



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - CNPSO

Londrina, PR

Técnicas Eletroforéticas



Londrina, PR
1995



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

presidente

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ministro da agricultura, do abastecimento e da reforma agrária

JOSÉ EDUARDO DE ANDRADE VIEIRA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

presidente

ALBERTO DUQUE PORTUGAL

diretores

ELZA ANGELA BATTAGLIA BRITO DA CUNHA

JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PERES

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA

chefe

JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO

chefe adjunto técnico

PAULO ROBERTO GALERANI

chefe adjunto de apoio

LUIZ CÉSAR AUVRAY GUEDES

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao:

ÁREA DE DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DO CNPSo

Caixa Postal 231 - CEP 86001-970

Fone: (043) 320-4166 - Fax: (043) 320-4186

Londrina, PR

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa da Área de Difusão de Tecnologia do CNPSo.

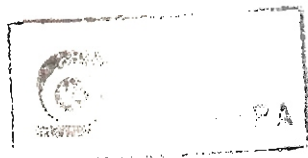


EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - CNPSo
Londrina, PR

Técnicas Eletroforéticas

José Marcos Gontijo Mandarino
Teresa Jacoba Césare Vidaurre

Londrina, PR
1995



comitê de publicações

CARLOS CAIO MACHADO
ÁLVARO M. RODRIGUES ALMEIDA
BEATRIZ S. CORRÊA-FERREIRA
IVAN CARLOS CORSO
JOSÉ RENATO B. FARIAS
NORMAN NEUMAJER

setor de serviços gráficos

HÉLVIO BORINI ZEMUNER	supervisão gráfica
SANDRA REGINA	composição
DANILO ESTEVÃO	arte-final
HÉLVIO B. ZEMUNER	fotomecânica
AMAURI P. FARIAS	acabamento e arte final

capa

SANDRA REGINA

tiragem

300 EXEMPLARES

MANDARINO, J.M.G.; VIDAURRE, T.J.C. **Técnicas eletroforéticas.**
Londrina : EMBRAPA-CNPSO, 1995. 36p. (EMBRAPA-CNPSO.
Documentos, 86).

1. Eletroforese. 2. Análises bioquímicas. I. EMBRAPA-Centro
Nacional de Pesquisa de Soja. II. Título. III. Série.

CDD 574.1928

Apresentação

A técnica de eletroforese é, hoje, uma ferramenta analítica fundamental e imprescindível em qualquer laboratório de análises físico-químicas, bioquímicas e de biologia molecular.

O conhecimento mais profundo dos princípios dessa técnica analítica é de extrema importância para pesquisadores, técnicos de laboratório e estudantes, que a utilizam para análises de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, bem como de outras macromoléculas.

Com esse objetivo, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja apresenta este documento, cuja finalidade é contribuir para a melhor compreensão das técnicas eletroforéticas pelos seus diferentes usuários.

José Francisco Ferraz de Toledo

Chefe do CNPSO

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	7
2 - FUNDAMENTOS DA TÉCNICA	8
2.1 - Princípios	8
3 - TIPOS DE GÉIS	11
3.1 - Géis de poliacrilamida	11
3.2 - Géis de amido	14
4 - PROCESSO ELETROFORÉTICO	15
5 - TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS	17
5.1 - Eletroforese em géis descontínuos	18
5.2 - Eletroforese em géis acrilamida e SDS	20
5.3 - Eletroforese em géis de agarose e acrilamida	22
5.4 - Eletroforese bi-dimensional ou de focalização Isoelétrica	23
5.5 - Eletroforese capilar	24
6 - DETECÇÃO DE MACROMOLÉCULAS SEPARADAS PELA ELETROFORESE	25
6.1 - Coloração com "coomassie blue"	25
6.2 - Coloração com nitrato de prata	26
6.3 - Técnicas fluorescentes	28
6.4 - Visualização de enzimas através de reações com substratos específicos	29
6.5 - Visualização de macromoléculas	29
6.6 - Detecção de macromoléculas radioativas	30
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
8 - BIBLIOGRAFIA	33

Técnicas Eletroforéticas

*José Marcos Gontijo Mandarino¹
Teresa Jacoba Césare Vidaurre²*

1. Introdução

A eletroforese é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo. Sua aplicação, na identificação de proteínas, tem sido ampliada para estudos de taxonomia, fisiologia e genética de plantas, animais e microrganismos. Utilizando enzimas ou proteínas solúveis, seu emprego tem se destacado na identificação de certos grupos de fungos, bactérias e nematóides (ALFENAS et al., 1991). As bandas de atividade enzimática, expressas nos géis, constituem os zimogramas, que apresentam grande potencialidade na caracterização de raças e espécies de diferentes microrganismos e plantas. Atualmente, a análise eletroforética de isoenzimas pode ser utilizada na identificação de clones, cultivares e linhagens e também em estudos de citogenética, fisiologia e bioquímica dos diferentes organismos.

