

**MANUAL DE ELETROFORESE
DE ISOENZIMAS EM GEL DE
POLIACRILAMIDA**

MANUAL DE ELETROFORESE
DE ISOENZIMAS EM GEL DE
POLIACRILAMIDA

Maria Rosa Costa
Claud'ne do Socorro M. de Sousa



Documentos, 28

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (91) 276-6653, 276-6333

Fax: (91) 276-9845

e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

Caixa Postal, 48

66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente

Antonio de Brito Silva

Antonio Pedro da S. Souza Filho

Expedito Ubirajara Peixoto Galvão

Joaquim Ivanir Gomes

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Maria de N. M. dos Santos – Secretária Executiva

Revisores Técnicos

Maria do Socorro Padilha de Oliveira – Embrapa Amazônia Oriental

Sérgio de Mello Alves – Embrapa Amazônia Oriental

Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira

Normalização: Lucilda Maria Souza de Matos

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

COSTA, M.R.; SOUSA, C. do S.M. de. **Manual de eletroforese de isoenzimas em gem de poliacrilamida.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 28p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 28).

ISSN 1517-2201

1. Pimenta-do-reino – Extração de isoenzima. 2. Pimenta-do-reino – Eletroforese de isoenzima. 3. Cupuaçu. 4. Análise de proteína. I. Sousa, C do S.M. de, colab. II. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). III. Título. IV. Título. IV. Série.

CDD: 541.372

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
RECURSOS NECESSÁRIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	6
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	7
PREPARAÇÃO DO GEL SEPARADOR	7
PREPARAÇÃO DO GEL CONCENTRADOR	8
EXTRAÇÃO DE ENZIMAS.....	8
PREPARATIVOS RELATIVOS AO GEL	9
PREPARATIVOS RELATIVOS AO TANQUE DE ELETROFORESE	9
APLICAÇÃO E ELETROFORESE	10
REVELAÇÃO E ARQUIVAMENTO DE GÉIS	10
TRATAMENTO PÓS-COLORAÇÃO	10
SECAGEM DO GEL	15
APLICAÇÃO DO PROTOCOLO	15
PIMENTA-DO-REINO	15
CUPUAÇUZEIRO	18
CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
ANEXOS	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

MANUAL DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Maria Rosa Costa¹

Claud'ne do Socorro M. de Sousa²

INTRODUÇÃO

A eletroforese é considerada uma técnica versátil para a análise de proteínas, sendo de fácil aplicação em estudos que abordam a variação genética presente nos organismos. Essa técnica, desenvolvida inicialmente por Kunkel e Teselius no ano de 1951, e mais tarde aperfeiçoada com a introdução de uma camada suporte, de amido (Smithies, 1955) e de poliacrilamida (Ornstein & Davis, 1962), citado por Steward et al. (1965), consiste basicamente na migração diferencial de proteínas em campo elétrico, onde a velocidade de deslocamento das moléculas depende da carga elétrica líquida de sua superfície externa, seu tamanho e forma. A revelação de bandas é feita com corantes, mostrando tamanho, intensidade da cor e distância do ponto de aplicação, os quais são usados para comparar as amostras. Esse princípio vem sendo amplamente utilizado para o estudo de proteínas nativas e desnaturadas (Weber & Osborn, 1975).

A técnica do gel de poliacrilamida em gradiente facilita ao pesquisador ter um completo domínio sobre as condições de porosidade do gel, possibilitando fazer alterações para a separação das proteínas e, conseqüentemente, obter melhor padrão eletroforético, portanto é uma técnica com grande poder de separação molecular, pois possibilita separar não somente com base na carga da proteína, mas explora melhor as diferenças no tamanho das cadeias polipeptídicas. O termo isozima ou isoenzima refere-se a diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, as quais

¹Eng^a- Agr^a, M.Sc., Pesquisadora, Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970 Belém, PA.

²Estudante do curso de Biologia da UFPA.

apresentam mesma especificidade por substrato (Markert & Moller, 1959). Como as isoenzimas são formas alternativas de uma molécula, pequenas mudanças na estrutura da proteína são detectadas por essa técnica (Hames, 1996). Normalmente as isozimas são particulares para uma dada espécie, tecido e estágio de desenvolvimento de um organismo. Por isso, podem ser usadas, em muitas situações, com marcadores para determinação de genótipos contrastantes e determinação da divergência genética em plantas.

