Essas substâncias podem inibir ou precipitar enzimas. Portanto, não se deve esperar que em espécies ricas nesses compostos um único tampão de extração seja bom para todas as enzimas e tecidos estudados (Cheliak & Pitel 1984).

De modo geral, uma quantidade máxima de solução de extração deve ser adicionada a um mínimo de tecido e isto previne a desnaturação das enzimas extraídas por metabólitos secundários presentes no tecido (Cheliak & Pitel 1984).

A composição da solução tampão de extração é também uma característica a ser observada na presença de fenóis, porque existem grandes diferenças na concentração de proteínas entre tecidos equivalentes de duas espécies; determinada espécie pode ter mais celulose nas folhas, por exemplo.

9. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Em geral, os tecidos usados são homogeneizados, objetivando-se a ruptura das células e a extração das enzimas, em uma solução-tampão. É importante manter o homogenato gelado durante o processo de extração (em torno de 4°C) porque muitas proteínas podem ser desnaturadas pelo aquecimento sem, contudo, serem afetadas pelo frio (Cheliak & Pitel, 1984).

9.1. A trituração

É o método mais usado, podendo ser feita tanto manual como mecanicamente. A trituração manual é feita em almofariz, com pistilo de porcelana (Figura 5).

Para garantir a atividade enzimática, o almofariz e o pistilo são previamente resfriados e durante o processo de Trituração o conjunto é mantido sobre uma barra de gelo.

Quando o tecido usado é a semente ou pólen, convém deixá-los em câmara úmida ou imersos em água por pelo menos 24 horas e, em seguida, retirar o tegumento (no caso de semente) e triturar o tecido restante, juntamente com o tampão até se obter um homogenato. Quando é necessária imersão, o tempo deve ser ajustado para cada espécie e tecido usado.

9.2. A Prensagem

Tem sido usada no laboratório da Embrapa Algodão e em outros, para extração de enzimas de tecidos suculentos, como o palmito da pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) (comunicação pessoal do dr. Charles Roland Clement, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA e a base da folha de sisal. Este processo é bastante simples e rápido; usa-se uma pequena prensa (espremedor de alho ou limão) para extrair o suco da folha de sisal, que cai direto dentro da solução-tampão e é imediatamente congelado, quer na forma líquida, quer em tiras de papel cromatográfico (Wicks).

Tanto na Trituração quanto na prensagem, o homogenato obtido ou extrato deve ser absorvido por pequenos pedaços de papel cromatográfico ou levado aos tubos, para ser centrifugado. Neste caso, o sobrenadante é a porção usada diretamente nas cavidades ou embebidas em tiras de papel cromatográfico. Para uso em vários géis, convém subdividir o sobrenadante em alíquotas para evitar o descongelamento de toda a amostra, quando estiver sendo utilizada.

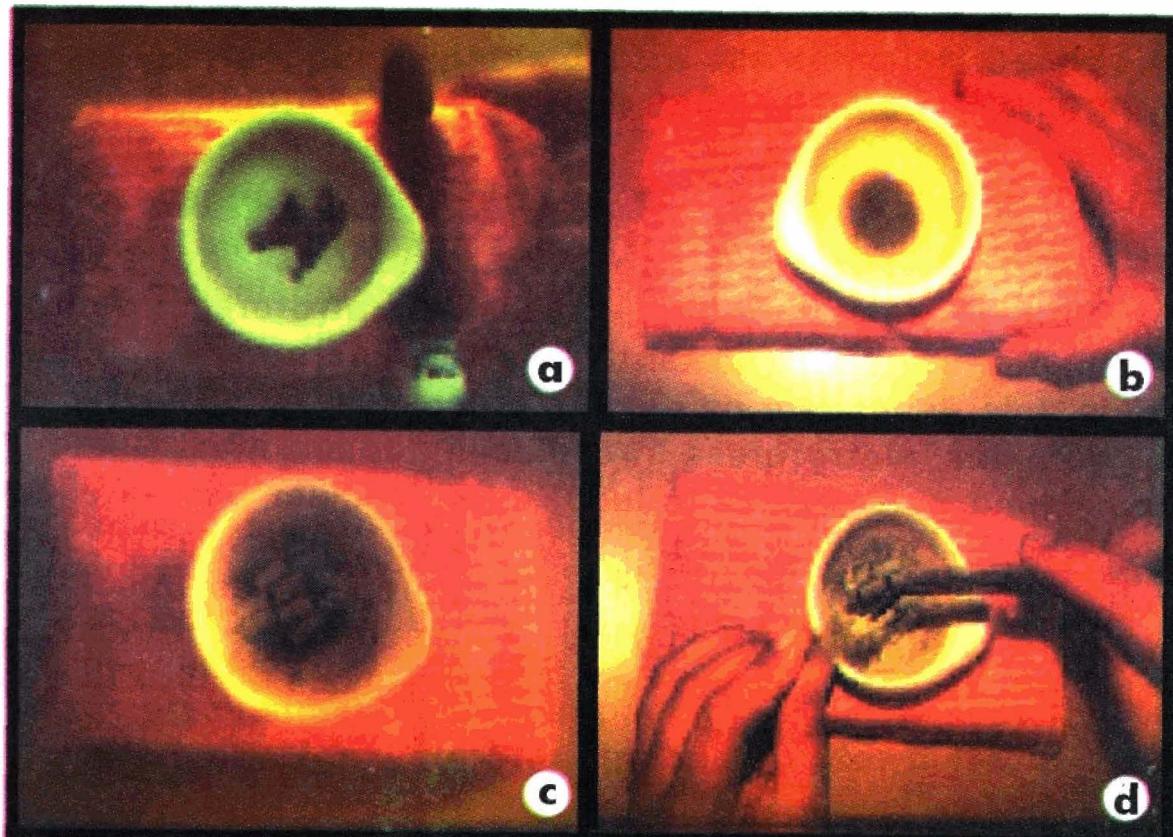


Figura 5. Extração de proteínas para eletroforese. a) tecido cortado em pequenos pedaços é colocado em almofariz previamente resfriado; b) com ajuda do pistilo, a amostra é triturada na presença de uma solução; c) sobre o extrato são colocadas folhas de papel de filtro e, sobre estas, tiras de papel cromatográfico, para absorção; d) as amostras são transferidas para recipientes, onde serão armazenadas.

A maioria dos laboratórios conserva suas amostras em tubos eppendorfs. Na Embrapa Algodão utilizam-se pequenos sacos plásticos, confeccionados para este fim, com o auxílio de uma máquina seladora. Um pedaço de plástico de 10cm de largura e 20cm de comprimento é dobrado ao meio e subdividido em 10 cavidades de 2cm cada uma, onde são guardados os Wicks; após etiquetadas, as amostras são

organizadas em um classificador o qual é guardado em um freezer comum.

10. PREPARO DE SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE

10.1. Importância

Vários fatores são responsáveis por uma reproduzibilidade melhor das análises de eletroforese; dentre eles, talvez o mais importante seja o preparo de soluções, porque dele dependem os demais processos, como extração das proteínas, eletroforese e revelação das enzimas. Como a força iônica e o pH das soluções influenciam bastante na resolução e na atividade enzimática é, portanto, de fundamental importância a precisão no preparo das soluções. O uso de reagentes de marcas credenciadas e idôneas é também necessário para o sucesso dos ensaios, visto que a pureza afeta os resultados.

10.2. Cuidados no Preparo das Soluções

- Efetuar com precisão, em balança analítica, a pesagem dos reagentes;
- observar, ao pipetar líquidos, o volume correto; para os translúcidos, o menisco deve ficar acima da graduação desejada; para os opacos, este deve ficar abaixo;
- não pipetar as substâncias; usar sempre pipetadores automáticos, ou mecânicos;
- ao se preparar uma solução, a concentração desejada deve conter soluto + solvente = volume final; logo, não aferir antes de colocar todo o soluto;
- verificar se os resultados estão transformados para cálculos de diluição. Ao diluir uma solução 5 vezes, por exemplo, isto significa que a 1 volume da solução original serão acrescidos 4 volumes do solvente de diluição, ou seja, a

proporção é 1:5;

- não inserir espátula e/ou colher medida, bastões etc. nos reagentes, nem pipetas dentro das soluções; habitue-se a manipulá-los após colocar quantidades suficientes em recipiente adequado;
- nunca testar um reagente pelo odor nem sabor, porque praticamente todos são tóxicos, variando apenas o grau de toxicidade, que pode ser verificado no rótulo do reagente;
- a vidraria deve ser muito bem lavada, para não haver contaminação na análise;
- ao diluir ácidos, ter o cuidado de verter o ácido na água e não o contrário, para evitar explosão;
- usar máscara, luvas e óculos de segurança ao manipular substâncias tóxicas, voláteis, mesmo utilizando a capela;
- acondicionar o lixo químico em recipientes adequados, devidamente identificados;
- diversas substâncias não podem ser despejadas nas pias, tais como fenol-clorofórmio, tris-borato, metanol e ácido acético;
- os rejeitos sólidos (poliacrilamida e contaminados) devem ser colocados em recipiente próprio;
- fragmentos de vidro devem ser descartados em recipientes específicos;
- agulhas, lâminas e similares não devem ser descartadas em cestas de lixo; deposite-os em caixas específicas;
- limpar sua bancada individual de trabalho, antes e ao final do expediente, devolvendo os materiais utilizados aos locais apropriados e o lixo químico nos recipientes adequados;
- trabalhar sempre com calma, nunca quando agitado, pois evitará acidentes e erros experimentais;
- planejar tudo com antecedência, verificando a disponibilidade de equipamentos, reagentes, suprimentos e vidrarias.

10.3. Concentração de Soluções

10.3.1. Conceitos Básicos

Para se preparar soluções, alguns conceitos básicos devem ser levados em consideração, bem como a formulação e expressão de resultados. Paralelamente, alguns exercícios também serão feitos, enfocando situações de rotina no laboratório.

- * Solução - é um sistema unifásico, formado por um disperso chamado soluto e um dispersante denominado solvente.
- * Concentração das soluções - é a proporção entre o soluto e o solvente de uma solução, que pode ser expressa em várias unidades; o símbolo usado para a concentração é [], a seguir pode-se verificar as mais utilizadas:

10.3.2. Unidades de Concentração (C)

a) Grama por litro, é a massa do soluto por volume de solução.

$$C(g/\ell) = \text{massa do soluto (g)}/\ell \text{ de solução}$$

Ex.: Qual a concentração da solução de NaOH em g/l contendo 40g dessa substância em 500 ml de água destilada ou desionizada?

$$\left\{ \begin{array}{l} m = 40g \\ v = 500ml = 0,5\ell \end{array} \right. \quad C = \frac{40g}{0,5\ell} = 80 \text{ g/l}$$

b) Porcentagem em peso por volume ou, simplesmente, porcentagem em volume, é a massa do soluto em 100 ml de solução.

$$C (\%) \text{ p/v} = \text{massa do soluto (g)/100 ml de solução}$$

Ex.: Qual a concentração em porcentagem (p/v) de uma solução aquosa, contendo 80g/l?

$$\begin{aligned} 1\ell \text{ de solução ou } 1000 \text{ ml} &\rightarrow 80 \text{ g do soluto} \\ 100 \text{ ml} &\rightarrow C \\ \therefore C &= 8 \% \text{ (p/v) ou } 8 \% \end{aligned}$$

c) Porcentagem em peso por peso ou, percentagem em peso, é a massa do soluto em 100g de solução.

$$C(\%) \text{ p/p} = \text{massa do soluto (g)/100g de Solução}$$

Ex.: Qual a concentração em porcentagem (p/p) de uma solução aquosa, contendo 40g/0,4 kg?

$$\begin{aligned} 0,4\text{kg de solução ou } 400\text{g} &\rightarrow 40\text{g do soluto} \\ 100\text{g} &\rightarrow C \\ \therefore C &= 10\% \text{ (p/p)} \end{aligned}$$

d) Partes por milhão (ppm), é a massa do soluto em 10^6 g de solução.

$$C \text{ (ppm)} = \text{massa do soluto (g)} / 1 \text{ milhão de g de solução}$$

Obs: Para soluções com densidade¹ igual a 1, pode-se utilizar mg ou g/ml em vez de ppm.

Ex.: Qual a concentração da solução em ppm, quando se dissolve 2mg de uma substância em 10 ℓ de água destilada?

$$10\ell \rightarrow 2 \text{ mg}$$

$$1\ell \rightarrow C \therefore C = 0,2 \text{ mg/ℓ ou ppm}$$

e) Molaridade (M), é o número de moles do soluto (n) por litro de solução.

$$M = \frac{\text{Nº moles do soluto (n)}}{\text{Volume de solução (ℓ)}}$$

Como

$$n = \frac{m}{PM}$$

onde

n - é o nº de moles do soluto
m - é a massa em (g) do soluto
PM - é o peso molecular do soluto

Substituindo em M tem-se:

¹Densidade da solução (d) é a relação entre a massa (m) e o volume (v) de uma solução ou seja $d = \frac{m}{v}$

Substituindo em M tem-se:

$$M = \frac{m(g)}{PM.V(\ell)}$$

Uma solução 1 molar (M) corresponde ao peso molecular do soluto por litro de solução e isto constitui regra prática para o cálculo de soluções molares (Alfenas et al., 1991).

Ex.: Preparar 500ml de uma solução aquosa a 0,1 M a partir de um soluto, cujo peso molecular é 40g

$$1 \text{ molar (M)} \rightarrow 40\text{g}/\ell$$

$$0,1 \text{ M} \rightarrow 4\text{g}/\ell \text{ ou } 2\text{g}/500 \text{ ml}$$

Qual a molaridade de 2ℓ de uma solução aquosa de H₂SO₄ (PM = 98g) contendo 4,9g do ácido?

$$\begin{cases} m = 4,9\text{g} \\ PM = 98 \\ V = 2 \ell \end{cases} \quad M = \frac{4,9}{98 \times 2} = 0,025 \text{ M}$$

f) Normalidade (N) ou normal, é o número de equivalente-grama do soluto (E) por litro (ℓ) de solução.

$$N = \frac{\text{Nº eq. g do soluto (E)}}{\text{Vol. de solução (\ell)}}$$

O número de equivalente gramas do soluto (E) - é a massa (m) em grama do soluto dividido pelo seu peso equivalente (pE).

$$E = \frac{m}{pE}$$

Substituindo E em N tem-se:

$$N = \frac{m(g)}{pEV(\ell)}$$

Ex: Qual a normalidade de uma solução de HCl (PM = 36,5g) contendo 120g do ácido em 3ℓ de solução?

$$\begin{cases} m = 120\text{g} \\ PM = 36,5 \\ V = 3\ell \end{cases}$$

$$N = \frac{120}{36,5 \times 3} = 1,09 \text{ N}$$

Peso equivalente (pE), é o peso equivalente do soluto, que corresponde ao seu peso molecular (PM) dividido pela sua valência (v).

$$\text{Peso equivalente (pE)} = \frac{PM}{v}$$

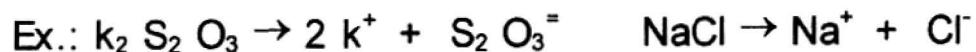
- O peso equivalente de uma base, é o seu peso molecular dividido pelo número de hidroxilos ionizáveis da molécula (ou valência)

$$\text{Ex.: Ca(OH)}_2 \quad pE = \frac{PM}{2} = \frac{74}{2} = 37$$

- O peso equivalente de um ácido, é o seu peso molecular dividido pelo número de hidrogênios ionizáveis da molécula (ou valência)

Ex.: H_2SO_4 $pE = \frac{PM}{2} = \frac{98}{2} = 49$

- O peso equivalente de um sal - é o seu peso molecular dividido pelo número total de eletrovalências positivas ou negativas.