A eletroforese pode ser também utilizada na determinação do peso molecular de proteínas e na caracterização de moléculas como ácidos nucleicos (DNA e RNA). Recentes progressos na tecnologia de DNA recombinante, no mapeamento de fragmentos e sequenciamento dos

¹ *Bloquímico, M.Sc. Pesquisador da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo). Cx. Postal 231 - CEP 86001-970 - Londrina, PR.*

² *Eng^a de Alimentos, Doutora. Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - Campinas, SP.*

nucleotídeos de ácidos nucleicos, têm tomado essa técnica uma ferramenta analítica indispensável (ALFENAS et al., 1991; ELSHARKAKY, 1989; SHAW, 1965; SMITH, 1968; LARSEN, 1967; STEINER & JOSLYN, 1979; GORDON, 1975).

2. Fundamentos da Técnica

2.1. Princípio

As macromoléculas como DNA, RNA e proteínas, dentre outras, possuem carga elétrica e são capazes de movimentar-se, quando submetidas a um campo elétrico.

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, num campo elétrico. As moléculas com **carga negativa** migrarão para o **polo positivo** (ânodo) e aquelas com **carga positiva** para o **polo negativo** (cátodo).

As proteínas possuem carga elétrica devido à presença, em suas moléculas, de aminoácidos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) (LEHNINGER, 1976). No processo eletroforético o importante é a carga bruta ou carga total da macromolécula submetida a esta técnica de separação.

As proteínas são moléculas anfóteras capazes de adquirir carga positiva ou negativa em função do pH do meio onde se encontram (ANDREWS, 1968; TARACKS & KERESSE, 1984).

A força (**F**) exercida sobre as moléculas, durante a eletroforese, pode ser expressa pela seguinte equação (COOPER, 1977):

$$F = \frac{Vq}{d}$$

- onde: **F** = força que atua sobre uma molécula definida;
V = voltagem (diferença de potencial entre dois eletrodos);
q = carga líquida da molécula; e
d = distância entre os dois eletrodos.

Contra a força F , atua uma força f da molécula, que depende de sua forma, tamanho e da viscosidade do meio onde a molécula se desloca. A força f é dada pela equação de Stokes:

$$f = 6\pi r\eta v$$

onde: f = força que se opõe à migração da molécula;
 r = raio da molécula;
 η = viscosidade da solução; e
 v = velocidade de migração da molécula.

Quando a força f da molécula iguala-se à força F do campo elétrico, ou seja $f = F$, a molécula deixa de migrar. Portanto, igualando-se as duas equações tem-se: $6\pi r\eta v = Vq/d$

A velocidade da molécula ($v = Vq/6\pi r\eta$) será proporcional ao campo elétrico e à carga líquida da molécula e inversamente proporcional ao seu raio, à distância entre os dois eletrodos e à viscosidade do meio.

Como cada molécula possui carga e tamanho característicos, ela deslocar-se-á sempre a uma determinada distância no campo elétrico, num dado espaço de tempo.

Os princípios descritos foram desenvolvidos para a eletroforese em solução de sacarose. No caso da eletroforese em géis, especialmente os de poliacrilamida, a migração das moléculas é profundamente influenciada pelas malhas do gel.

A passagem da corrente elétrica, através de uma solução, segue a lei de Ohm:

$$V = RI$$

onde: V = voltagem em volts;
 R = resistência em Ohms; e
 I = Intensidade da corrente, em amperes.

A eletroforese pode ser desenvolvida sob voltagem (**V**), corrente (**I**) ou potência (**W**) constantes, fornecidas por uma fonte de energia apropriada.

A escolha da voltagem ou a intensidade de corrente é feita empiricamente. Na maioria dos casos, utiliza-se uma voltagem constante em torno de 100V a 200V.

A passagem da corrente elétrica gera calor, conforme a seguinte equação:

$$C = \frac{W T}{4,18}$$

onde: **C** = Calorias;

W = consumo em watts; e

t = tempo em segundos.

$$W = V I$$

onde: **V** = voltagem; e

I = Intensidade da corrente.

A elevação da temperatura, durante o processo eletroforético, pode desnaturar as proteínas, o que, eventualmente, resulta na perda da atividade enzimática. Com o objetivo de manter a temperatura baixa durante a eletroforese, o gel pode ser resfriado com coluna de água fria ou a corrida pode ser realizada sob baixas temperaturas (em refrigerador ou câmara fria).

O processo eletroforético pode ser desenvolvido nos seguintes suportes: papel, fita de acetato, géis de amido, géis de poliacrilamida e géis de poliacrilamida/agarose.

O suporte deve ser química e fisicamente inerte, para não interferir na mobilidade das moléculas (SARGENT & GEORGE, 1975). A escolha do

meio-suporte depende do pesquisador e dos objetivos do estudo. Entretanto, para proteínas, os géis de poliacrilamida têm sido preferidos por apresentarem maior poder de resolução e permitirem ampla variação no diâmetro dos poros. Além disso, géis de poliacrilamida são altamente translúcidos, o que permite quantificar a concentração protéica e a atividade enzimática através de densitometria.