Este trabalho tem como objetivo descrever a metodologia utilizada no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia (seção de genética de plantas) da Embrapa Amazônia Oriental, para a extração e eletroforese de isozimas em gel de poli(acrilamida), a partir de folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), levando-se em consideração as peculiaridades observadas e apresentando os protocolos obtidos. É uma abordagem prática e não uma revisão exaustiva de métodos. Vale lembrar, também, que a proposta apresentada é passível de alteração pelo usuário, conforme as particularidades do seu trabalho e que todo método científico possui fontes de erro, necessitando o máximo critério para a execução.

RECURSOS NECESSÁRIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

Neste ítem estão descritos os recursos mínimos necessários para se desenvolver a técnica de eletroforese de isoenzimas.

Água destilada e/ou deionizada para preparo das soluções;

Aparato vertical de duas placas, para a corrida de géis;

Agitador magnético;

Balança eletrônica com capacidade de 210 g;

Fonte de energia de 125 watts;
Estufa para revelação de géis;
Máquina de fazer gelo em escama;
Máquina fotográfica;
Pipetas automáticas (5 ml, 1000 μ l e 50 μ l);
Potenciômetro;
Utensílios de laboratório (vidrarias, bandejas para coloração, etc.);
Refrigerador duplex;
Centrífuga (18.000 rpm);
Freezer (-30 °C).

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Existem diversos meios-suporte que podem ser empregados. No caso de enzimas, géis de amido e poliacrilamida são os que oferecem melhor resolução. Neste tópico estão descritos dois sistemas de géis: gel separador e gel concentrador.

PREPARAÇÃO DO GEL SEPARADOR

- Colocar em recipiente 9 ml da solução A (anexo 1), pH 8,8;
- Adicionar 9 ml da solução B (anexo 1), pH 6,8;
- Misturar em agitador magnético por dez minutos;
- Acrescentar 18 ml da solução C (anexo 1) e esperar 30 segundos;
- Colocar 13,05 ml da solução A:B:C no interior dos moldes de gel;

- Acrescentar 1 ml de água destilada para evitar contato do gel com oxigênio e promover o nivelamento do gel;
- Esperar a polimerização do gel (em torno de uma hora).

PREPARAÇÃO DO GEL CONCENTRADOR

- Colocar um recipiente 4 ml da solução D (anexo 1), para dois géis;
- Acrescentar 80 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) e 8 ml da solução E (anexo 1);
- Deixar a mistura no agitador magnético por cinco a dez minutos;
- Acrescentar 4 ml da solução F (anexo 1);
- Colocar a solução D:E:F no interior do molde sobre o gel separador (em 80% do espaço disponível no molde);
- Inserir os pentes para formação das canaletas e acrescentar o restante da solução;
- Deixar os moldes sob luz fluorescente, para que ocorra a polimerização do gel e formação das canaletas (em torno de uma hora).

EXTRAÇÃO DE ENZIMAS

Folhas jovens e brotações são geralmente mais ricas em proteínas do que folhas maduras. Deve-se utilizar folhas recém-coletadas ou armazenadas em sacos de plástico mantidos em geladeira (2 a 5° C) por, no máximo, uma semana. Em ultracongelador (-85° C), as folhas podem ser mantidas por mais tempo sem perda de atividade enzimática

(Alfenas,1998). A composição da solução extratora pode variar com a espécie e o tecido, podendo portanto ser adequada à espécie em estudo.

- Utilizar almofarizes e pistilos previamente resfriados em geladeira;
- Macerar a amostra (cerca de 50 mg, para folhas jovens) em 1 ml de solução tampão extratora (anexo 2), sob nitrogênio líquido;
- Acrescentar 70 a 90 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP).