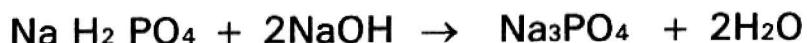


$$PM = 190; pE = \frac{190}{2} = 95; PM = 36,5; pE = \frac{36,5}{1} = 36,5$$

- O peso equivalente de um sal ácido, é o seu peso molecular dividido pelo número de hidrogênios ionizáveis por molécula do sal.



$$\text{Peso Equivalente} = \frac{PM}{1}$$



$$\text{Peso Equivalente} = \frac{PM}{2}$$

10.4. Diluição de Soluções

Quando uma solução é diluída, seu volume é aumentado e a concentração consequentemente diminuída, porém a quantidade total do soluto permanece constante. Duas soluções de concentrações diferentes, mas com a mesma quantidade de soluto devem estar relacionadas. Logo, para se fazer diluições, usa-se a seguinte relação

$$V_i C_i = V_f C_f$$

onde:

$V_i C_i$ - Volume e concentração iniciais

$V_f C_f$ - Volume e concentração finais

10.5. Tabela de Transformações mais Importantes

De	Para	Relação
g/ℓ	% (p/v)	$0,1 \times g/\ell$ ou $g/\ell / 10$
% (p/v)	g/ℓ	$10 \times \% \text{ (p/v)}$
% (p/p)	% (p/v)	$d \times \% \text{ (p/p)}$
% (p/v)	% (p/p)	$\% \text{ (p/v)}d$
ppm	%	$\text{ppm}/10^4$
%	ppm	$\% \times 10^4$

Exercícios de Transformações

1. Transformar g/ℓ em % (p/v)

$$C = 100g/\ell$$

$$1000\text{ml da Solução} \rightarrow 100\text{g do Sólido.}$$

$$100\text{ml da Solução} \rightarrow x$$

$$\therefore x = \frac{100x100}{1000} = 10\text{g}/100\text{ml} \text{ ou } 10\% \text{ (p/v)}$$

logo a relação é:

$$\boxed{\% \text{ (p/v)} = g/\ell \times 0,1}$$

2. Transformar % (p/v) em g/ℓ

$$C = 10\text{g}/100\text{ml}$$

100ml da Solução → 10g do Sólido

1000ml da Solução → x

logo, a relação é:

$$\boxed{g/\ell = \% \text{ (p/v)} \times 10}$$

3. Transformar % (p/p) em % (p/v) onde

$$d = 1,2 \text{ e } C = 10\% \text{ (p/p)}$$

$$\% \text{ (p/v)} = 10 \times 1,2 = 12\% \text{ (p/v)}$$

logo a relação é:

$$\boxed{\% \text{ (p/v)} = \% \text{ (p/p)} \times d}$$

4. Transformar % (p/v) em % (p/p)

$$C = 20\% \text{ (p/v)} \text{ e } d = 2$$

$$\% \text{ (p/p)} = 20/2 = 10\% \text{ (p/p)}$$

logo a relação é:

$$\boxed{\% \text{ (p/p)} = \% \text{ (p/v)}/d}$$

5. Transformação de Normalidade (N) para Molaridade (M) e vice-versa:

A Normalidade é sempre maior ou igual à Molaridade; é igual à Molaridade quando a valência do soluto é igual a 1. Logo:

$$\boxed{N = M}$$

$$M = \text{nº de moles do soluto}/\ell \text{ de solução e}$$

$$N = \text{nº de equivalentes do soluto}/\ell \text{ de solução}$$

A massa de ambas pode ser calculada como:

$$M \rightarrow m_1 = PM \times V \times M$$

$$N \rightarrow m_2 = pE \times V \times N$$

Igualando-se as duas massas, tem-se:

$$PM \times V \times M = pE \times V \times N \text{ mas}$$

$$\boxed{pE = \frac{PM}{v}}$$

Substituindo-se o pE, tem-se:

$$PM \times V \times M = \frac{PM}{v} \times V \times N$$

Eliminando-se os termos comuns, tem-se:

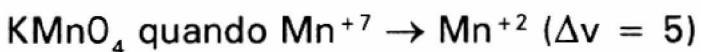
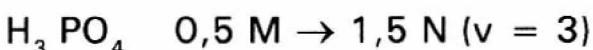
$$\boxed{M = \frac{N}{v}}$$

$$\therefore \boxed{N = Mv} \text{ onde } V \text{ é a valência do soluto}$$

Uma solução de H_3PO_4 a 1,5N corresponde a 0,5M, porque

$$M = \frac{1,5}{3} = 0,5$$

Exemplos:



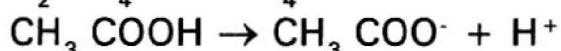
$$\text{KMn O}_4 \quad \left\{ \begin{array}{l} 1\text{M} \rightarrow 5\text{N} \\ 0,2\text{M} \rightarrow 1\text{N} \end{array} \right.$$

10.5. Soluções-Tampão

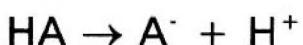
10.5.1. Importância

Como a força iônica e o pH das soluções afetam a resolução e a atividade enzimática, então é de fundamental importância o controle efetivo do pH no momento da preparação das soluções tampão para que se obtenha o sucesso esperado nas análises eletroforéticas.

Para se definir uma solução-tampão ou sistema-tampão e compreender suas propriedades, é necessário recorrer à definição de Brönsted para ácidos e bases; portanto, ácidos são substâncias capazes de doar prótons e bases são aquelas capazes de recebê-los (Marzzoco & Torres, 1990). Exemplos de produtos classificados como ácidos, segundo essa definição: HCl , H_2SO_4 , CH_3COOH , NH_4^+ e CH_3NH_3^+ porque podem dissociar-se liberando prótons, da seguinte forma:



Generalizando-se a equação de dissociação de um ácido, tem-se:



Os íons (Cl^- , HSO_4^- etc.) ou as moléculas (NH_3 , CH_3NH_2) resultantes da dissociação denominam-se base conjugada do ácido, uma vez que pode receber um próton, convertendo-se novamente ao respectivo ácido.

- Ácidos fortes, são os que se dissociam totalmente quando em soluções diluídas.

ex: ácido clorídrico, ácido sulfúrico

- Ácidos fracos, são os que se ionizam muito pouco.

ex: ácido fosfórico, ácido acético, ácido glutárico, tartárico

- Bases fracas, quase não se dissociam.

ex: piridina, tris (hidroximetil aminometano), amônia

- Bases fortes, ionizam-se facilmente.

ex: hidróxido de sódio

10.5.2. Definição

Soluções-tampão - são aquelas onde a concentração de H^+ representada por $[H^+]$ e o pH não se alteram de maneira apreciável, ou quase não se alteram quando se lhes acrescentam pequenas quantidades de ácidos ou de bases, logo, são ditas tamponadas e se apresentam com este comportamento quando contêm quantidades apreciáveis de ácido fraco e base fraca. Quando a elas se acrescenta uma pequena quantidade de ácido forte, quase todo H^+ adicionado se combina com a quantidade equivalente de base fraca, formando o respectivo ácido conjugado. Por isso, o $[H^+]$ e o pH permanecem quase inalterados; por outro lado, quando se adiciona uma pequena quantidade de base forte, quase todo OH^- acrescentado se combina com a quantidade equivalente do ácido fraco da solução para formar a respectiva base conjugada. Também neste caso o $[H^+]$ e o pH permanecem praticamente inalterados (Schaum & Rosemberg, 1975).

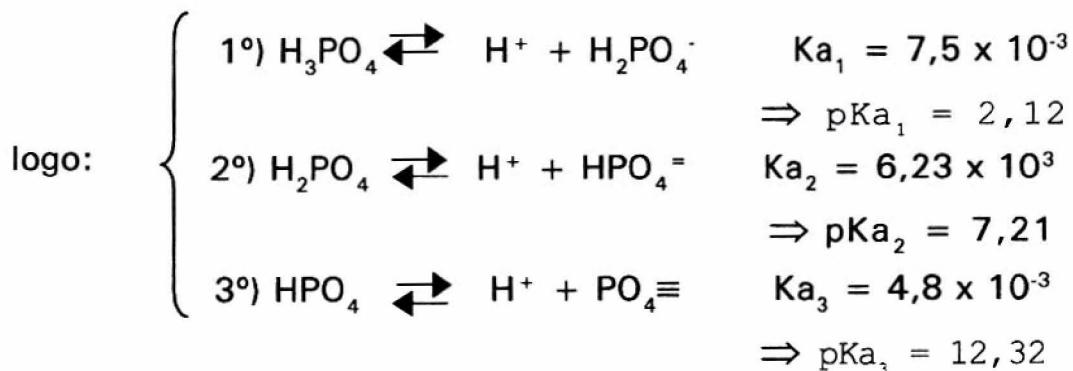
10.5.3. Fatores que afetam a eficiência do tampão

Dois fatores, segundo Conn & Stumpf (1990) determinam a eficiência ou a capacidade tamponante da solução: um deles é a concentração molar dos componentes do tampão; o segundo fator é a relação entre a concentração da base conjugada e o ácido fraco. A capacidade tamponante é diretamente proporcional à concentração dos componentes do sistema.

Altas concentrações de sais freqüentemente inibem a atividade de enzimas e outros sistemas fisiológicos (Conn & Stumpf, 1990).

A magnitude da dissociação dos prótons pode ser descrita por uma constante de ionização (K_{ion}) que para um ácido é representado por K_a e para uma base é K_b .

Por exemplo, do ácido fosfórico (H_3PO_4) podem ser obtidos 3 prótons na ionização completa de uma molécula desse ácido.



Isto significa que a um pH de 2,12, a primeira ionização do H_3PO_4 é de 50%; todavia, para a terceira também de 50%, o pH será de 12,32. Para o ácido fosfórico as duas formas iônicas predominantes são $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} .

Lembrar-se de que: a concentração de H^+ no H_2SO_4 0,1N e CH_3COOH 0,1N não é a mesma; entretanto, um litro de cada uma dessas soluções contém a mesma quantidade de ácido titulável.

10.7. Determinação de pKa.

A capacidade de ionização é importante propriedade de muitos componentes biológicos. Ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas etc, são exemplos de compostos bioquímicos que se ionizam em graus variáveis em sistemas biológicos (Conn & Stumpf, 1990).

O pKa pode ser determinado no laboratório medindo-se experimentalmente a curva de titulação com um pH metro. O pKa é o ponto de inflexão da curva de titulação.

Por definição tem-se que:

$$pK = -\log K$$

logo:

- a força do ácido expressa-se pelo

$$pKa = -\log Ka$$

- a força da base expressa-se pelo

$$pK_b = -\log K_b$$

Exemplos: 1) Qual o pKa de um ácido, cuja constante de ionização é 10^{-4} ?

$$\begin{array}{ll} K_a = 10^{-4} & pK_a = -\log K_a \\ pK_a ? & pK_a = -\log 10^{-4} \\ & pK_a = 4 \end{array}$$

2) Calcular o pKa de uma solução, cujo K_a é $1,8 \times 10^{-5}$.

$$\begin{aligned} K_a &= 1,8 \times 10^{-5} \\ pK_a &= -\log K_a \\ pK_a &= -\log (1,8 \times 10^{-5}) \\ pK_a &= -\log 1,8 + 5 \\ pK_a &= -0,26 + 5 = 4,74 \end{aligned}$$

Valores de pKa são tabelados e podem ser encontrados em vários livros, como p.ex. em Alfenas et al. (1991).

10.8. Cálculo de pH

Por definição pH é o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio e pOH é o logaritmo negativo da concentração do íon hidroxila,

logo:

$$pH = -\log$$

e

$$pOH = -\log [OH^-]$$

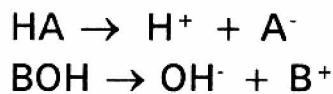
Exemplos:

1) Determinar o pH de uma solução 0,01 M de HCl.

$$\text{pH} = -\log [10^{-2}] = 2,0$$

2) Determinar o pOH e o pH de uma solução 0,001 M de NaOH.
 $\text{pOH} = -\log[10^{-3}] = 3,0$ $\text{pH} + \text{pOH} = 14 \therefore \text{pH} = 14 - 3 = 11$

Ácidos e bases fortes estão dissociados totalmente em solução aquosa; entretanto, ácidos e bases fracas se ionizam parcialmente em solução; logo:



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

①

$$K_b = \frac{[\text{OH}^-][\text{B}^+]}{[\text{BOH}]}$$

②

O valor da concentração de $[\text{H}^+]$ é dado através da equação 1. logo:

$$[\text{H}^+] = k_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad \text{e aplicando-se o logaritmo negativo nos dois}$$

membros da equação, tem-se:

$$-\log [\text{H}^+] = (-\log K_a) + (-\log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]})$$

Por definição, tem-se que:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

③

Esta é a equação de Henderson-Hasselbach

O mesmo processo pode ser aplicado para a equação 2, obtendo-se:

$$pOH = pKb + \log \frac{[B^+]}{[BOH]} \quad ④$$

Para casos específicos aplicam-se as equações ③ e ④ obtendo-se outras equações

- Ácido fraco dissociado em solução aquosa:

$$pH = \frac{pKa - \log[HA]}{2}$$

- Base fraca dissociada em solução aquosa:

$$pOH = \frac{pKb - \log[BOH]}{2}$$

- Sal de ácido fraco e base conjugada forte:

$$pH = \frac{pKw + pKa + \log[Sal]}{2}$$

- Sal de ácido fraco e base conjugada fraca:

$$pH = \frac{pKw + pKa - pKb}{2}$$

Cálculo de pKw :

$$pK_w = pK_a + pK_b$$

onde: $pK_w = 14$

Regra prática para o preparo de solução-tampão (Alfenas et al., 1991).

Há uma regra prática para o cálculo de soluções-tampão, a qual é feita através de titulação. Por exemplo, para se preparar 1ℓ de solução-tampão de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, preparam-se, inicialmente, 500 ml de fosfato de sódio bibásico (0,05M) e titula-se com uma solução de fosfato monobásico (0,05M) até pH 7,0 e, finalmente, afere-se o volume para 1ℓ com água destilada ou desionizada.