A eletroforese em géis de amido é menos onerosa do que em poliacrilamida, mas apresenta como desvantagens o não controle da porosidade das lâminas dos géis e menor resolução do que os géis de poliacrilamida.

3. Tipos de géis

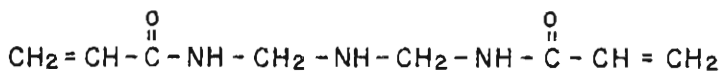
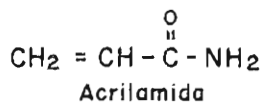
Os géis de poliacrilamida e amido são os mais difundidos nas técnicas eletroforéticas.

3.1. Géis de poliacrilamida

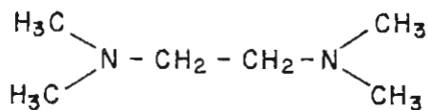
Géis de poliacrilamida são formados pela copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônia e Tetrametiletilenodiamina (TEMED), ou riboflavina e TEMED, sob luz ultravioleta ou fluorescente (Fig. 1).

Quando o persulfato de amônia é dissolvido em água, forma radicais livres. Se estes radicais livres são postos em contato com a acrilamida, ocorre a reação entre as moléculas e os radicais são preservados.

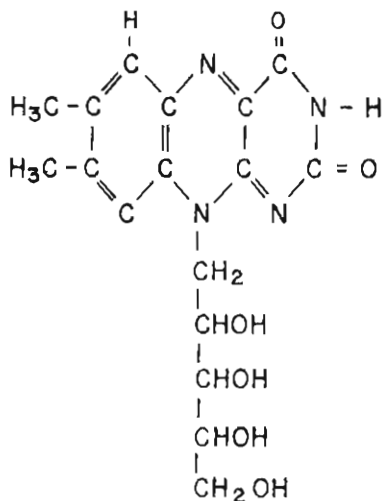
A acrilamida ativada irá reagir, sucessivamente, com outras moléculas formando um polímero de cadeia longa. A solução destes polímeros, embora viscosa, não forma gel. Para que haja formação do gel é necessário o entrelaçamento das cadeias, ou seja, a ligação cruzada entre as mesmas. Isto é conseguido quando a polimerização ocorre em presença de N-N'-metilenobisacrilamida, que é constituída por duas moléculas de acrilamida ligadas através de sua porção terminal não reativa (Fig. 2).



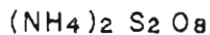
N, N' - metileno - bisacrilamida



Tetrametilenodiamina (TEMED)



Riboflavina (Vit. B₂)



Persulfato de amônia

Fig. 1. Compostos utilizados na formação dos géis de poliacrilamida.

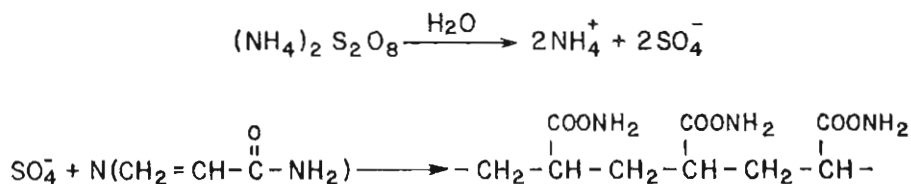


Fig. 2. Reações envolvidas na polimerização da acrilamida.

O tamanho dos poros do gel é determinado pela concentração de acrilamida (p/v) e pelo grau de ligações cruzadas. O tamanho médio dos poros do gel é uma distribuição normal entre poros grandes e pequenos, pois num gel nem todos os poros são iguais. O TEMED é o agente catalisador da polimerização. A riboflavina em presença de O_2 e luz ultravioleta também promove polimerização da acrilamida. A riboflavina sofre fotodecomposição em radicais livres, que promovem a polimerização. A fonte de luz pode ser uma lâmpada fluorescente, posicionada próximo à superfície do gel (LEWIS, 1962; HAMES, 1988) (Fig. 3).

A eletroforese em géis de poliacrilamida pode ser desenvolvida em géis preparados em tubos ou placas. Em placas, comparam-se várias amostras num mesmo gel.

Quanto à posição do gel, o sistema de eletroforese pode ser **vertical** ou **horizontal**.

Quanto à porosidade do gel, aos tampões e seus respectivos valores de pH, o sistema pode ser **contínuo** ou **descontínuo**. No sistema contínuo, o gel é de porosidade uniforme e o tampão usado na sua preparação é o mesmo dos tanques dos eletrodos. O sistema descontínuo, introduzido independentemente por Davis e Orstein, na década de 60, fornece melhor resolução do que o sistema contínuo (SARGENT & GEORGE, 1975; GORDON, 1975). A eletroforese em géis descontínuos será mais amplamente detalhada em capítulo posterior.