PREPARATIVOS RELATIVOS AO GEL

- Preparar os géis, previamente, preenchendo as canaletas com solução tampão pH 8,9 (tampão do eletrodo), proteger com filme plástico e conservar a frio para utilizar no dia seguinte;
- Retirar o tampão e preencher as canaletas com solução resfriada de Azul-de-Bromofenol (0,2 mg/ml) para lavagem;
- Deixar uma pequena quantidade de azul-de-bromofenol para monitoramento da migração.

PREPARATIVOS RELATIVOS AO TANQUE DE ELETROFORESE

- Colocar 450 ml de tampão do eletrodo previamente resfriado na cuba eletrolítica;
- Inserir os moldes na cuba e preencher o tanque entre os moldes com tampão do eletrodo até o nível do azul-de-bromofenol.

APLICAÇÃO E ELETROFORESE

Efetuar a aplicação das amostras no gel utilizando uma pipeta digital (10 μ l de extrato/amostra), completar o tanque entre os moldes com o tampão do eletrodo;

Efetuar essa atividade em ambiente frio e com bastante rapidez para evitar a desnaturação das enzimas;

Submeter à eletroforese sob condições de 16 mA, 105 a 250 V, à temperatura de 4 °C.

REVELAÇÃO E ARQUIVAMENTO DE GÉIS

Neste item são descritos alguns métodos para a revelação de enzimas (adaptados de Tsumura et al., 1990).

Todos os 18 sistemas enzimáticos descritos na Tabela 1 foram testados durante o desenvolvimento do protocolo para pimenta-do-reino e cupuaçuzeiro, que está exemplificado neste manual.

TRATAMENTO PÓS-COLORAÇÃO

- Assim que as bandas estiverem bem nítidas, paralizar a reação de coloração com a solução de neutralização por um período de cinco minutos;
- Descartar a solução;
- Lavar com água destilada (3 vezes);
- Acrescentar a solução fixadora adequada;
- Cobrir com papel alumínio e levar para o refrigerador (4 °C) por um período de pelo menos doze horas.

TABELA 1. Relação de enzimas, com suas receitas para revelação de enzimas no gel.

Isoenzima	Solução corante		Procedimento
Glutamato Desidrogenase-GDH	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	Ácido L-glutâmico	300 mg	
	NAD (15 mg/ml)	1 ml	
	NBT (10 mg/ml)	1 ml	
	PMS (5 mg/ml)	1 ml	
Malato Desidrogenase-MDH	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a temperatura ambiente, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação. Preparar a solução substrato com 12,15g de Na ₂ CO ₃ .H ₂ O em 50 ml de água destilada, colocar a solução em uma caixa de isopor com gelo, adicionar 13,4 g de Ácido DL-Málico e completar o volume para 100 ml.
	Solução substrato	5 ml	
	NAD (15 mg/ml)	1 ml	
	NBT (10 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
Xiquimato Desidrogenase-SKDH	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	Ácido chiquímico (10 mg/ml)	1 ml	
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml	
	MTT (5 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
Sorbitol Desidrogenase-SoDH	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	1 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	
	D-sorbitol	100 mg	
	NAD (15 mg/ml)	1 ml	
	MTT (5 mg/ml)	1 ml	
Tetrazólio Oxidase-TZO	PMS (1 mg/ml)	1 ml	Fazer a incubação no claro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml	
	NAD (15 mg/ml)	1 ml	
	NBT (10 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	

Continua...

TABELA 1. ...Continuação.

Isoenzima	Solução corante	Procedimento
Glucose 6-Fosfato Desidrogenase- G6PDH	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml
	D-Glucose 6-fosfato (15 mg/ml)	1 ml
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml
	MTT (5 mg/ml)	1 ml
	PMS (1 mg/ml)	1 ml
	MgCl ₂ .6H ₂ O(10,17g/100ml)	1 ml
Leucina Aminopeptidase-LAP	Tampão LAP	50 ml
	L-leucina-β-naftolamida (10 mg/ml)	1 ml
	Fast Black K salt	30 mg
	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml
Enzima Málica (A)-ME	Solução substrato *	5 ml
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml
	MTT (5 mg/ml)	1 ml
	PMS (1 mg/ml)	1 ml
	MnCl ₂ .4H ₂ O (9.90 g/100 ml)	1 ml
	* Mesma solução utilizada em MDH	
Menadiona Redutase-MNR	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml
	Menadiona	100 mg
	β-NADH	25 mg
	NBT (10 mg/ml)	1 mg
	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml
Fosfogluco Isomerase-PGI	D-frutose-6-fosfato (20 mg/ml)	1 ml
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml
	MTT (5 mg/ml)	2 ml
	PMS (5 mg/ml)	1 ml
	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	1 ml
	G6 PDH	10 un

Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.

Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução e fazer a fixação.

Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.

Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.

Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução e fazer a fixação.

Continua...

TABELA 1. ...Continuação.

Isoenzima	Solução corante		Procedimento
Fosfoglucomutase-PGM	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	D-glucose-1-fosfato (70 mg/ml)	1 ml	
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml	
	MTT (5 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	1 ml	
6-Fosfogluconato Desidrogenase-6PGDH	G6 PDH	10 un	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	
	Ácido-6-fosfogluconico (5 mg/ml)	1 ml	
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml	
	MTT (5 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
Glutamato Oxaloacetato Transaminase- GOT	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	1 ml	Fazer a incubação no escuro a temperatura ambiente, descartar a solução e fazer a fixação.
	Tampão GOT	50 ml	
	Ácido L-aspártico	50 mg	
	Ácido α-cetoglutárico	1 ml	
	Fast Blue BB salt	50 mg	
	Piridoxal-5'-fosfato(3,33mg/ml)	5 ml	
Diaforase- DIA	50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°, descartar a solução, paralizar a reação e fazer a fixação.
	2,6-Diclorofenol-indofenol (1 mg/ml)	1 ml	
	NADH	25 mg	
	MTT	2 ml	

TABELA 1. ...Continuação.

Isoenzima	Solução corante		Procedimento
Fumarase- FUM	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.
	Ácido fumárico dissódico (200 mg/ml)	3 ml	
	NAD (15 mg/ml)	1 ml	
	NBT (10 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
Fosfatase Ácida- ACP	Tampão ACP	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução e fazer a fixação.
	α -naftil fosfato ácido de sódio	50 mg	
	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	0,3 ml	
	Fast garnet GBC salt	12 mg	
Aconitase- ACP	200 mM Tris-HCl pH 8,0	50 ml	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.
	Cis-ácido aconítico	100 mg	
	NADP (6,6 mg/ml)	1 ml	
	NBT (10 mg/ml)	1 ml	
	PMS (1 mg/ml)	1 ml	
	MgCl ₂ 6H ₂ O (10,17 g/100 ml)	1 ml	
Álcool Desidrogenase- ADH	IDH	42 un	Fazer a incubação no escuro a 37°C, descartar a solução, paralisar a reação e fazer a fixação.
	50 mM Tris-HCl pH 7,0	50 ml	
	Etanol (92,8%)	5,4 ml	
	NAD (15 mg/ml)	2 ml	
	NBT (10 mg/ml)	2 ml	
	PMS (5 mg/ml)	1 ml	

SECAGEM DO GEL

- Retirar do refrigerador, descobrir e deixar em temperatura ambiente até que o gel fique totalmente transparente;
- Utilizar folha de papel celofane especial, previamente umedecida, e colocar sobre uma placa de vidro;
- Colocar o gel sobre a placa, umedecer as bordas do gel com água destilada e colocar outra folha de papel celofane especial previamente umedecida;
- Retirar o excesso de água com o auxílio de pente de plástico de eletroforese e prender com grampos;
- Esperar a secagem completa (em torno de dois dias);
- Cortar o papel nas laterais do gel e arquivá-lo em ambiente sem umidade (seco).

APLICAÇÃO DO PROTOCOLO

Neste ítem estão descritos os resultados obtidos para a obtenção do protocolo de eletroforese de isoenzimas de pimenta-do-reino e cupuaçu em gel de poliacrilamida.