As soluções Tris-HCl, Tris-Glicina e outras utilizadas na extração de proteínas, eletroforese e revelação de enzimas, são consideradas soluções-tampão, pelo fato de resistirem a variações de pH, embora não sejam formuladas por um ácido fraco ou base fraca e seus respectivos sais. Por exemplo, para se preparar Tris-HCl, deve-se proceder da seguinte forma: pesar a base (Tris) na concentração desejada e dissolvê-la com uma porção de água, cerca da metade do volume final, homogeneizar bem, titular para o pH indicado com o HCl diluído e completar para o volume final com H₂O destilada ou desionizada (Alfenas et al., 1991).

Exercícios:

- 1) Calcular o pH do tampão fosfato preparado pela mistura de 0,05 moles de K₂HPO₄ e 0,05 moles de KH₂PO₄ em 1 litro de solução. O pKa₂ do ácido fosfórico é 6,8 (Alfenas et al., 1991).

Cálculo do pH

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]}$$

$$\text{pH} = 6,8 + \log \frac{[\text{HPO}_4^=]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$\text{pH} = 6,8 + \log \frac{0,05}{0,05} \therefore \boxed{\text{pH} = 6,8}$$

2) Quantos gramas, de NaH_2PO_4 ($\text{PM} = 138,01$) e Na_2HPO_4 ($\text{PM} = 141,98$) são necessários para se obter 1ℓ de uma solução-tampão com pH 7,0 ($\text{pKa} = 6,86$) e concentração total de fosfato de 0,1 M (Alfenas et al., 1991).

Se pH = 7,0 e pKa = 6,86 e aplicando-se a equação de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]}$$

Substituindo-se os valores dados tem-se:

$$7,0 = 6,86 + \log \frac{[\text{HPO}_4^=]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$\therefore \log \frac{[\text{HPO}_4^=]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 0,14$$

$$\frac{[\text{HPO}_4^=]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 1,38 \quad \therefore [\text{HPO}_4^=] = 1,38 \cdot [\text{H}_2\text{PO}_4^-] \quad \textcircled{1}$$

Mas como:

$$[H_2PO_4^-] + [HPO_4^{\frac{1}{2}}] = 0,1 \therefore [HPO_4^{\frac{1}{2}}] = 0,1 - [H_2PO_4^-]$$

Igualando-se as equações ① e ② tem-se que:

$$1,38 \cdot [H_2PO_4^-] = 0,1 - [H_2PO_4^-]$$

$$2,38 \cdot [H_2PO_4^-] = 0,1$$

$$\therefore [H_2PO_4^-] = \frac{0,1}{2,38} = 0,042 \text{ M}$$

Como a concentração molar é dada pela fórmula:

$$M = \frac{m}{PM \cdot V} \therefore m = [M] \cdot PM \cdot V$$

Então a massa do $[H_2PO_4^-]$ é:

$$m_{H_2PO_4^-} = [H_2PO_4^-] \cdot PM \cdot V$$

$$\therefore m_{H_2PO_4^-} = 0,042 \cdot 138,01 \cdot 1$$

$$m = 5,8 \text{ g}$$

Substituindo em ② a $[H_2PO_4^-]$, tem-se que:

$$HPO_4^{\frac{1}{2}} = 0,1 - 0,042 = 0,058 \text{ M}$$

Para se calcular a massa do $[HPO_4^{\frac{1}{2}}]$:

$$m_{H_2PO_4^-} = [HPO_4^{\frac{1}{2}}] \cdot PM \cdot V$$

$$m_{H_2PO_4^-} = 0,058 \cdot 141,98 \cdot 1 \therefore m = 8,2 \text{ g}$$

11. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Observações importantes e algumas peculiaridades para obtenção do sucesso da técnica, serão feitas a seguir.

A observância de normas de segurança e de gerenciamento é de grande importância, devendo ser levadas em consideração e afixada no laboratório para a organização e eficiência na condução dos trabalhos.

A segurança, tanto individual quanto coletiva, inicia-se com a prevenção de acidentes até os mínimos detalhes de conhecimento a respeito da toxicidade das substâncias, seus efeitos, interações, etc.

11.1. Cuidados Gerais

- **Como em todo laboratório, no de eletroforese o fluxo de pessoas deve ser terminantemente reduzido. O uso de jaleco, máscara e luvas deve ser constante, principalmente porque grande parte das drogas utilizadas possui efeitos neurotóxicos, cancerígenos, mutagênicos, e o contato deve ser cuidadosamente evitado;**
- **Diariamente, o laboratório deve ser limpo, principalmente de poeira; os balcões, antes de qualquer operação, devem ser limpos com álcool; as vidrarias, em especial as pipetas, não devem conter qualquer resíduo ou impureza. Considerando-se que se opera com partículas microscópicas, qualquer descuido com a assepsia irá influenciar na resolução dos zimogramas, mascarando os resultados;**
- **As drogas utilizadas em eletroforese devem ser obtidas a partir de marcas credenciadas no mercado; sua pureza influencia consideravelmente a resolução dos sistemas. Os substratos e os corantes devem ser armazenados em freezers e em frascos escuros, visando aumentar sua**

durabilidade. Em caso de dúvida quanto à armazenagem, o operador deve seguir rigorosamente as indicações contidas no rótulo das embalagens, ou nos catálogos dos fabricantes;

- Os frascos de todas as soluções preparadas devem conter etiquetas com a identificação da solução, a fórmula, a data do preparo e a rubrica de quem a preparou;
- Os equipamentos de laboratório devem ser utilizados corretamente. Antes do uso, verificar os procedimentos necessários, como fonte de energia, calibração dos mesmos (potenciômetro, balança, etc) e temperatura do refrigerador.
- O caderno de laboratório é de grande importância e deve estar sempre atualizado. Nele devem conter roteiros padronizados de cada experimento, acompanhamento e avaliação dos resultados. Formulários próprios podem ser utilizados com todas as informações que se fizerem necessárias a cada experimento. O modelo usado no Laboratório de Apoio Multidisciplinar – LAM, da Embrapa Algodão, é apresentado na Figura 6.

Como forma de praticidade são organizadas fichas catalográficas de protocolo (receitas) e os procedimentos necessários para confeccionar as soluções padronizadas.

Laboratório de eletroforese de isoenzimas

Resultado de ensaio

Experimento: _____ **data** / /

Espécies envolvidas: _____

Sistema:

Meio suporte: _____ **Concentração:** a) _____
b) _____

Tempo de cozimento:

Tempo com wicks:

Hora inicial: **Hora após wicks:** **Hora final:**

Voltagem inicial: **Voltagem após wicks:** **Voltagem final:**

Corrente inicial: Corrente após wicks: Corrente final:

Migração:

Mapa do gel Enzima: _____

Enzima. _____

1)	7)	13)	19)
2)	8)	14)	20)
3)	9)	15)	21)
4)	10)	16)	22)
5)	11)	17)	23)
6)	12)	18)	24)

Resultado e observações

Figura 6. Modelo de formulário de laboratório utilizado para catalogar experimentos e géis. Após secados pelo método do bastidor, a fatia do gel é fixada no formulário e assim guardada.

11.2. Etapas Experimentais

A análise de isoenzimas envolve cinco estágios: a) preparo das soluções e dos extratos; b) preparo do gel; c) aplicação dos extratos no gel e conexão com a fonte (eletroforese); d) coloração ou revelação; e) interpretação dos géis e armazenamento dos dados que eles contêm. A seguir, descreve-se um pouco de cada um deles.

a) O preparo das soluções e dos extratos já foi visto anteriormente, no Capítulo 8; contudo, alguns cuidados no armazenamento devem ser observados (Cheliak & Pitel, 1984).

O método de armazenamento mais eficiente é o congelamento com nitrogênio líquido (-180°C). O armazenamento das amostras em freezers de -60°C a -80°C é a melhor alternativa ao nitrogênio líquido; eles apresentam a vantagem de ter capacidade superior a 100ℓ, o que facilita a organização da amostra; todavia, se ocorrer queda ou falta prolongada de luz, a perda de amostras é total.

Quando não dispomos de outro aparelho, um freezer doméstico pode ser usado. A temperatura varia de -20°C a -35°C dependendo da temperatura externa, porém o período de armazenamento é reduzido porque as amostras desnaturam mais rapidamente quando são levadas a eletroforese.

b) Preparo do gel

- Gel de Poliacrilamida

A poliacrilamida é um polímero sintético que permite a separação da molécula protética em poros de aproximadamente 0,5 a 3,0 nm, dependendo do ajustamento da concentração total de acrilamida na reação de polimerização; é uma substância hidrofílica, que polimeriza na presença de radicais

livres e do bis-acrilamida, para formar um gel cujas características são muito atrativas do ponto de vista da separação eletroforética de proteínas. A substância é inerte e estável na presença de um campo elétrico e pode ter porosidade uniforme e controlada, nas concentrações prescritas dos monômeros de acrilamida. A polimerização do gel requer a formação de ligações cruzadas entre as cadeias, de poliacrilamida, que ocorrem por meio das moléculas de bis-acrilamida, a qual, por copolimerização, causa reticulação entre as cadeias formando uma verdadeira peneira molecular.

Neste meio os ensaios podem ser feitos com gel posicionado tanto horizontal quanto verticalmente.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida a 0°C ou em temperatura superior, até 10°C. A temperatura de polimerização pode situar-se entre 6°C a 20°C; entretanto, quanto mais baixa for, maior terá a capacidade de eliminar as contrações térmicas ou expansão do gel; sua concentração pode variar para produzir géis com tamanho de poros variáveis de forma que, quanto maior for a concentração de acrilamida, menor será o diâmetro do poro do gel. Para promover a polimerização utiliza-se a ação catalizadora inicial do íon persulfato, ativado pela amina terciária NNN'N'-tetrametil etilenodiamina (TEMED). Esta operação é rápida e deve ser conduzida em sala com luz e temperatura ambiente.

O gel de poliacrilamida é química e fisicamente inerte, de modo que não interfere na mobilidade das moléculas. Durante a eletroforese, quanto mais alta a voltagem ou a intensidade da corrente, maior será o aumento da temperatura, que pode resultar na perda da atividade enzimática. Para se manter a temperatura baixa, geralmente efetua-se a corrida em geladeira (Alfenas et al., 1991).

Géis obtidos com poliacrilamida são de alta resolução; contudo, são mais onerosos e de maior periculosidade, devido aos efeitos neurotóxicos que seus componentes acrílicos provocam.

As dimensões de um gel dependem do objetivo do estudo e da quantidade de amostra que se quer analisar. A espessura varia de 1 a 3mm. A concentração varia de 5 a 20%. No LAM usa-se na concentração de 7% sendo que destes, 95% é de acrilamida e 5% de bis.

Para a eletroforese em sistema descontínuo é comum usar-se uma concentração de 3 a 5% no gel empilhador e outra de 3 a 20% no gel separador.

É prática comum se preparar soluções-estoque das soluções tampões e dos componentes acrílicos, evitando um armazenamento prolongado das últimas. Os protocolos de algumas soluções-estoque utilizadas no LAM, estão descritos no anexo 1.

- Preparo do Gel de Poliacrilamida para Eletroforese Horizontal

Separe todo o material necessário e deixe-o à mão (Figura 7); monte a placa, dissolva o acrilamida na solução tampão e acrescente os catalisadores (persulfato e temed); misture e verta imediatamente sobre a placa (Figura 8). Para acelerar a polimerização deixe o gel na presença de luz e, após a polimerização, leve-o à geladeira, para resfriar.

- Aplicação de Amostras

Antes de aplicar as amostras prepare um guia (mapa do gel) onde serão anotadas todas as informações do ensaio, conforme modelo da Figura 6. Se os extratos foram preparados com antecedência, separe as amostras que irão ser utilizadas e classifique-as na ordem em que elas irão ficar no gel; o descongelamento pode ser acelerado colocando as amostras (nos recipientes) dentro de água gelada, por alguns minutos. Usando uma régua como guia, coloque os wicks sobre o gel; se for empregar amostra líquida, observe que pequenas cavidades devem ser formadas com auxílio de uma "forma" ou de um "pente", que deve ser colocado sobre o gel antes da

polimerização; as amostras devem ser espaçadas no mínimo de 2 a 3mm. Coloque azul de bromofenol nas duas amostras da extremidade (Wicks) ou em duas cavidades; este corante migra muito mais rápido que as proteínas, e é indicador da migração quando a fonte estiver ligada.

Se estiver usando uma cuba aberta, cubra o gel com um plástico, para evitar evaporação; se a cuba já vier com tampa, este procedimento será desnecessário.



Figura 7. Drogarias e vidrarias utilizadas no preparo de gel de poliacrilamida.



Figura 8. Solução de acrilamida para gel de eletroforese de isoenzimas sendo vertida na placa.

Coloque a forma que contém o gel com as duas extremidades voltadas para o reservatório dos eletrodos, que deve conter a solução tampão escolhida. Os extratos são sempre colocados próximo ao anodo (-) que, convencionalmente, é preto. Estabeleça o contato entre a solução tampão do eletrodo e o gel, com ajuda de um tecido

poroso (Figura 9). Para assegurar o contato coloque uma placa de vidro sobre o conjunto.

Conekte os eletrodos com a fonte (Figura 10) e marque o tempo ou a distância da corrida. A migração eletroforética é interrompida quando o azul de bromofenol atingir de 7 a 10cm ou após 4 a 6 horas.



Figura 9. Ponte de contato entre o gel e uma solução-tampão, utilizando-se tecido poroso, durante uma corrida eletroforética.

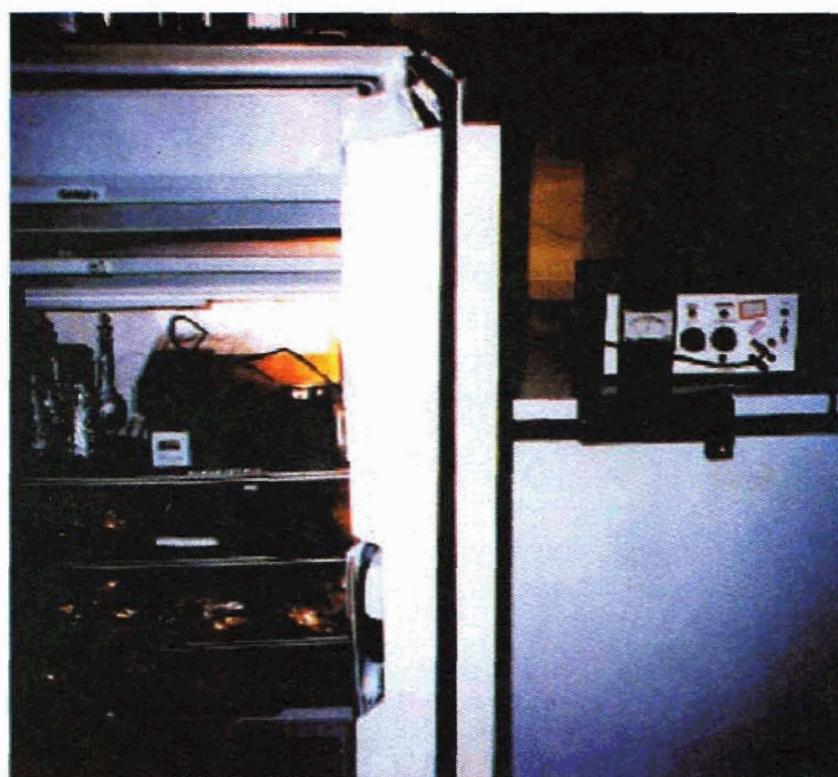


Figura 10. Corrida eletroforética de um gel em geladeira à baixa temperatura.