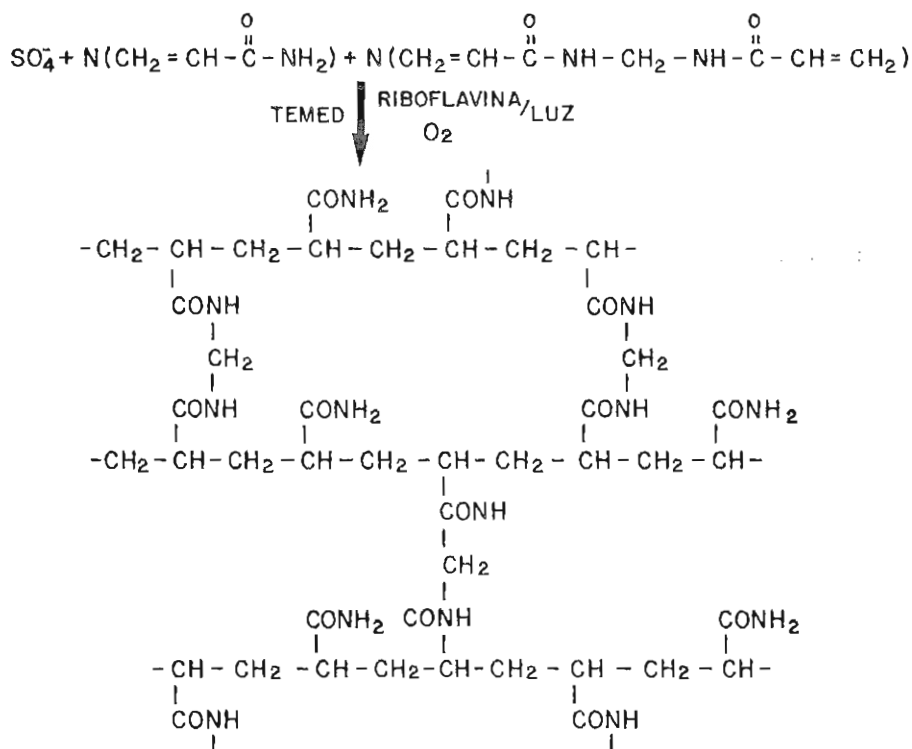


Fig. 3. Reação de entrelaçamento das cadeias de acrilamida para formação das malhas do gel.

3.2. Géis de amido

O amido é constituído de amilose e amilopectina. A amilose é formada por longas cadeias não ramificadas de D-glicose com ligações (α -1,4). A amilopectina apresenta constituição similar à da amilose, mas é altamente ramificada, apresentando ligações (α -1,6) nos pontos de ramificação.

Sob aquecimento, a suspensão aquosa do amido torna-se viscosa e, após resfriamento, geleifica-se formando uma rede tridimensional de polímeros de glicose com ligações glicosídicas (α -1,6), a partir da amilopectina. Na eletroforese em gel de amido, as moléculas, ao

migrarem por entre as malhas do gel, estarão sujeitas aos efeitos de fricção e peneiramento molecular (SARGENT & GEORGE, 1975; GORDON, 1975).

A eletroforese em gel de amido foi, pioneiramente, introduzida por Smithies, em 1955, para a resolução de soroproteínas humanas. Seu poder de resolução, até o presente, só foi superado pelo gel de poliacrilamida. Smithies usou um mesmo sistema-tampão (NaOH-ácido bórico) para o gel e os eletrodos. Subseqüentemente, POULIK (1957), ao empregar íons tamponantes no gel (tris-citrato, pH 8,6) distintos daqueles dos eletrodos (NaOH-ácido bórico), obteve melhor resolução.

POULIK (1957), observou, ainda que uma faixa visível de tonalidade marrom movia-se ao longo do gel, no sentido do cátodo, à aproximadamente 1 cm/h, sob voltagem de 6 V/cm. A melhor resolução obtida por seu sistema-tampão foi atribuída à substituição, durante a corrida, de íons citrato no gel por íons borato de sódio originários dos tanques dos eletrodos. Essa substituição, segundo o autor, aumentava a Intensidade da voltagem e a velocidade de migração das proteínas, resultando numa separação molecular mais nítida. O sistema no qual os íons tamponantes do gel são iguais aos do tampão dos tranques dos eletrodos passou a ser denominado **sistema contínuo** e aquele onde os íons tamponantes do gel são distintos daqueles dos eletrodos foi denominado **sistema descontínuo**.

Nesta técnica não se usa, costumeiramente, a descontinuidade como nos géis de poliacrilamida e o gel apresenta um pH definido à escolha do pesquisador. Pode-se, contudo, utilizar sistemas descontínuos, mas a descontinuidade refere-se ao tipo de tampão do gel em relação ao dos eletrodos e seus respectivos valores de pH. Os géis de amido são compatíveis com diferentes íons tamponantes, cobrindo uma faixa de pH entre 2 e 11 (ALFENAS et al., 1991; GORDON, 1975).