PIMENTA-DO-REINO

Para aplicação da técnica de eletroforese de isoenzimas, na análise de variabilidade genética, foi necessária uma fase preliminar, visando adequar os procedimentos da técnica às espécies em estudo. Durante essa fase foram necessários vários testes para ajuste da metodologia e assim determinar os sistemas enzimáticos que apresentam bandas eletroforéticas de melhor atividade enzimática, resolução, e

passíveis de interpretação genética. Foram testados 18 sistemas enzimáticos (Tabela 1). Como resultado dos testes em pimenta-do-reino, 15 sistemas apresentaram bom padrão eletroforético a saber: DIA, 6PGDH, PGI, MDH, GOT, ACO, MNR, ACP, FUM, SKDH, ME, G6PDH, GDH, PGM e TZO. Três sistemas não apresentaram atividade enzimática no gel (ADH, LAP e SoDH). Para as enzimas GDH, PGM e TZO, houve atividade, porém, em vez de bandas, formaram-se manchas difusas (Tabela 2).

TABELA 2. Enzimas analisadas em folhas jovens de pimenta-do-reino com suas respectivas qualidades de coloração e segregação.

Enzima	Bandeamento	Intensidade		Resolução		Segregação	
	Presente	Fortes	Fracas	Boa/regular	Ruim	Mono	Poli
GOT	x	x		x			x
ACP	x	x		x			x
ACO	x		x	x			x
PGI	x	x		x			x
DIA	x	x		x			x
MNR	x	x		x			x
ME	x		x	x			x
MDH	x	x			x		x
G6PDH	x	x		x		x	
6PGDH	x	x		x			x
SKDH	x	x		x			x
FUM	x	x		x		x	
GDH					x		
PGM					x		
TZO					x		
ADH							
LAP							
SoDH							

Quanto ao padrão de bandas observado entre as amostras de pimenta-do-reino analisadas, dez enzimas (DIA, 6PGDH, PGI, MDH, GOT, ACO, MNR, ACP, SKDH e ME) apresentaram polimorfismo (variação no padrão de bandas). Enquanto que duas enzimas (FUM e G6PDH) não apresentaram variação de bandas (monomorfismo). Os resultados evidenciaram que é possível a obtenção e utilização das enzimas polimórficas para estudos de variabilidade genética em pimenta-do-reino, utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas.

Para a correta interpretação dos padrões de bandas encontrados nos géis, é importante o conhecimento prévio sobre o número de subunidades da estrutura quaternária de cada enzima. As enzimas monoméricas, por exemplo, são formadas por um único polipeptídeo, enquanto que as enzimas diméricas, por dois polipeptídeos. Indivíduos heterozigotos para uma enzima dimérica, além das duas bandas correspondentes aos dois polipeptídeos, apresentam uma terceira banda intermediária, produto da conjugação aleatória dos dois polipeptídeos. Da mesma forma, indivíduos heterozigotos para uma enzima tetramérica apresentam três bandas intermediárias.

Nos zimogramas, foi constatada uma variação no que diz respeito aos fenótipos eletroforéticos de isoenzimas, entre os quais, observou-se presença de enzimas monoméricas, diméricas e tetraméricas nos genótipos estudados.

A análise dos resultados permitiu visualizar codominância entre os alelos representados pelas bandas isoenzimáticas, indicando a existência de genótipos heterozigotos em determinados locos.

Para melhor orientação do usuário, constam na Tabela 3 as abreviaturas e estruturas das enzimas.

TABELA 3. Relação de enzimas analisadas com as respectivas estruturas e abreviações.

Enzima	Estrutura quaternária	Abreviatura
Diaforase	Monomérica, dimérica, tetramérica	DIA
6-fosfogluconato Desidrogenase	Dimérica	6PGDH
Fosfogluose Isomerase	Dimérica	PGI
Malato Desidrogenase	Dimérica	MDH
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	Dimérica	GOT
Aconitase	Monomérica	ACO
Menadiona Redutase	NC	MNR
Fosfatase ácida	Monomérica, Dimérica	ACP
Fumarase	Tetramérica	FUM
Xiquimato Desidrogenase	Monomérica	SKDH
Enzima Málica	Tetramérica	ME
Glucose 6-fosfato Desidrogenase	Dimérica	G6PDH
Álcool Desidrogenase	Dimérica	ADH
Leucina Aminopeptidase	Tetramérica	LAP
Glutamato Desidrogenase	Hexamérica	GDH
Fosfoglucomutase	Monomérica	PGM
Sorbitol Desidrogenase	Tetramérica	SoDH
Tetrazólio Oxidase		TZO

CUPUAÇUZEIRO

Antes de utilizar a técnica de eletroforese de iso-enzimas para obtenção de bandas, a exemplo da pimenta-do-reino, foi necessário desenvolver “protocolos” (procedimentos) para o cupuaçuzeiro, que consiste em viabilizar o uso da técnica, utilizando tecido dessa espécie no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Seção de Genética de Plantas) da Embrapa Amazônia Oriental.