- Gel de amido

Este gel é feito pelo aquecimento da mistura de amido hidrolisado com uma solução-tampão, cuidadosamente preparada. A solução tampão usada no gel depende da solução tampão que é utilizada no eletrodo. Ao conjunto dessas duas soluções tampões costuma-se chamar "sistema-tampão para eletroforese". A escolha do melhor sistema é feita com base na tentativa e erro.

Para cada organismo ou espécie e para cada tecido da espécie, como na solução tampão de extração, vários sistemas devem ser testados, para se verificar a qual produz a melhor separação eletroforética da enzima que será estudada e a melhor combinação entre atividade e resolução.

Material necessário

- * 1 placa de vidro
- * 4 barras de acrílico
- * 1 kitasato de 1 litro
- * 1 bomba de vácuo (potente)
- * 1 aquecedor de bussen ou 1 forno de microondas
- * amido hidrolisado para eletroforese ou semelhante
- * tampão de gel
- * balança
- * fita crepe
- * luvas térmicas
- * rolhas

Os géis de amido são preparados, geralmente a 12% (13% no caso da penetrose). A mistura amido + solução tampão é levada ao fogo (ou forno de microondas) e agitada constantemente. Após a mistura polimerizar e se tornar transparente, deve-se agitá-la vigorosamente e aquecê-la até que esta entre em ebulição. Imediatamente, deve-se retirar as bolhas de ar com o auxílio de uma bomba de vácuo e verter o gel na forma montada com as barras de acrílico sobre a placa de vidro; esta placa deve ser nivelada no sentido horizontal. O amido adquire consistência sólida a medida em que esfria. A seguir coloca-se na geladeira para resfriar.

A aplicação da amostra no gel é feita cortando-se o gel a aproximadamente 2cm da extremidade; a secção mais estreita é afastada e os wicks aplicados a uma distância mínima de 2mm. É conveniente que o excesso de amostra contido no wick seja retirado com a ajuda de um papel absorvente; usa-se uma régua guia para

facilitar a aplicação das amostras, que deve ser feita em um único sentido (da direita para esquerda).

É conveniente colocar um controle ou padrão nas extremidades do gel; este padrão pode ser o extrato de outra população, sexo ou espécie, visando favorecer a comparação entre os diversos géis.

Assim, no gel o bromofenol é colocado na primeira e última amostra ou no primeiro e último espaço. Todo o processo anterior e posterior à aplicação da amostra é o mesmo utilizado no gel de acrilamida, exceto o fatiamento.

Após a eletroforese, o gel é colocado sobre o balcão, a distância percorrida pelo azul de bromofenol é medida e o gel é fatiado em várias camadas de cerca de 2mm de espessura com o auxílio de réguas e um pedaço de fio de nylon. Cada fatia será usada para revelar uma enzima e a fatia superior é normalmente desprezada.

12. CONFECÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE ZIMOGRAMA

Em geral, o tipo de informação que um pesquisador extrai do gel está relacionado à questão que ele quer responder. Os dados obtidos dependem da qualidade de todo o processo, desde a coleta adequada do tecido à eletroforese e coloração.

Se existe grande variação biológica e ambiental, um grande número de amostras é necessário para generalizar as conclusões.

A amostra coletada do material biológico que se quer estudar deve ser representativa o que geralmente envolve bom senso e delineamento experimental adequado. Sendo a amostra representativa, pergunta-se qual o grau de fidelidade das conclusões inferidas.

O objetivo de se marcar o resultado de uma corrida eletroforética é obter dados permanentes para referência e análise. A fotografia é um tipo de anotação, importante para referência e publicação, mas não reflete todas as informações

que podem ser extraídas do gel e não serve para análises estatísticas.

A forma mais simples de se analisar um dado consiste em se classificar os padrões de banda observados no gel; na Figura 11 observa-se um exemplo de como isto pode ser feito. Na fotografia (Figura 11a) há um gel de amido revelado para MDH de *Eucalyptus pilularis*. Pelos fenótipos encontrados, seis grupos podem ser formados (Figura 11b)

Este tipo de avaliação é útil para estimar a frequência gênica ou detectar indivíduos com um padrão diferente em um grupo de indivíduos; pode ser útil, por exemplo, para escolher parentais divergentes e monitorar a eficiência dos cruzamentos artificiais ou naturais.

Para atender a certos estudos, as anotações de um indivíduo podem ser tão complexas quanto um gráfico da densidade ótica que atravessa o gel. Assim, pode-se ter o número de bandas, suas posições relativas no gel e a contribuição fracional de cada uma para a quantidade total de enzimas no gel (área sob os segmentos da curva).

Em qualquer situação, antes do início do experimento deve-se definir da melhor maneira possível o que se quer medir e como isto será feito.

Em estudos genéticos mais detalhados, além da posição relativa da banda considera-se, também, a intensidade das mesmas; assim pode-se identificar os indivíduos em termos de fenótipos e genótipos. Desta forma, ainda se pode determinar a freqüência alélica e proceder vários estudos de segregação, de equilíbrio, de diversidade etc. (Figura 11c).

Na Figura 11a cada marca no gel corresponde a uma banda e o conjunto de bandas de um indivíduo, é um padrão (Figuras 11b e c). Alguns indivíduos apresentam o mesmo padrão.

Para se obter uma avaliação correta dos dados necessita-se conhecer algumas características das enzimas, como identificação, nomenclatura e número de subunidades.

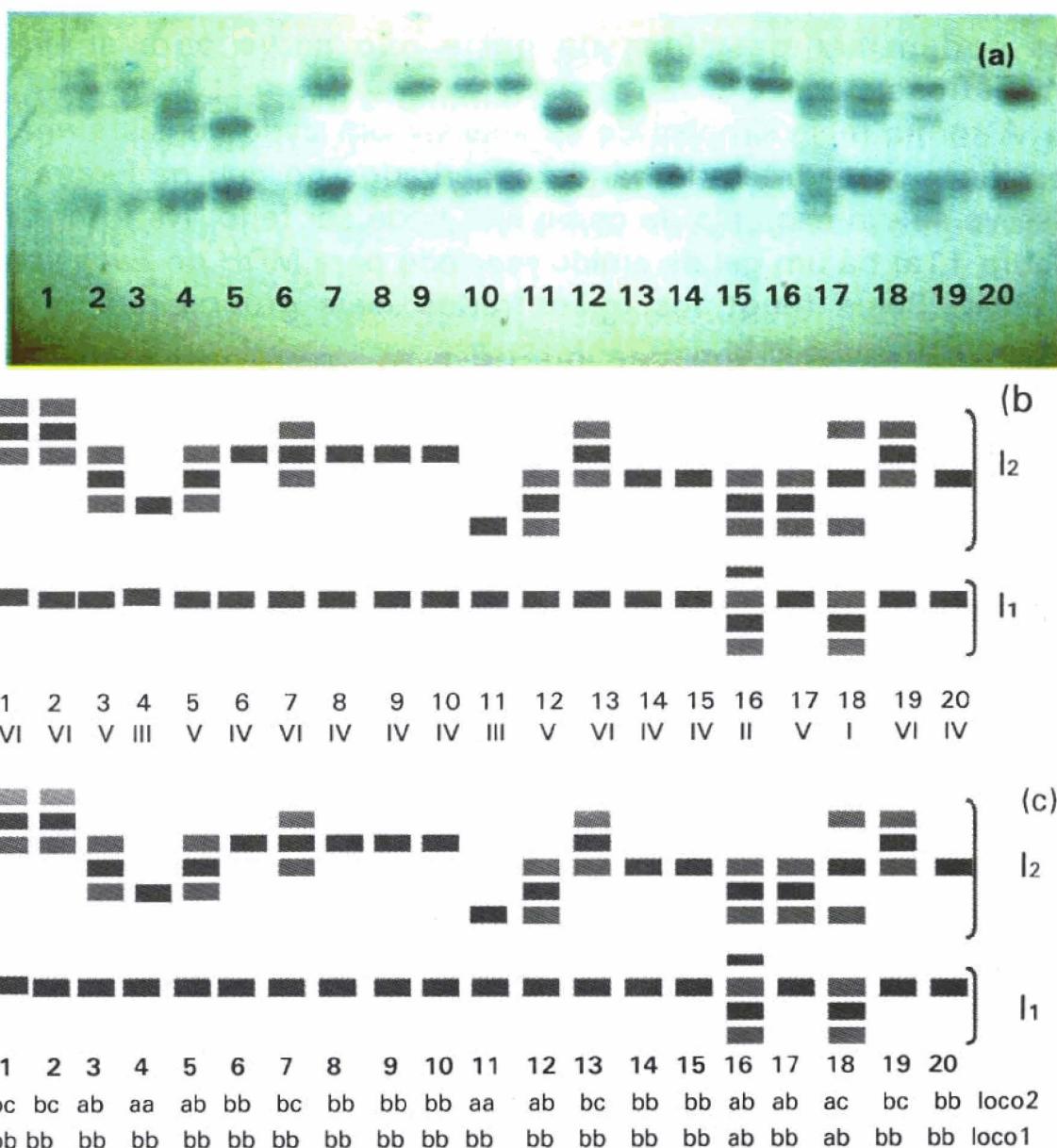


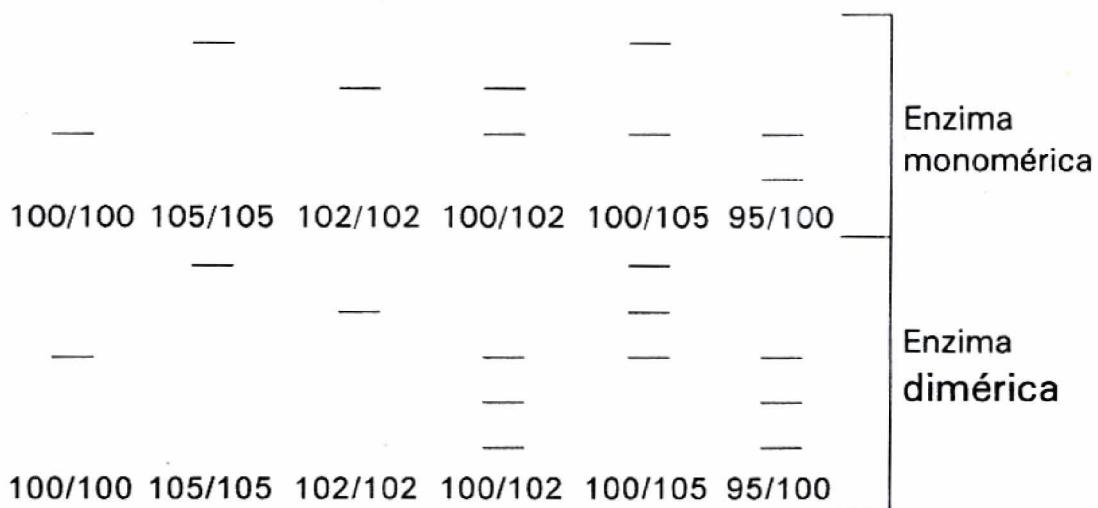
Figura 11. Fotografia de gel de *Eucalyptus pilularis* (a) e respectivo zimograma (b e c). Considerando-se os padrões de banda seis grupos podem ser formados (b), como: grupo I - indivíduo 18; grupo II - indivíduo 16; grupo III - indivíduos 4 e 11; grupo IV - indivíduos 6, 8, 9, 10, 14, 15 e 20; grupo V - 3, 5, 12 e 17 e grupo VI- 1, 2, 7, 13 e 19. Observa-se, em (c) a interpretação de loco, alelo, fenótipo e genótipo dada ao mesmo gel (a). A banda circulada no indivíduo 16 é banda inter-locus.

Nomenclatura

As enzimas são identificadas por códigos internacionais estabelecidos pela "Enzyme commission" (EC). Por exemplo Álcool Desidrogenase - código EC 1.1.1.1. Essa nomenclatura se aplica à enzima, sem discriminação das isoenzimas que formam o sistema ativo (Alfenas et al., 1991).

Na interpretação genética os dados são expressos, geralmente, em locos e alelos. Os locos são codificados pela sigla da enzima, grafada com letra inicial maiúscula e numerados de acordo com a ordem decrescente de mobilidade (Alfenas et al., 1991). Os alelos de cada loco podem ser designados por números, letras, pela sua posição no gel ou pela representação numérica de sua posição).

Um outro sistema bastante usado, segundo Hutchinson et al., 1983: é o que utiliza o código 100 para o alelo mais freqüente em cada loco. Os demais alelos são codificados de acordo com sua posição em relação à banda 100. Veja no exemplo abaixo:



Nos estudos mais detalhados as isoenzimas são diferenciadas pelos seus valores de mobilidade relativa e, às

vezes, também pela largura e intensidade da banda (Alfenas et al., 1991).

A mobilidade relativa (R_f) tanto pode ser calculada com base em um padrão enzimático, como em relação a um corante, sendo o azul de bromofenol, o mais utilizado.

A mobilidade relativa é dada por:

$$R_f = \frac{d}{D} \times 100$$

onde: d é a distância percorrida pela enzima e D é a distância percorrida pela linha frontal do azul de bromofenol ou do padrão.

De posse desses R_f s pode-se, então, analisar o gel, em termos de fenótipos e genótipos.

Para se analisar os genótipos é necessário, contudo, conhecer o comportamento fenotípico da enzima, segundo o número de subunidades.