4. Processo eletroforético

Os equipamentos necessários para a realização de uma análise eletroforética são: a fonte de força e o sistema de reservatórios de tampão (cuba eletroforética).



A conexão elétrica entre os reservatórios do cátodo e ânodo é feita através do gel.

No interior dos reservatórios estão localizados os eletrodos de platina, que estão conectados a terminais no topo da unidade (cuba), onde será ligada a fonte de força.

Geralmente, o sistema de reservatórios é totalmente fechado para evitar choque elétricos no operador. O tampão tem a função de manter o pH nos reservatórios e no gel e, ainda, conduzir a corrente através do campo elétrico.

A separação eletroforética do tipo vertical de um grupo de macromoléculas é realizada aplicando-se uma solução de alta densidade da mistura protéica no topo do gel, que será então submetido à uma corrente elétrica.

Em pH em torno de nove, que é comumente usado na separação eletroforética, as proteínas, estarão carregadas negativamente. Como o ânodo está localizado no reservatório inferior, quando a fonte é ligada e a corrente elétrica flui através do gel, as proteínas começam a migrar em sua direção (o ânodo é carregado positivamente).

Normalmente, adiciona-se à solução da amostra um corante marcador ou "corante de front" (azul de bromofenol), numa concentração de 0.05%. O corante migrará mais rapidamente do que as proteínas. O processo eletroforético é desenvolvido até que o corante atinja a base do gel e, assim, pode-se afirmar que todas as macromoléculas estão no interior do gel. Entretanto, se estas migram muito vagarosamente, será necessário que se determine o período de tempo para que o corante percorra todo o gel e, então, continuar o processo eletroforético por um múltiplo desse período de tempo. O múltiplo exato irá depender das moléculas que estão sendo separadas e só poderá ser determinado por tentativa.

A reação essencial que permite a passagem da corrente do ânodo para o cátodo é a eletrolise da água, produzindo hidrogênio no cátodo e oxigênio no ânodo (para cada mol de hidrogênio é produzido 1/2 mol de oxigênio). Para cada mol de elétrons que flui pelo sistema são produzidos um mol de íons hidroxila e de prótons no cátodo e ânodo, respectivamente. Uma maneira prática de verificar a performance do sistema é

observar a produção de microbolhas ao longo dos fios de platina localizados na base dos reservatórios.

Ocasionalmente, é necessário um longo período de tempo para que se obtenha a separação desejada. Quando isto ocorre, faz-se necessário a recirculação do tampão do reservatório inferior para o superior. Esta operação pode ser realizada utilizando-se uma bomba peristáltica. Tal prática impede que haja exaustão da capacidade tamponante do tampão, evitando-se assim mudanças no pH (ANDREWS, 1988; CLARK & SWITZER, 1977; TAKACKS & KERESÉ, 1984).

5. Técnicas eletroforéticas

Quando o processo eletroforético é desenvolvido num único gel é denominado "eletroforese de zona" e, quando são utilizados dois sistemas de géis de concentrações diferentes e polimerizados um sobre o outro, o processo é denominado "eletroforese em géis descontínuos". Ambos processos podem ser desenvolvidos em tubos ou entre placas de vidro.

A eletroforese entre placas foi, originalmente, utilizada quando o amido era a principal matéria-prima para o preparo de géis. Neste tipo de eletroforese o gel (amido ou acrilamida) é polimerizado entre duas placas de vidro em forma de quadrado ou retângulo. Os orifícios ou "poços", onde as amostras serão aplicadas, são feitos utilizando-se um artefato de plástico ou acrílico (pente), que é introduzido na superfície superior do gel antes de sua polimerização. Após a polimerização do gel, o "pente" é removido deixando, na superfície do mesmo, os orifícios onde serão aplicadas as amostras.

A vantagem deste tipo de eletroforese é a facilidade na comparação de um maior número de amostras experimentais, uma vez que todas as amostras estarão presentes no mesmo gel e as condições da eletroforese serão quase constantes de amostra para amostra.

5.1. Eletroforese em géis descontínuos

Neste processo, há uma descontinuidade de pH. São utilizados dois sistemas de géis e um único sistema tampão nos reservatórios e na preparação do gel separador.

O gel separador, ou gel de corrida, é preparado com concentrações de acrilamida que podem variar de 5% a 20% e é nesse gel que as macromoléculas irão ser separadas. O tampão utilizado para a preparação deste gel é, normalmente, composto por uma amina como TRISMA e terá o pH ajustado de maneira adequada, utilizando-se, para isto, ácido clorídrico (ALFENAS et al. 1991).

Após a polimerização de gel separador, um segundo gel é polimerizado sobre este e constituir-se-á em uma camada delgada de cerca de 1,0 cm. Este é denominado gel concentrador e é preparado com menor concentração de acrilamida (2% a 3%). O tampão utilizado na sua preparação é também composto por uma amina. Entretanto, o pH do tampão deve ser ajustado com HCl para um valor inferior ao do gel separador. Geralmente duas unidades de pH abaixo do valor do pH do gel separador.