Após as amostras (obtidas de tecidos de folhas jovens de cupuaçuzeiro), aplicadas em gel de poliacrilamida, serem submetidas a eletroforese, 18 sistemas de coloração de enzimas foram utilizados visando a obtenção de enzimas polimórficas, ou seja, que apresentem variação de bandas entre as amostras testadas.

A Tabela 4 apresenta um resumo dos resultados obtidos. Dos sistemas testados, 14 revelaram presença de bandeamento de isoenzimas, sendo que nove apresentaram bandas fortes e quatro bandas fracas. Apenas quatro sistemas não apresentaram resultados de atividade enzimática. A metade das enzimas testadas apresentou polimorfismo, o que caracteriza a presença de variabilidade genética, a saber: GOT, ACP, MDH, G6PDH, FUM, GDH, e ADH. As enzimas: PGI, DIA, MNR, ME, 6PGDH, SKDH, e SoDH apresentaram-se monomórficas (sem variação de bandas entre as amostras).

TABELA 4. Enzimas analisadas em folhas jovens de cupuaçuzeiro, e as respectivas avaliações quanto à coloração e segregação.

Enzima	Bandeamento	Intensidade		Resolução		Segregação	
		Forte	Fraca	Boa/Regular	Ruim	Mono	Poli
GOT	x	x		x			x
ACP	x	x		x			x
ACO					x		
PGI	x		x	x		x	
DIA	x	x		x		x	
MNR	x	x		x		x	
ME	x		x	x		x	
MDH	x	x			x		x
G6PD	x	x		x			x
6PGD	x	x		x		x	
SKDH	x			x		x	
FUM	x	x		x			x
GDH	x	x		x			x
PGM					x		
TZO					x		
ADH	x		x	x			x
LAP					x		
SoDH	x		x	x		x	

Após a interpretação genética dos géis, quatro enzimas polimórficas foram identificadas por apresentarem bandas com indicação de segregação do tipo mendeliana , a saber:

ACP- enzima monomérica, polimórfica, apresentando um loco, dois tipos de alelos e os três fenótipos possíveis.

GOT- enzima monomérica, polimórfica, apresentando um loco, dois tipos de alelos e dois fenótipos.

FUM- enzima monomérica, polimórfica, um loco, três tipos de alelos e quatro fenótipos.

GDH- enzima monomérica, polimórfica, um loco, dois tipos de alelos e dois fenótipos.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho é uma abordagem prática na qual é apresentada uma descrição condensada da técnica de eletroforese de isoenzimas. Devido particularidades do material em estudo e as condições intrínsecas de cada laboratório, as propostas são passíveis de alteração ou substituição pelo usuário. É muito importante ressaltar que, apesar do advento de novas técnicas moleculares, que permitem uma ampla cobertura do genoma das plantas (RAPD, Microsatélites, AFLP...), a técnica de isoenzimas mantém o seu valor, sendo relativamente barata e acessível, podendo ser utilizada para diversos fins como identificação de variedades, seleção indireta de caracteres agrônômicos e outros, além de contribuir em diversos aspectos do melhoramento genético.