Observou-se, anteriormente, que a enzima é formada de uma ou mais cadeias polipeptídicas. Verificando-se as bandas de um gel, deve-se considerar o número de subunidades (cadeias) que formam a enzima que se cora (Figura 12). Se a enzima é formada por uma cadeia, o alelo irá mostrar duas bandas, uma correspondente ao alelo a e outra ao homozigoto b. Este é o caso de leucina amino peptidase, xiquimato desidrogenase, peroxidase e outras. Sendo a enzima formada de duas cadeias, os dois tipos de polipeptídeos produzidos pelo heterozigoto ligam-se ao acaso e produzem três tipos de molécula; dois homodímeros e um heterodímero, que é uma nova molécula híbrida. Após a eletroforese, o heterozigoto mostra três bandas, sendo a banda intermediária, correspondente ao heterodímero, freqüentemente de cor mais intensa que as outras duas. Se a cadeia polipeptídica produzida pelos dois alelos realmente se liga ao acaso, metade das moléculas de enzima serão heterodímeros e a cada tipo de homodímero corresponderá $\frac{1}{4}$ (Figura 12). Este tipo de heterozigoto, com três bandas regularmente espaçadas, é muito comum, particularmente no caso das

desidrogenases. Se a enzima é feita de três cadeias, os dois tipos de cadeia polipeptídica produzidas pelo heterozigoto ligam-se ao acaso e produzem quatro tipos de molécula, sendo dois homotriméros e dois heterotriméros. O heterozigoto irá formar quatro bandas no gel (Figura 12). Este tipo de padrão é raro, porém é encontrado em nucleosídeo fosforilases. Quando a enzima é composta de quatro cadeias, os dois tipos de cadeia polipeptídicas irão produzir, por ligação ao acaso, cinco tipos de molécula. O zimograma do heterozigoto irá mostrar cinco bandas regularmente espaçadas. Geralmente, a intensidade da coloração decresce da banda central para as extremidades (Figura 12).

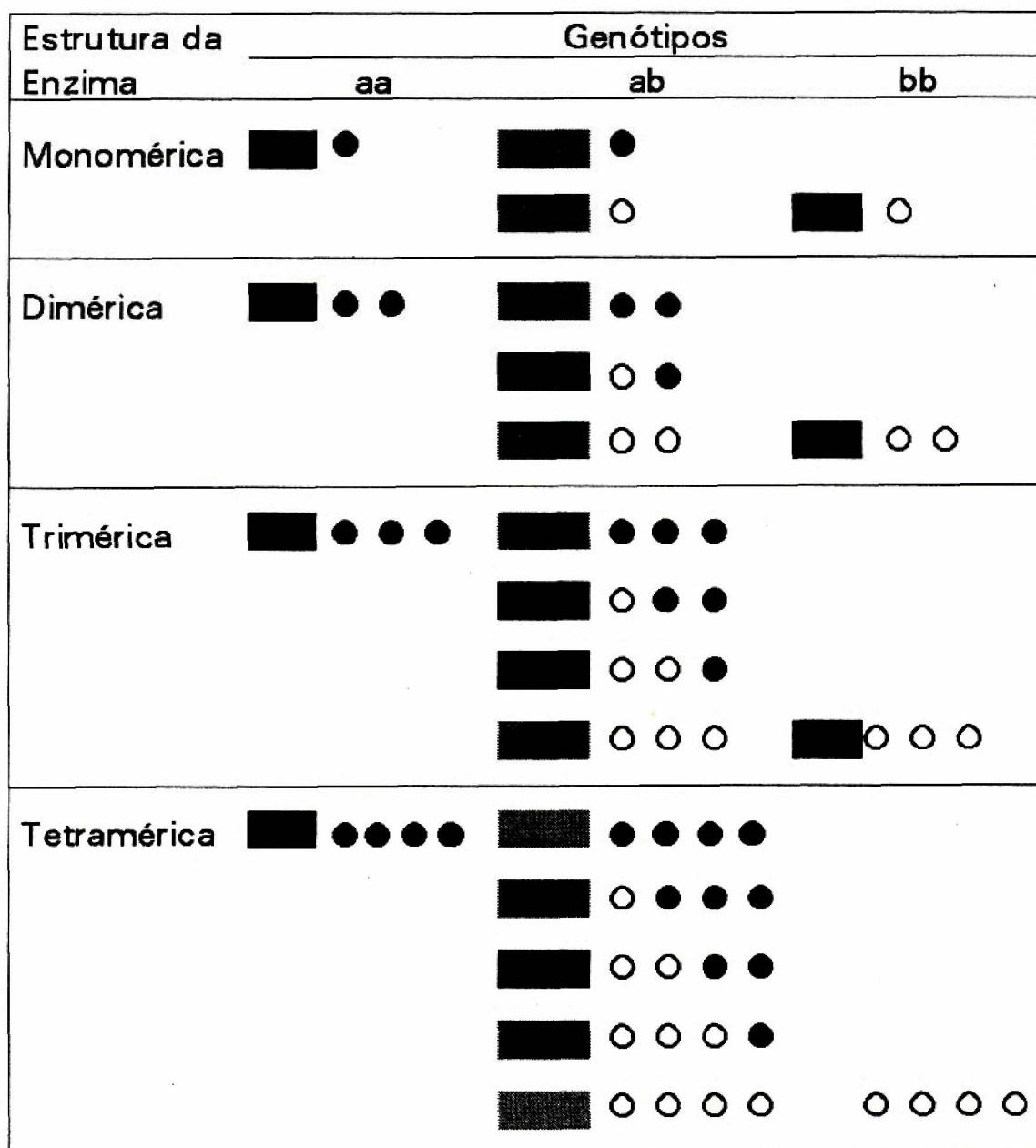


Figura 12. Representação esquemática de um zimograma formado por isoenzimas segundo o número de sub-unidades.

O = 1 cadeia polipeptídica

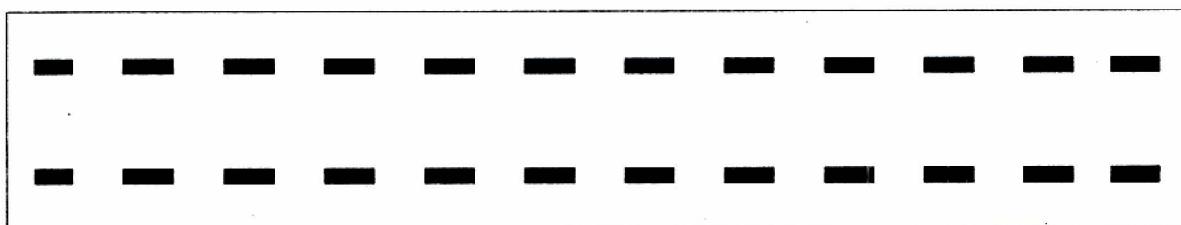
= banda no gel

É importante ressaltar que o fato de um heterozigoto mostrar três ou cinco bandas, não quer dizer necessariamente que a enzima em questão tem duas ou três cadeias na estrutura quaternária, nem todos os heteropolímeros possíveis são formados, principalmente se a estrutura for assimétrica. Ao se observar três bandas no gel pode-se concluir que a enzima em questão tem "pelo menos" duas cadeias polipeptídicas.

Portanto, conhecendo-se de antemão o número de subunidades que compõem a enzima, fica mais fácil dar uma interpretação segura do gel, o que não é verdadeiro para zimogramas de maior complexidade, tornando-se difícil provar e, na maioria dos casos, sendo possível apenas com teste de progênie.

Exemplo:

Malato desidrogenase é uma enzima normalmente dimérica, na maioria dos organismos. O heterozigoto revela três bandas, porém num estudo com sapo (*Bufo lateristrigatus*) citado por Pasteur et al., 1988, obteve-se o seguinte zimograma.



Neste caso, existem três hipóteses para a interpretação do gel:

- 1) Cada isoenzima corresponde à expressão de um gene distinto e por isso a expressão de dois locos diferentes. Cada gene é homozigoto para o mesmo alelo em todas as amostras estudadas.

- 2) As duas isoenzimas correspondem ao produto do mesmo alelo, cada um tendo uma conformação molecular particular, produzida por modificações pós-translacional.
- 3) As duas isoenzimas correspondem ao produto de dois alelos no mesmo gene. Neste caso, todos os indivíduos estudados serão heterozigotos para os mesmos dois alelos. Esta é a hipótese menos provável, porque: 1º) de acordo com a lei de Hardy-Weinberg, um gene com dois alelos será heterozigoto em pelo menos 50% da população (exceto populações compostas por indivíduos partenogenéticos com heterozigosidade fixada) 2º) em todos os organismos estudados, tanto do reino animal quanto vegetal, indivíduos heterozigotos para os genes que codificam para MDH produzem proteínas de dois tipos de cadeia (três bandas regularmente espaçadas). Para descartar esta hipótese, usam-se: a) dados de genética de populações e b) estudos prévios de MDH, com outras populações e outras espécies.

Se não se dispõe de outros dados, além dos obtidos no zimograma, não seria possível decidir qual a hipótese correta (1 ou 2). Neste caso, deve-se amostrar mais indivíduos desta população e de populações diferentes ou proceder o teste de progênie. Em ensaios subseqüentes os autores viram que realmente se trata de dois locos codificados por esta enzima.

Em outros casos, encontram-se situações em que cada indivíduo tem duas isoenzimas; uma é corada fortemente e a outra é levemente corada. As mesmas três hipóteses formuladas para MDH, no exemplo anterior, podem explicar este resultado. Na Figura 13, duas isoenzimas monoméricas estão presentes; indivíduos homozigotos e heterozigotos estão sempre acompanhados de uma banda, a uma mesma distância, de intensidade menor porém, observando-se um número grande de indivíduos e comparando-os a outras espécies do mesmo grupo taxonômico, pode-se ver que a variação na mobilidade dessas enzimas

está sempre ligada a outra banda. Conclui-se então, que no exemplo a enzima é monomérica codificada por um único gene (2 alelos do mesmo loco). Estas bandas secundárias também são chamadas de artefatos, quando não surgem ligadas e, sim, esporadicamente.

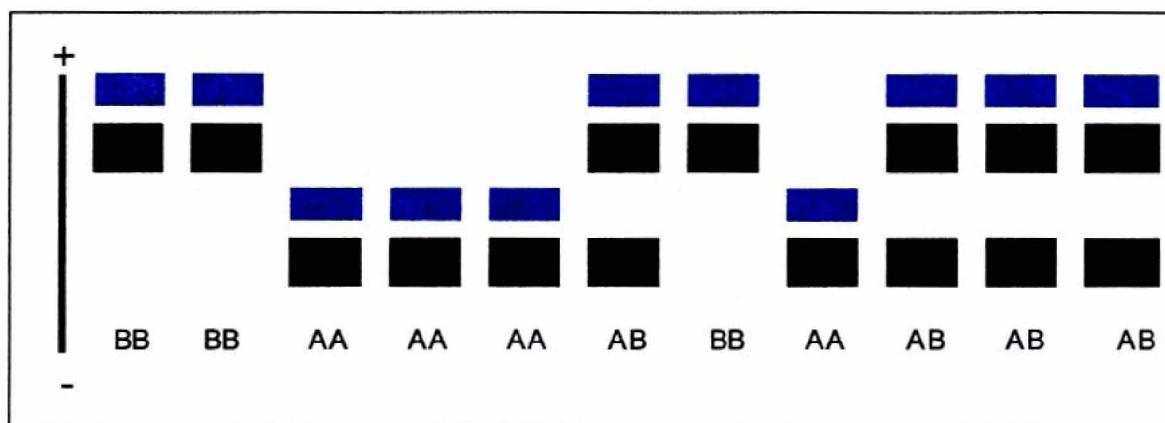


Figura 13. Representação esquemática de um zimograma onde bandas secundárias estão sempre ligadas a outras bandas. No exemplo, a enzima é monomérica.

Em situações mais complexas observa-se a formação de bandas inter-locos. Em um zimograma de uma enzima dimérica, Figura 14, as bandas formadas na região central são bandas inter-locos e estão em posição intermediária entre o 1º e o 2º loco. Para facilitar a compreensão encontra-se, ao lado do zimograma, a interpretação molecular, em termos de tipo de peptídeo, dada ao zimograma. Na Figura 11, no indivíduo 16 também se observa uma banda inter-locos.

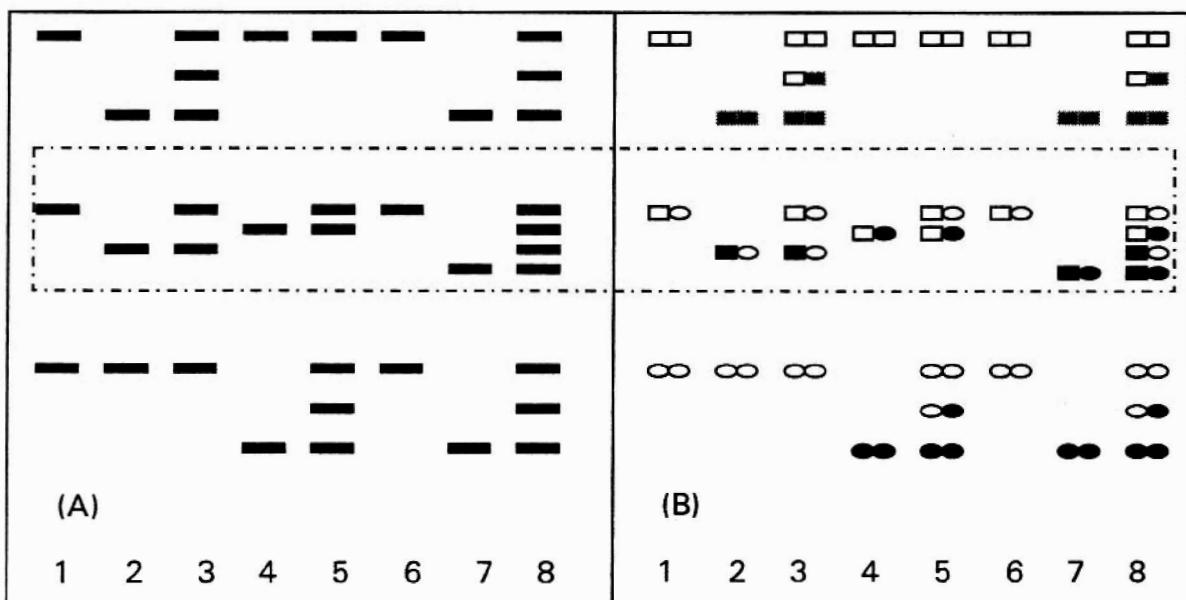


Figura 14. Padrões eletroforéticos de uma enzima dimérica (A) e respectiva representação molecular (B), onde se observa a formação de bandas inter-locos (delimitadas pela linha tracejada). Adaptado de Pasteur et al., 1988.

Em raros casos, alguns genes estruturais possuem alelos que não geram produtos e podem ser detectados por eletroforese. Esses alelos são tidos como “silenciosos” ou “nulos” e, com uma exceção, eles são recessivos. Os heterozigotos têm um alelo nulo N e um alelo ativo A (indivíduo NA) e mostram o mesmo fenótipo eletroforético que o homozigoto AA; o homozigoto NN não apresenta nenhuma banda após eletroforese (Figura 15).

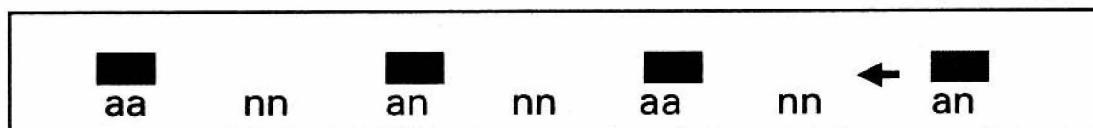


Figura 15. Padrões eletroforéticos apresentados por enzima monomérica, exibindo a presença de alelos nulos.