O tampão utilizado no preparo da amostra protéica deve ser o mesmo usado na preparação do gel concentrador.

O tampão dos reservatórios superior e inferior deve ser também composto de uma amina e seu pH deve ser ajustado para igual ou ligeiramente superior ao do gel separador. A glicina é normalmente utilizada para este ajuste de pH.

Sob ação da corrente elétrica, as moléculas migram da região mais porosa (gel concentrador) para a menos porosa (gel separador). Quando penetram no gel concentrador (Tris-HCL, pH 6,8), as moléculas de proteína concentram-se sob forma de uma banda estreita e compacta e ao passarem para o gel separador (Tris-HCL, pH 8,9) elas separar-se-ão de acordo com suas respectivas cargas elétricas e pesos moleculares. A migração dar-se-á em direção ao polo positivo (ânodo).

A mobilidade das proteínas no gel é função do pH do meio, do ponto isoelétrico (PI) e do peso molecular das proteínas. Assim sendo, quanto menos eletronegativa for a molécula e quanto maior o seu peso molecular, menor será a sua mobilidade no gel.

A resolução pode ser melhorada através do uso de géis com gradiente de concentração de acrilamida (ALFENAS et al., 1991; ANDREW, 1988; LEWIS, 1962; HAMES, 1980).

O comportamento das macromoléculas e do tampão, neste tipo de eletroforese, é o seguinte: a glicina, no reservatório superior, encontra-se tanto com carga bruta zero quanto na forma de glicinato com carga negativa (-1). Quando o campo elétrico é estabelecido, os íons cloreto, as proteínas, o azul bromofenol e os íons glicinato penetram no gel concentrador e encontram uma condição de pH inferior (+ baixo). Haverá, então, uma condição de equilíbrio pela formação de moléculas de glicina com carga zero, as quais são imóveis no tampão e no gel, criando uma deficiência de íons móveis e provocando uma diminuição no fluxo da corrente. Entretanto, uma corrente constante deve ser mantida através de todo o sistema elétrico. Isto ocorre na zona situada entre os íons cloreto e glicinato, através de um aumento na voltagem. O resultado é um gradiente localizado de voltagem muito alta que ocorre entre os íons cloreto e glicinato. Nestas condições, a mobilidade relativa dos íons e moléculas no gel será: Glicinato > proteína < azul de bromofenol < Cl^- .

Neste intenso campo elétrico localizado, todas as proteínas aniônicas migram rapidamente e, como o gel concentrador possui poros grandes (menor concentração de acrilamida), não são barradas em sua migração. Se algumas das proteínas passarem por sobre os íons Cloreto, irão diminuir sua velocidade porque onde houver íons Cloreto não haverá deficiência iônica e, como nesse caso, as proteínas sobrepassaram os íons cloreto a força do campo elétrico desaparece. Assim sendo, as proteínas migram rapidamente até atingirem a região onde estão concentrados os íons cloreto e, então, diminuem sua velocidade de migração drasticamente. O rápido movimento das proteínas atrás do front de íons cloreto e a diminuição na sua taxa de migração, quando aproxima-se do front, resulta numa concentração das mesmas sob a forma de uma faixa estreita localizada entre íons glicinato e cloreto.

Quando a faixa protéica penetra no gel separador, sua taxa de migração diminui, devido à presença de poros menores nesse gel e isto permite que os íons glicinato alcancem às proteínas.

Ao cruzar a interface entre os géis concentrador e separador, os íons glicinato tomam-se completamente carregados novamente (carga total

igual a zero), não havendo, portanto, deficiência iônica. Assim sendo, a partir desse ponto haverá um campo de força constante através de todo o gel separador e a separação protéica ocorrerá como no processo normal descrito anteriormente.

A vantagem do processo descontínuo é a penetração das proteínas no gel separador sob a forma de uma faixa estreita. As bandas protéicas reveladas no gel, após o processo, serão muito mais compactas, o que aumenta a resolução da técnica (ALFENAS, et al., 1991; ANDREW, 1988; LEWIS, 1962; DAVIS, 1962; NEVILLE, 1971).

Um grande número de sistemas-tampão já foram desenvolvidos e, abrangem uma ampla faixa de pH com valores entre 3,5 e 9,5. Do mesmo modo, encontra-se no mercado diferentes sistemas que utilizam géis descontínuos que são comercializados sob a forma de "KITS" de eletroforese em tubos ou placas.

Algumas empresas, como a Pharmacia, dentre outras, oferece KITS com sistemas anódicos "Anodic Disc-Page" para proteínas ácidas ou neutras, bem como sistemas catódicos para proteínas básicas "Catodic Disc-Page".