ANEXOS

ANEXO 1 – Soluções para Preparo de Géis

Solução A, pH 8,8

Trizma base	91,5 g
1N HCl	120 ml
TEMED	0,575 ml
H ₂ O (q.s.p)	500 ml

Solução B, pH 6,8

Acrilamida	150 g
Bis-acrilamida	4 g
H ₂ O (q.s.p)	500 ml

Solução C

Persulfato de amônio	2 mg/ml
H ₂ O (q.s.p)	18 ml

Solução D

Trizma base	14,95 g
1N HCl	120 ml
TEMED	1,15 ml
H ₂ O (q.s.p)	500 ml

Solução E

Acrilamida	37,5 g
Bis-acrilamida	6,25 g
H ₂ O (q.s.p)	500 ml

Solução F

Riboflavina	10 mg
H ₂ O (q.s.p)	500 ml

Anexo 2 – Solução extratora

Tampões para extração das enzimas

EXT 1:

Trizma preset pH 7,5	7,54 g
EDTA	560 mg
H ₂ O	100 ml
Glicerol	126 g
H ₂ O (q.s.p)	250 ml

EXT 2:

Tween 80	7,88 g
H ₂ O (q.s.p)	250 ml

EXT 3:

DTT	9,26 mg/ml
-----	------------

EXT 4:

NAD	6 mg/ml
-----	---------

EXT 5:

NADP	6,6mg/ml
------	----------

B-mercaptotanol

0,07 ml

BSA

12 mg

Os tampões, o B-mercaptoetanol e o BSA são misturados na proporção: 14:6:6:2:2:0,14:24 para 20 amostras.

Anexo 3 – Tampões de coloração

– Glutamato Oxaloacetato Transaminase

Tampão GOT

Dissolver 1,18 g de NaOH em 200 ml de água destilada. Acrescentar 6,81 g de NaH_2PO_4 e completar o volume para 500 ml.

– Leucina Aminopeptidase

Tampão LAP

Utilizar 9,81 g de anidrido maleico e 12,11 g de trizma base dissolvidos em 300 ml de água destilada. Acrescentar 600 mg de NaOH e completar o volume para 500 ml.

– Fosfatase Ácida

Tampão ACP

Utilizar 1,6 g de acetato de sódio tri-hidratado e 4,83 ml de ácido acético glacial em 500 ml de água destilada.

Anexo 4 – Tampões de Neutralização e Fixação

– Tampão de neutralização

Preparar 1.000 ml de uma solução 2% de ácido acético glacial.

– Solução de Fixação A

Preparar 1.000 ml de uma solução 70% de etanol.

– Solução de Fixação B

Preparar 1.000 ml de uma solução 50% de etanol e 5% de ácido acético glacial.

Anexo 5 – Neutralização e fixação das enzimas.

Sistema enzimático	Solução de neutralização	Solução de fixação
Fosfatase Ácida	N	A
Fosfoglucoase Isomerase	N	A
Leucina Aminopeptidase	N	A
Glutamato Desidrogenase	S	B
Malato Desidrogenase	S	B
Xiquimato Desidrogenase	S	A
6-Fosfogluconato Desidrogenase	S	A
Diaforase	S	A
Álcool Desidrogenase	S	A
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	N	B
Fosfoglucomutase	S	A
Enzima Málica	S	A
Aconitase	S	A
Menadiona Redutase	S	A
Glucose 6-Fosfato Desidrogenase	S	B
Fumarase	S	B
Tetrazólio Oxidase	S	B
Sorbitol Desidrogenase	S	B

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1998. 574p.
- HAMES, D.B. One – dimensional polyacrylamide gel electroforesis. In: HAMES, D.B; RICKWOOD, D. ed. **Gel electrophoresis of proteins:** a practical approach. 2. ed. Oxford : IRL Press, 1996. p.1-139.
- MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.45, p.753-63, 1959.
- STEWART, F.C.; LYNDON, R.F.; BABER, J.T. Acrylamide gel electroforesis of soluble plant proteins: a study on pea seedlings in relation to development. **American Journal of Botany**, v.52, n.2, p. 155-164, 1965.
- TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y; NAIM, M.; OHBA, K. Método de análise de isoenzimas. In: TSUKUBA. Universidade. Sexto Relatório sobre treinamento de estudos florestais. Texto em japonês. Tsukuba, 1990, p.63-95.
- WEBER, K.; OSBORN, M. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: WEBER, K. **The proteins**. New York: Academic Press, 1975. v.1, p.179-233.



Amazônia Oriental

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48,
Fax (91) 276-9845, Fone (91) 276-6333, CEP 66095-100
e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br*