Problemas importantes surgem da presença de alelos nulos. Se eles têm uma baixa freqüência, não haverá nenhum homozigoto “nulo” no tamanho da amostra normalmente usada por geneticistas (de uma a poucas dezenas de indivíduos).

Se um heterozigoto AN mostra bandas menos intensas, como a banda mais à direita da Figura 15, que o homozigoto AA, que possui duas doses do gene ativo, isto provavelmente será devido ao erro experimental (concentração de extração diferente, desnaturação parcial de alguns extratos, provável heterogeneidade do gel); além do mais, os heterozigotos são geralmente pouco diferentes para serem distinguidos.

Na maioria dos casos, só um teste de progénie pode confirmar a presença de alelo nulo.

Alelos nulos são comuns em genes que codificam para esterases. Em *Drosophila*, surgem em álcool desidrogenase, e em genética humana clássica em fosfato desidrogenase. A ausência de uma reação característica é devida à mutação que tornou a proteína inativa ou preveniu sua síntese em uma ou outra rota.

Para grandes organismos podem ser identificados por imunoelétroforese, ou seja, o processo que envolve a purificação de substâncias a serem testadas e uma grande quantidade de anticorpos relevantes.

- Problemas gerais

A interpretação de géis de organismos que nunca foram previamente estudados é sempre uma especulação (um jogo de azar) e o sucesso não pode ser garantido no início.

Uma interpretação satisfatória deve ser compatível com os dados existentes para o organismo estudado e para as enzimas consideradas. Esses fatores irão permitir uma interpretação correta, quando os indivíduos não podem ser cruzados para testar as hipóteses menos prováveis, existindo muitos métodos indiretos que permitem a tomada de decisão.

a) Dados dos organismos que serão estudados.

Nos exemplos apresentados os organismos considerados eram todos diplóides, cada gene presente em duas cópias. Um organismo haplóide tem uma cópia de cada gene: qualquer hipótese que envolva a existência de um heterozigoto, coloca em questão, obviamente a natureza haplóide do genoma. Triplóides ou tetraplóides podem ter, respectivamente, três ou quatro alelos diferentes; qualitativamente, fenótipos similares serão observados, mas eles irão mostrar variação na intensidade de bandas. Estes casos são comuns em plantas (poliplóides) e raros em animais.

A variação de fenótipos observados depende, parcialmente, do modo de reprodução. Organismos de reprodução assexuada, juntamente com aqueles estritamente auto-fecundados, ou que se reproduzem por partenocarpia, formam clones idênticos. O fluxo gênico, em clones, é ausente ou reduzido: então, a tendência é o monomorfismo.

b) Dados dos sistemas enzimáticos que se quer estudar

3^a - Os genes enzimáticos que estão sendo estudados são funcionais em todos os tecidos dos organismos?

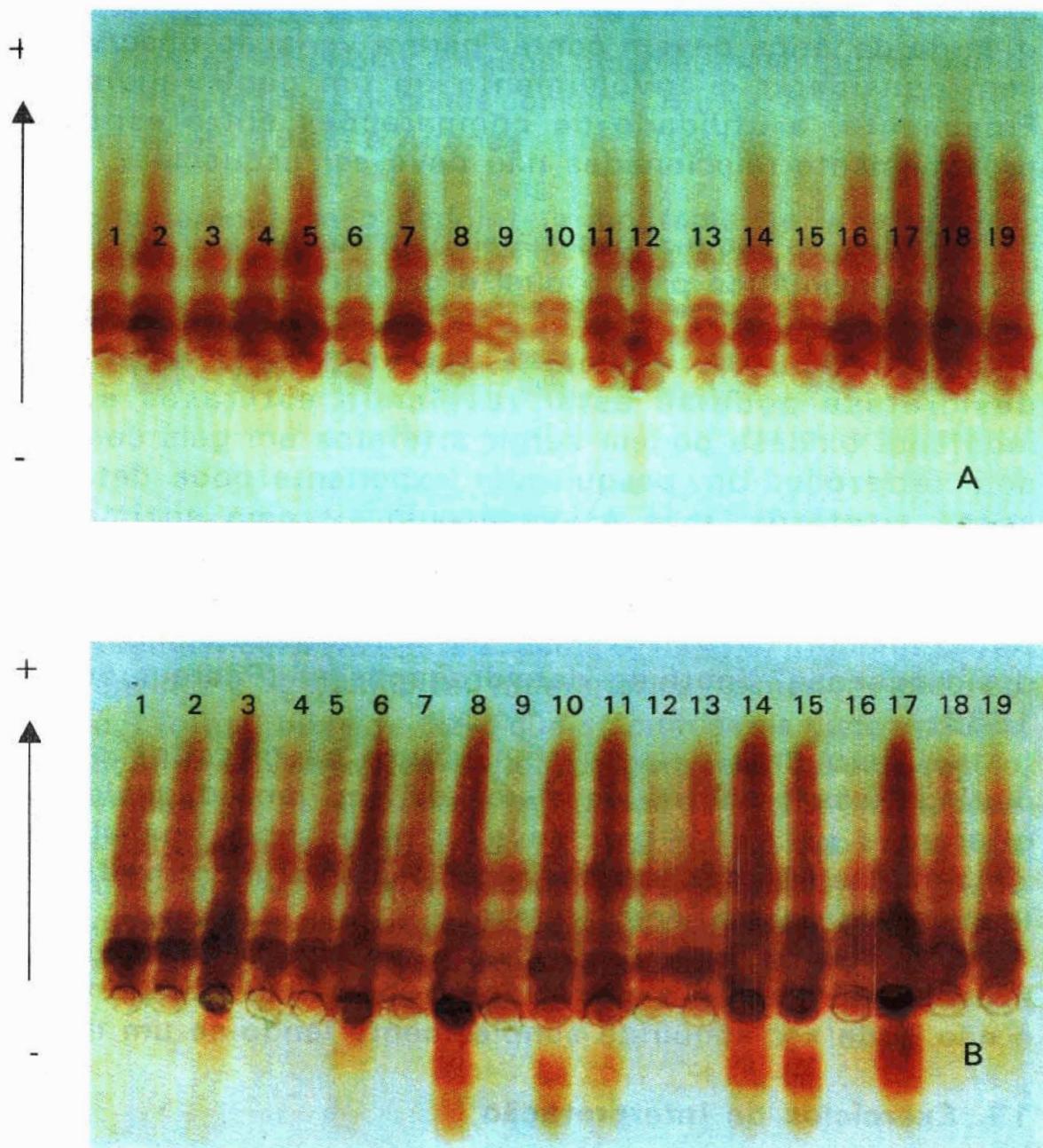


Figura 16. Padrão de peroxidase em raiz, obtido em genótipos de amendoim cultivado (A) em condições normais e (B) em regime de 15 dias de estresse hídrico.

As células se diferenciam cedo na embriogênese; tornando-se especializadas elas perdem a capacidade de expressar parte de seu genoma. Diferenças de idade, sexo e carga genética devem contar para a variação observada, sem considerar o envolvimento de um gene regulador. Finalmente, a utilidade de comparações entre espécies proximamente relacionadas não deve ser esquecida.

4^a - Todas as isoenzimas reveladas no gel são parte do sistema enzimático para o qual o gel foi corado?

Entre outros exemplos, ao se revelar carbonato desidratase pode-se estar revelando esterases e, em indofenol oxidase podem surgir artefatos em géis corados com tetrazólio. Um pesquisador experiente pode detectar esses artefatos, mas às vezes um sistema enzimático indefinido é revelado e pode ser interpretado geneticamente e, depois, ser usado pelo geneticista. Para quem quer um termo melhor, esses sistemas são conhecidos como "nada desidrogenase" (nothing dehydrogenases) (Pasteur et al., 1988).

Como uma palavra final sobre os métodos de se distinguir os produtos de alelos de um gene daqueles de diferentes genes no gel, deve-se reconhecer que alguns zimogramas irão permanecer geneticamente ininterpretáveis (comum de ocorrer em esterases).

A certeza da interpretação genética é difícil de se explicar e estimar. A experiência tem papel muito importante e não pode ser adquirida simplesmente lendo-se um livro.

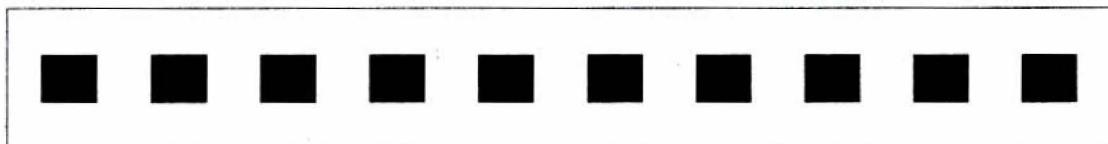
13. Exercícios de Interpretação

Inicia-se esta seção com zimogramas mais simples, seguindo-se com os mais complexos. Para nomear locos e alelos e compará-los entre vários géis é preciso, primeiro,

confeccionar zimogramas a partir dos valores de mobilidade relativa ($R_f = \frac{d}{D} \times 100$).

Para os exemplos citados duas nomenclaturas serão usadas. Para maiores detalhes consultar Brewer & Sing (1980), Pasteur et al. (1988) e Alfenas et al. (1991).

- 1) Considerando-se o seguinte zimograma de uma enzima qualquer:



Qual a interpretação que seria dada?

É preciso considerar, primeiro, se este tipo de zimograma (todos iguais) convém nesta espécie e, depois, procurar saber se a enzima é, geralmente, monomérica, dimérica, etc. De qualquer forma, pode-se dizer que só com estes dados não se pode admitir nenhuma nomenclatura, porque só há uma região de atividade; se, porém, já existem dados de outras populações e se sabe, que para esta enzima só existe um loco, então se pode dizer que se tem um loco monomórfico para este alelo. Isto corresponde a observância das questões citadas em a e b das páginas 79 a 82.

2) Pode-se observar agora, o caso de um loco polimórfico de uma enzima monomérica com dois alelos.

-										
+	1	1	2	3	2	2	3	3	1	3
	aa	aa	ab	bb	ab	ab	bb	bb	aa	bb
	95/95	95/95	95/100	100/100	95/100	95/100	100/100	100/100	95/95	100/100

Como se tem um loco, não seria preciso numerá-lo, mas é preciso se estabelecer bem os Rfs para que se possa identificar, o nº e a posição dos alelos.

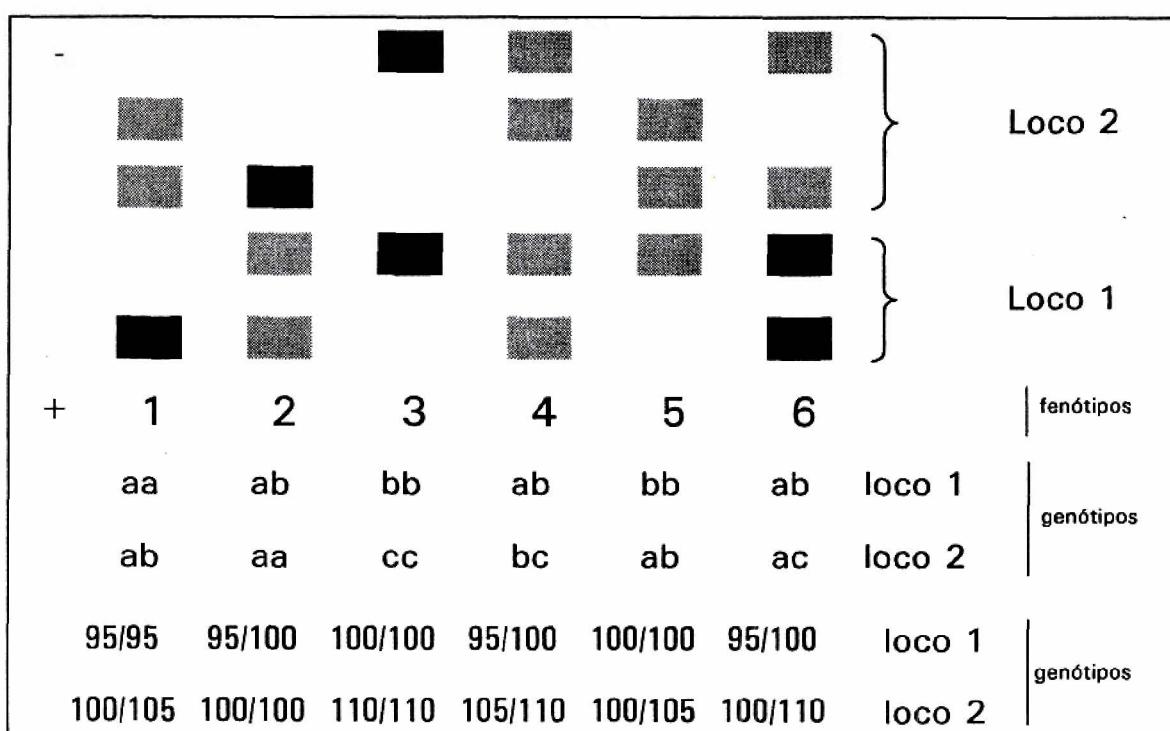
3) Se a enzima anterior for dimérica, ter-se-á o mesmo padrão para os homozigotos (aa e bb) mas os heterozigotos seriam diferentes, porque apresentariam três bandas e não duas.

-										
+	1	1	2	3	2	2	3	3	1	3
	aa	aa	ab	bb	ab	ab	bb	bb	aa	bb
	95/95	95/95	95/100	100/100	95/100	95/100	100/100	100/100	95/95	100/100

Observa-se que o número de fenótipos e genótipos é o mesmo do exemplo do item anterior, mudando apenas o padrão de bandas apresentado pelos indivíduos heterozigotos, que é

agora de três bandas, sendo a do centro mais escura. Este é o padrão típico de uma enzima dimérica.