5.2. Eletroforese em géis de acrilamida e SDS

A mobilidade das proteínas nos géis de acrilamida é função de sua carga total e do seu tamanho (peso molecular). Hipoteticamente, duas proteínas de diferentes pesos moleculares podem migrar em direção ao ânodo com a mesma taxa de migração, se suas diferenças, em função do tamanho forem compensadas pelas diferenças em relação à carga que possuem. Por esta razão, a eletroforese em gel de acrilamida, utilizando géis com um único tamanho de poro, não poderia ser utilizada para a separação de proteínas em função do seu peso molecular.

Uma segunda restrição às técnicas eletroforéticas seria quanto ao número de "formas" observadas no gel. As moléculas compostas e não covalentemente ligadas umas às outras, não se separariam durante a eletroforese. Por exemplo a RNA-polimerase (composta de três sub-unidades não idênticas) aparece como uma banda única, quando submetida aos processos de eletroforese normal ou descontínuo.

Para solucionar este problema, pesquisadores tentaram separar uma mistura protéica na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um detergente aniônico.

Em trabalhos preliminares, tentou-se determinar a mobilidade de 40 proteínas diferentes na presença de SDS. Empiricamente, esses pesquisadores observaram que a mobilidade destas proteínas era uma função linear do logaritmo dos pesos moleculares das mesmas.

Pesquisas posteriores evidenciaram que o SDS ligava-se às regiões hidrofóbicas das moléculas, promovendo assim a dissociação das mesmas em suas sub-unidades componentes. O SDS também pode ligar-se à regiões carregadas negativamente de polipeptídeos desnaturados e enovelados ao acaso. Este efeito do SDS mascara cargas que, normalmente estariam presentes na sua ausência (ANDREW, 1988; NEVILLE, 1981).

O sistema de eletroforese com dodecil sulfato de sódio (SDS) é utilizado na separação e caracterização do número e tamanho das cadeias polipeptídicas das proteínas.

As proteínas devem ser previamente desnaturadas por aquecimento em presença de 2-mercaptoetanol e SDS. O mercaptoetanol rompe as ligações dissulfeto (S-S) e os polipeptídeos adquirem a carga negativa do SDS. Assim, sua separação no gel dar-se-á apenas em função da diferença de seus respectivos tamanhos moleculares (peneiramento molecular). Marcadores de pesos molecular (proteínas de peso molecular conhecido) podem ser usados na determinação do peso de moléculas protéicas desconhecidas separadas pelo processo eletroforético.

Neste sistema, a mobilidade relativa de cada cadeia polipeptídica, dentro de certos limites, é função logarítmica de seus respectivos pesos moleculares (CLARK & SWITZER, 1977).

Na eletroforese descontínua também pode ser utilizado o SDS. Este procedimento apresenta grandes vantagens quando o volume da amostra a ser aplicado excede a 10 ou 20 μ L por tubo ou "poço" no gel.

O sistema tampão mais utilizado na técnica de eletroforese em géis de acrilamida /SDS foi desenvolvido por Laemmli (LAEMMLI, 1964).

As razões que explicam, precisamente, o sucesso desta técnica não foram ainda completamente elucidadas, mas ela é amplamente utilizada

nos experimentos de determinação dos pesos moleculares de macromoléculas e na determinação da composição (sub-unidades) de proteínas purificadas. Entretanto, ela não deve ser considerada universal, pois têm sido relatados alguns casos de informações incorretas que foram obtidas através do emprego desta técnica.

As proteínas muito grandes e as estruturais, como o colágeno, apresentam problemas quanto à utilização desta técnica (NEVILLE, 1971).

Embora a mobilidade das proteínas com pesos moleculares entre 12.000 e 70.000 daltons se comportem de maneira esperada, alguns desvios na linearidade são observados, quando se plota a mobilidade versus o logaritmo dos pesos moleculares das proteínas entre 40.000 e 20.000 daltons. Isto pode ser devido à utilização de quantidades insuficientes do agente que promove as ligações cruzadas no gel, a N-N'-metileno-bisacrilamida.

Quando esta técnica eletroforética é empregada na determinação do peso molecular de uma proteína, recomenda-se a utilização de, pelo menos, três ou quatro proteínas padrão (marcadores), cujos pesos moleculares sejam maiores e menores do que o peso molecular da proteína desconhecida. Este procedimento irá fornecer um gráfico linear dos pesos moleculares das proteínas padrão, onde a proteína desconhecida será posicionada (comparada), para que o seu peso molecular possa ser determinado (NEVILLE, 1971).

Alguns cuidados devem ser observados quando utiliza-se a eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS. Os sais de potássio devem ser evitados e os sais de sódio devem ser utilizados no lugar daqueles, pois o dodecil sulfato de potássio é quase insolúvel. Entretanto, o dodecil sulfato de sódio é insolúvel em temperaturas abaixo de 10°C.

5.3. Eletroforese em géis de agarose e acrilamida

O método mais recente e refinado em eletroforese é a utilização de géis complexos de acrilamida e agarose. Esta variação na técnica permite a separação de moléculas com peso molecular muito elevado (superior a 200.000 daltons), como por exemplo as moléculas de ácidos nucleicos. Os géis de acrilamida pura com poros suficientemente grandes para permitirem a migração dessas moléculas, teriam de ser preparados com

uma concentração muito baixa de acrilamida ($< 2,5\%$) e, assim, não se polimerizariam, inviabilizando sua utilização.