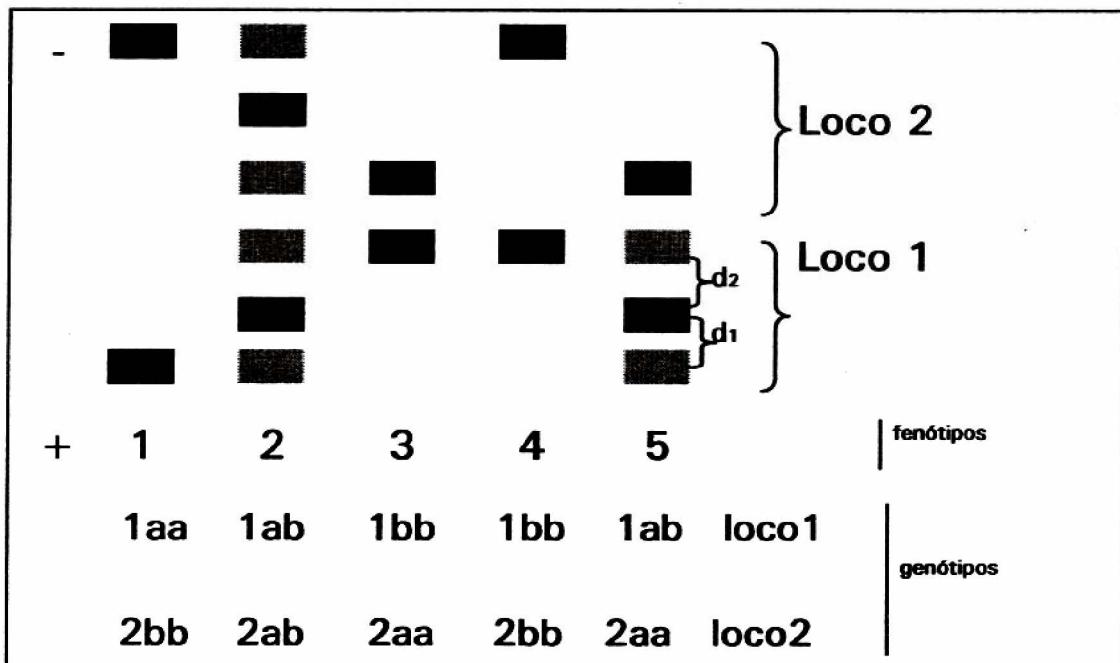
- 4) Considerar, neste caso, dois locos de uma enzima monomérica; o loco um com dois alelos e, o loco dois com três alelos.



Lembre-se que o loco 1 é aquele que migrou mais rapidamente, então é muito importante se estabelecer em um zimograma onde está a origem ou os pólos negativos e positivo. Também é importante notar se a migração ocorreu na direção do ânodo ou do catodo. A peroxidase, por exemplo é uma enzima que tem alelomorfos que migram nas duas direções (Figura 16).

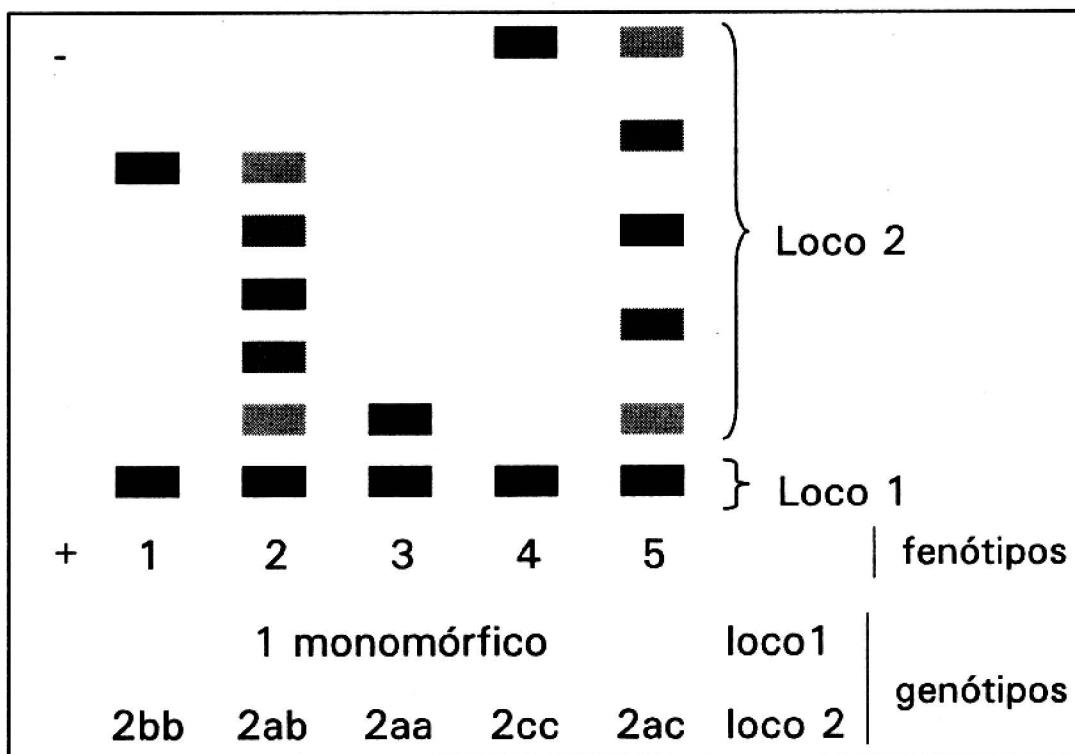
Os exemplos a seguir são adaptados de Alfenas et al. (1991). Para simplificar, colocou-se apenas o zimograma e a respectiva interpretação alélica.

5) Na figura abaixo, há dois locos com dois alelos, e migração não intermediária no heterodímero do loco um.

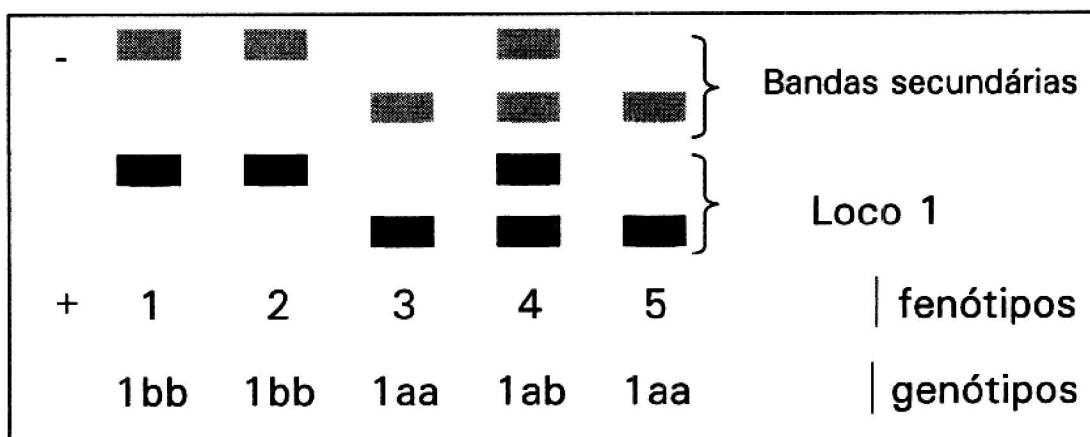


Observe que não há uma simetria entre as distâncias d_1 e d_2 com relação à banda central, no loco 1.

- 6) Na figura seguinte, há dois locos, sendo um monomórfico e outro com três alelos: enzima tetramérica.

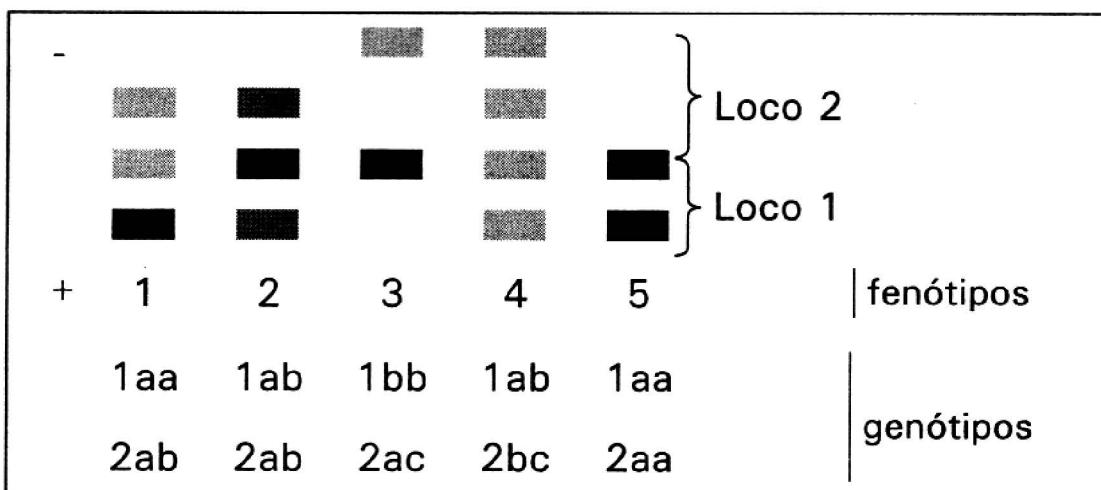


- 7) Neste caso, há um loco com dois alelos e bandas secundárias causadas por modificações pós-transcrição, de uma enzima monomérica



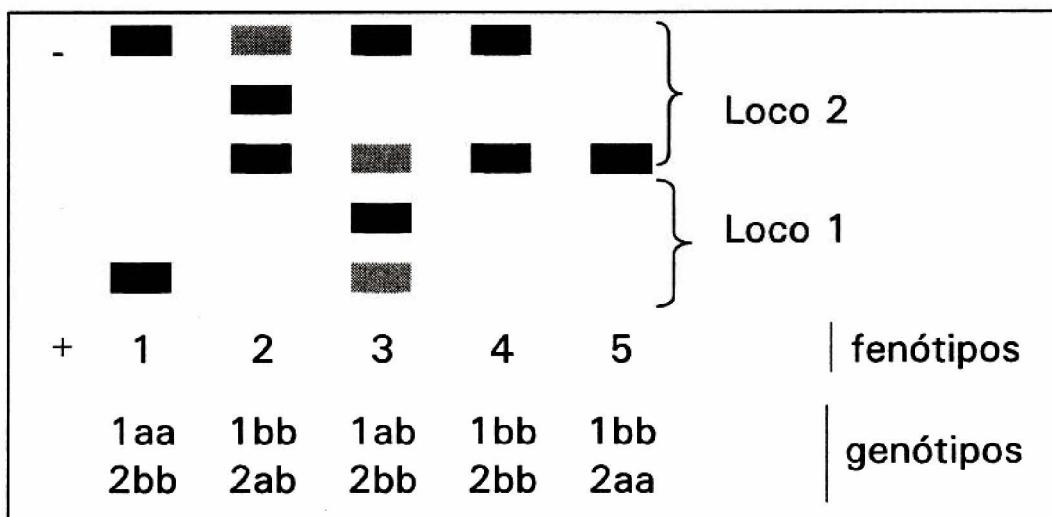
Observar que as bandas superiores são como “sombras” das bandas inferiores e todos os indivíduos analisados as apresentam. Isto é o que as diferem de um artefato.

- 8) Na próxima figura, há dois locos: o loco um com dois alelos e o loco dois com três alelos; a enzima é monomérica, apresentando sobreposição de bandas.



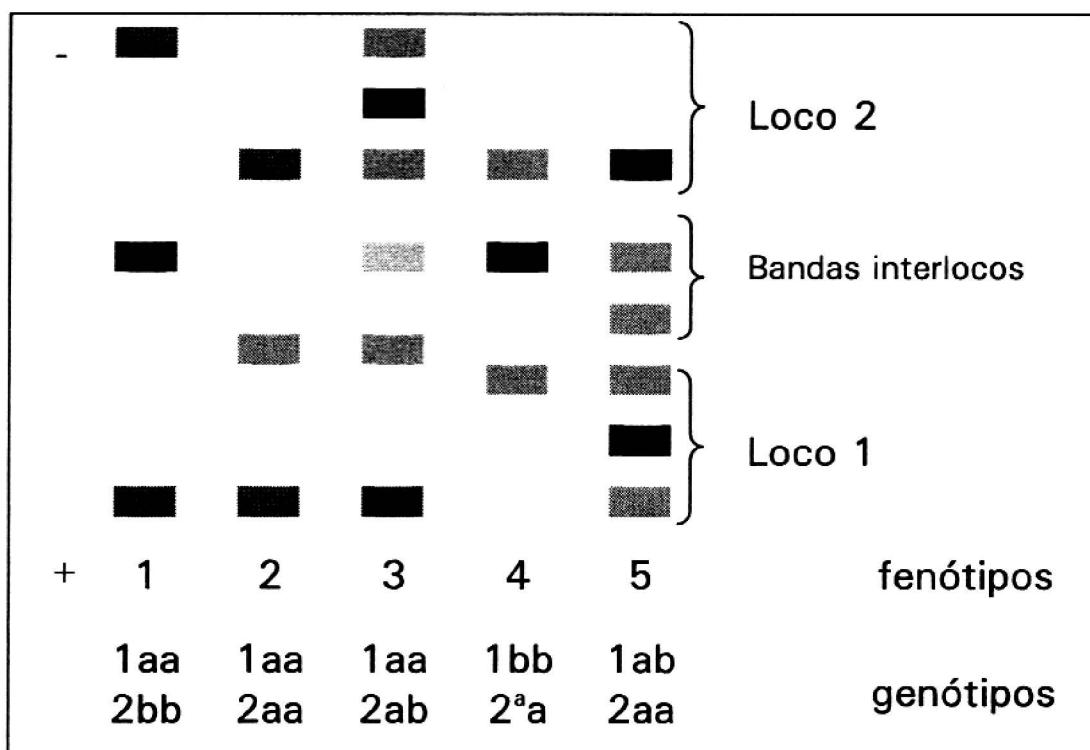
É importante observar a diferença de intensidade nas bandas, sobretudo nos genótipos 1 e 2, para poder atribuir genótipos.

- 9) Nesta figura, há dois locos, ambos com dois alelos, enzima dimérica; sobreposição de bandas.



Observar que o alelo b do loco um se sobrepõe ao alelo a do loco dois. Neste caso, identifica-se a sobreposição porque verifica-se primeiro o nº de subunidades da enzima, segundo a posição e intensidade de coloração das bandas.

- 10) Na Figura abaixo, há 2 locos com 2 alelos cada um, e a formação de heterodímeros e entre subunidades controladas por locos diferentes.



Para estudo mais detalhado sugere-se consultar Alfenas et al. (1991) e Nóbrega (1995). Nestas publicações há outros exemplos de zimogramas complexos, aos quais foi dada interpretação.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALFENAS, A .C. ed. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: UFV, 1991. 242p.

- ASQUITH, R.S. **Chemistry of natural protein fiber.** New York: Plenum, 1977. 409p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa: Ed. Universitária da UFV, 1997.
- BREWER, G.J.; SING, C.F. **An Introduction to isozyme techniques.** New York: Academic Press, 1970. 186p.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R. **The use of isoenzyme in plant genetics and breeding.** Amsterdã: Elsevier, 1983. p.401-411.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. **Techniques for starch gel electrophoresis of enzyme from forest tree species.** [S.I.]: Patawawa National Forest Institute, 1984. 49p. (Canadian Forestry Service information. Report PI-X-42).
- CONKLE, M.T.; HODGKISS, P.D.; NUNNALLY, F.B.; HUNTER, S.C. **Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual.** [S.I.]: USDA, 1982. 18p.
- CONN, E.E.; STUMPH, P.K. **Introdução à bioquímica** 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1990.
- FERREIRA, A.B. de H. **Novo dicionário da língua portuguesa.** 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1838p.
- FALCÃO, T.M.M. de A. **Polimorfismo protéico em populações naturais de abelhas brasileiras.** Ribeirão Preto: USP/Faculdade de Medicina, 1984. 231p. Tese de Doutoramento.
- GARDNER, E.J.; SNUSTAD, D.P. **Genética.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

HUBBY, J.; LEWONTIN, R.C. A Molecular approach to the study of genetics heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles of different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v.54, p.577-594, 1966.

HUTCHINSON, E.S.; HAKIM-ELANI, A.; MILLER, R.D.; ALLARD, R.W. The genetics of the diploidized tetraploid *Avena barbata*. **The Journal of Heredity**, v.74, p.325-330, 1983.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1990. 232p.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: HOELZEL, A.R. ed. **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. Oxford: University Press, 1992. p.1-27.

McMILLIN, D.E. Plant isozymes: a historical perspective. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. 516p.

MEDINA FILHO, H.P. **Eletroforese em gel de amido; Aplicação em genética e melhoramento de plantas**. Campinas: IAC, 1983. 15p. (IAC. Circular, 121).

MOORE, G.A.; COLLINS, G.B. New Challenges confronting plant breeders. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. 516p.

NEALE, D.B.; WEBER, J.C.; ADAMS, W.T. Inheritance of needle tissue isozymes in Douglas fir. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v. 26, p.459-68, 1984.

NÓBREGA, M.B.M. **Análise de isoenzimas em doze espécies de Eucalyptus**. Viçosa: UFV, 1995. 35p. Tese de Mestrado.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, F.; BRITTON-DAVIDIAN, J.; COBB, M. **Practical isozyme genetics.** New York: John Wiley, 1988. 215p.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária.** 2. ed. São Paulo: Globo, 1990.

SANTOS, R.C. dos. **Investigação genético-bioquímica de cultivares de feijão resistentes e suscetíveis à antracnose.** Recife: UFRPE, 1989. 89p. Tese de Mestrado.

SCANDALIOS, J.G. Tissue-specific isozyme variations in maize. **The Journal of Heredity**, v.55, n.6, p.281-285, 1969.

SCHAUM, D.; ROSENBERG, J.L. **Química geral.** 2.ed. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1975. 372p.

VALLEJOS, C.E. Enzyme Activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. eds. **Isozymes in plant genetics and breeding.** Part A. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. 516p.

15. ANEXOS

Anexo I

Alguns protocolos para o preparo das soluções-tampão e estoque¹

Tampão de extração

Solução de NaCl 0,15M - pH 7,1

Tampão A (Lítio-borato, 1M, pH 8,3)

Hidróxido de lítio (LiOH)	-	4,028g
Ácido bórico (H_3BO_3) 0,1922M	-	23,780g
Água destilada	-	2000ml

Tampão B (Tris-cítrico, pH 8,3; 0,051M)

Tris-base 0,051M	-	6,200g
Ácido cítrico 0,0076M	-	1,460g
Água destilada	-	1000ml

Tampão C (Tampão fosfato, pH 4,3; 0,2M)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	27,60g
Água destilada	-	1000ml

Tampão D (Tampão fosfato, pH 9,2; 0,2M)

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	-	53,63g
Água destilada	-	1000ml

Tampão E (Tampão acetato; 0,05M)

Acetato de sódio 3. H_2O	-	6,8g
HCl (1 N)	-	14,8ml

¹ Para os cálculos, não esquecer de considerar os dados existentes no rótulo dos produtos, principalmente o peso molecular de cada um.

Água destilada - 1000ml

Tampão F Tampão acetato, para peroxidase, pH 5,0; 0,2M)

Acetato de sódio . 3H₂O - 27,22g
 Água destilada - 1000ml

Gel de poliacrilamida

A concentração descrita é de 7%; o volume final pode ser ajustado pelo operador para o tamanho da placa do gel de que o mesmo dispõe, desde que mantenha a mesma concentração.

Acrilamida	-	9,975g
Bis-acrilamida	-	0,525g
Peróxido de Sulfato de amônia (10%)	-	1,5ml
Tetrametiletilenodiamida (TEMED)	-	0,16ml
Tampão A	-	15ml
Tampão B	-	135ml

Procedimento

Em um bêquer de 250ml coloca-se o acrilamida e o bis-acrilamida e, aos poucos, verte-se as soluções-tampão A e B, misturadas anteriormente, para o bêquer, até dissolver os produtos, acrescentando-se o peróxido de sulfato de amônia, que deve ser preparado na hora. Finalmente, coloca-se o TEMED, que irá acelerar a reação de polimerização e, imediatamente, verte-se a solução sobre as placas.

Esta quantidade é suficiente para quatro placas de 12cm x 10cm. Trinta minutos após a polimerização, colocam-se as amostras sobre o gel, o que pode ser feito com auxílio de uma régua ou um "pente". As amostras devem ser colocadas em contato com o gel através de pequenos pedaços de papel de filtro Whatman (Wicks); é importante que os 'Wicks' sejam do

mesmo tamanho para que a quantidade de extrato seja uniforme para todas as amostras.

Revelação dos sistemas protéicos e enzimáticos

Proteínas Totais (PT)

Azul brilhante de Coomassie	-	1,25g
Água destilada	-	227ml
Metanol	-	227ml
Ácido acético	-	46ml

Procedimento

Dissolve-se o Azul de Coomassie, aos poucos, na solução descrita acima; quando o corante estiver dissolvido, faz-se uma filtragem da solução com papel Whatman Nº 1; a seguir, verte-se cerca de 200ml dessa solução sobre o gel e incuba-se a 36°C; geralmente, a visualização das bandas demora mais de 6 horas e o gel fica azulado devido à presença do corante. É necessário que se proceda a várias lavagens para descoloração do mesmo; depois, faz-se a fixação do gel para posterior análise.

Solução de descoloração

Metanol	-	100ml
Ácido acético	-	150ml
Água destilada	-	875ml

Solução de fixação (Alfenas, et al., 1991)

Metanol	-	45ml
Ácido acético	-	10ml
Água destilada	-	45ml

Esterase (Scandalios, 1969) (EST)

Fast blue RR salt	-	0,02g
α - naftil acetato	-	1,5ml
β - naftil acetato	-	1,5ml
Tampão C	-	25ml
Tampão D	-	5ml
Água destilada	-	20ml

Procedimento

Misturam-se as soluções-tampão C e D. Dissolve-se, aos poucos, o fast blue na solução (C e D); coloca-se a água e, por fim, o α e β naftil acetato. Esses últimos devem ser preparados isoladamente a 1% em acetona e água (50% : 50%). Esta quantidade de produtos é suficiente para um gel de 12cm x 10cm. Incuba-se o gel a 36°C até o aparecimento das bandas, que se revelam na cor marrom escuro.

Fosfatase ácida (ACP)

Tampão E	-	100ml
Fast Garnet GBC salt	-	0,1g
$MgCl_2$ (1%)	-	1,0ml
α - naftil fosfato ácido de sódio	-	0,1g

Procedimento

Dissolve-se o Fast Garnet na solução tampão; coloca-se o cloreto de magnésio e, por fim, o α naftil fosfato ácido de sódio. Incuba-se a 36°C até a visualização das bandas, que se revelam com coloração marrom escuro, em um fundo alaranjado do gel.

Leucina aminopeptidase (Alfenas, et al., 1991)

L-leucina-β-naftilamida	-	20mg
Dimetilformamida (DMF)	-	5ml
Fast Garnet GBC Salt	-	50mg
Tampão Fosfato de potássio 0,1M, pH 6,0	-	100ml

Procedimento

Dissolve-se o substrato no DMF e o Fast Garnet na solução-tampão; a seguir, misturam-se ambas as soluções. O gel revela-se alaranjado, com zonas um pouco mais escuras ou azuladas.

Peroxidase

Orto-dianisidina	-	0,1g
Etanol (95%)	-	70ml
Tampão acetato pH 5,0 - 0,2M	-	28ml
Peróxido de hidrogênio (3%)	-	2ml

Procedimento

A orto-dianisidina é dissolvida no etanol; a seguir, coloca-se a solução-tampão e, por último, o peróxido de hidrogênio; as bandas são de coloração alaranjada e começam a ser visualizadas a partir de vinte minutos, quando armazenadas a 36°C.

Dehidrogenase OH

Tris-A (tampão)	-	40ml
MgCl ₂ (0,5M)	-	0,2ml
Etanol (95%)	-	3ml
NAD (1% em H ₂ O)	-	2ml
NBT (1% em H ₂ O)	-	1ml
MTT (1% em H ₂ O)	-	0,3ml
PMS (1% em H ₂ O)	-	0,5ml

Procedimento

Dilui-se o cloreto de magnésio na solução-tampão; depois, segue-se a ordem descrita acima; as quatro últimas substâncias devem ser guardadas cuidadosamente em frascos escuros; o gel deve ser incubado a 35°C durante 2h e as bandas são acromáticas, reveladas sob um fundo azul-escuro do gel.

Fosfatase alcalina (ALP)

α -naftil fosfato ácido de sódio	-	50mg
Fast blue BB	-	50mg
Tris-D (tampão)	-	40ml
$MgCl_2$ (0,5M)	-	0,6ml
$MnCl_2$ (0,25M)	-	1,2ml

Procedimento

Dilui-se o Fast Blue na solução-tampão colocando-se, a seguir, o cloreto de magnésio e o de manganês; por último, coloca-se o substrato e incuba-se o gel a 37°C, por 2h.

Enzima málica

Tris-A (tampão)	-	10ml
$MgCl_2$ (0,5M)	-	1,5ml
Ácido málico (2M pH 7,09)	-	3,0ml
PMS (1% em H ₂ O)	-	0,1ml
NBT (1% em H ₂ O)	-	0,2ml
MTT (1% em H ₂ O)	-	0,2ml

O procedimento segue de acordo com a ordem descrita para esta enzima.

Malato desidrogenase (MDH)

Tris-A (tampão)	-	35ml
Ácido málico (2M pH 7,0)	-	5ml
MgCl ₂ (0,5M)	-	0,3ml
NAD (1% em H ₂ O)	-	2ml
NBT (1% em H ₂ O)	-	1ml
PMS (1% em H ₂ O)	-	0,5ml
MTT (1% em H ₂ O)	-	1ml

Procedimento

O NAD e o MTT são previamente preparados na proporção de 10mg/ml de água destilada, enquanto o PMS é preparado na proporção de 1mg/ml de água destilada. O pH do ácido málico deve ser corrigido com NaOH concentrado e as zonas de coloração azul-arroxeadas aparecem a partir de 30 minutos.

Anexo II**Materiais necessários à instalação de um laboratório de eletroforese**

EQUIPAMENTOS	QUANTIDADE
Cuba eletroforética (Capacidade de um gel)	01
Fonte eletroforética	02
Geladeira (280 l)	01
Centrífuga refrigerada	01
Centrífuga de pequena capacidade (7.000 rpm)	01
Dessecador	04
Freezer (300 l)	01
Estufa - tamanho médio	01
Placas de eletroforese	05
Plastificador	01
Potenciômetro	02
Balança analítica	01
Agitador magnético	02

Alguns desses equipamentos podem ser substituídos por outros, desde que se adaptem ao laboratório

ANEXO III

Terminologia e Definições

Alelo - formas alternativas de um gene, situadas em um mesmo loco em cromossomos homólogos e responsáveis pelas diferentes manifestações fenotípicas do caráter (Ramalho et al., 1990).

Aloenzimas - expressão fenotípica de alelos situados em um mesmo loco

Aminoácido - substância orgânica que contém grupamentos carboxila (COOH) e amina (NH_2) que são os constituintes das proteínas. Existem vinte aminoácidos diferentes, que participam das proteínas (Ramalho et al., 1990).

Artefatos ou fantasmas - bandas instáveis em ensaios repetidos com o mesmo material (Alfenas et al., 1991).

Bandas - marcas, formadas pela presença ou ausência de cor, que identificam a presença da isoenzima numa faixa estreita do gel (Alfenas et al., 1991).

Campo elétrico - aquele em que, sob uma carga elétrica, age uma força independente da velocidade da carga (Ferreira, 1986).

Caráter - um dos muitos detalhes de estrutura, forma, substância ou função que forma um organismo individual (Gardner & Sinustad, 1986).

Código genético - conjunto de códons que formam os diferentes aminoácidos.

Códon - trinca de bases nitrogenadas no DNA ou RNA que codifica um aminoácido (Borém, 1997).

Coenzima - Uma substância necessária à atividade de uma enzima (Gardner & Snustad, 1986).

Coloração Histoquímica - método de coloração que localiza um composto químico em um tecido ou órgão. Um exemplo clássico é a coloração do amido em tubérculos, pelo uso de Iodo.

Cromossomo - estrutura nucleoprotéica localizada no núcleo da célula. É a base física dos genes (Ramalho et al., 1990).

Cromossomo homólogo - cromossomos que apresentam a mesma morfologia e são portadores dos mesmos genes (Ramalho et al. 1990).

Eletroforese - (do grego: transporte por eletricidade) - separação de moléculas ionizadas em um campo elétrico, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares.

Fenótipo – formas alternativas de expressão de uma característica. Essa expressão depende do genótipo e do ambiente (Ramalho et. al., 1990)

Gene ou gen – um determinador hereditário que especifica uma função biológica; uma unidade de herança (DNA) localizada em um lugar fixo no cromossomo (Gardner e Snustad, 1986).

Heteropolímeros - polipeptídeo formado por dois ou mais monômeros diferentes.

Homopolímeros - peptídeo formado por monômeros iguais

Isoenzimas - são múltiplas formas de uma enzima ou outra proteína solúvel ativa que reage com um substrato (Pasteur,

et al., 1988). Alguns autores consideram isoenzimas aquelas derivadas de um mesmo organismo.

Loco - local no cromossomo onde se localiza determinado gene (Ramalho et al., 1990).

Migração - distância percorrida pela banda no gel, usualmente medida pela linha formada pelo azul de bromofenol. É usada para localizar a posição exata da banda no gel a fim de se compará-la com as de outros géis.

Monômero - cada polipeptídeo que compõe uma enzima

Monomórfico - um gene ou caractere que não difere nos indivíduos analisados.

Peptídeo - molécula constituída de aminoácidos

Polimórfico - um caráter é polimórfico quando tem dois ou mais estados ou formas distinguidos qualitativamente (Pasteur, 1980 e Alfenas et al., 1991). Em isoenzima um gene ou caractere é polimórfico quando tem pelo menos 2 alelos e o mais comum deles não ultrapassa a freqüência de 95%

Polipeptídeo - Molécula constituída de vários peptídeos (Ramalho et al., 1990).

Wicks - pequenos pedaços de papel chromatográfico usados para embeber os extratos contendo as enzimas.

Zona ou região de atividade - região no gel onde se localizam as enzimas. Um gel pode ter uma ou mais zonas de atividade.