Poros maiores e menos rígidos são conseguidos através da adição de agarose ao géis de acrilamida. A agarose, um polissacarídeo linear, desempenhará a função de suporte físico no gel de acrilamida. Os géis de agarose-acrilamida são obtidos pela dissolução de agarose (0,05% concentração final) em água fervente, seguida de repouso até que a solução esfrie-se e atinja a temperatura de 40°C . Nesta temperatura, são adicionados os outros componentes necessários para a formação do gel de poliacrilamida desejado. A mistura é então transferida para os tubos ou placas, conforme desejado, os quais devem ser previamente aquecidos. O resfriamento deste gel é semelhante àquele dos géis de agar. Géis rígidos e altamente porosos são formados, mesmo na presença de baixas concentrações de acrilamida (0,5%).

A acrilamida deve polimerizar-se antes do endurecimento da agarose. Caso a agarose endureça primeiro, pode ocorrer a formação de gel com superfície irregular, o que promoverá a separação inadequada das macromoléculas.

Os géis de agarose-acrilamida têm sido utilizados na separação eletroforética de moléculas com alto peso molecular como por exemplo RNA (1×10^6 daltons) e DNA ($23,3 \times 10^6$ daltons). Estas moléculas são normalmente separadas e seus pesos moleculares empiricamente determinados através da utilização de géis de agarose/acrilamida (ANDREWS, 1988; TAKACS & KERESÉ, 1984).

5.4. Eletroforese bi-dimensional ou de focalização isoeletrica

Diversos autores têm afirmado que amostras contendo mais de 5.000 proteínas podem ser adequadamente separadas em "espécies" individuais de cada proteína utilizando-se a eletroforese bi-dimensional. Para a execução desta técnica, é necessário que a amostra seja submetida a uma "focalização Isoeletrica" prévia em gel de 1,0 mm de diâmetro em tubo capilar. A focalização isoeletrica é realizada de maneira semelhante à eletroforese, exceto sob o aspecto dos anfóteros serem eletroforizados através do gel antes da aplicação da amostra, afim de que seja estabelecido um gradiente de pH entre eles.

Quando as proteínas moverem-se em direção à base do tubo, encontrarão, continuamente, um ambiente de pH crescente. Ao atravessarem esse gradiente de pH, atingem, em algum ponto, um pH correspondente ao seu ponto isoelétrico. Neste ponto a carga total da proteína será igual a zero e ela interrompe seu movimento no campo elétrico, ao qual está sendo submetida. Concluída a focalização isoelétrica, o gel deve ser cuidadosamente removido do tubo capilar e colocado na superfície superior do gel de acrilamida em placa vertical.

A amostra "focalizada" será então submetida à eletroforese em gel de acrilamida-SDS, promovendo-se, assim, uma nova separação das proteínas, mas agora em função de seus pesos moleculares.

Como ponto isoelétrico e peso molecular de uma proteína não têm nenhuma relação, é possível obter-se uma melhor separação das proteínas utilizando-se estas propriedades.

As proteínas serão separadas na direção horizontal através da focalização isoelétrica e, na vertical, pela eletroforese em placas contendo gel de acrilamida-SDS.

Diferentes metodologias foram desenvolvidas utilizando-se essa técnica. Assim, recomenda-se uma primeira separação em gel homogêneo seguido de outra separação em gel com gradiente. O mais popular e versátil sistema é aquele que utiliza a focalização isoelétrica como uma primeira separação, seguida pela eletroforese em placas contendo gel de acrilamida-SDS com gradiente (CHOPRA, 1982).

5.5. Eletroforese capilar

O uso de microcapilares na eletroforese foi introduzido em meados dos anos 60, por Tiselius. Os constantes esforços no desenvolvimento de novas e sofisticadas técnicas analíticas, tais como a "capillary zone electrophoresis" (CZE) e a "capillary Isoelectric focusing" (CIEF), introduzidas por Hjertem, em 1985, oferecem maior eficiência e menor tempo do que o tradicional método de focalização isoelétrica em géis. Estas técnicas mostram-se altamente promissoras na separação de proteínas e biopolímeros (CROMPTON & BROWNLIE, 1988).

Atualmente, o grande sucesso destas técnicas analíticas advém da

associação de duas técnicas altamente sofisticadas: a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a eletroforese em capilares. A técnica denominada eletroforese capilar de alta performance (HPCE), reúne as vantagens das duas que deram-lhe origem. Utiliza pequenas quantidades de amostra, água como solvente ao invés dos solventes orgânicos e, como na técnica de HPLC, permite a recuperação das amostras. Com o emprego da HPCE tem-se alta resolução além de maior sensibilidade e rapidez das análises, tomando-se uma das técnicas mais promissoras para a análise de biomoléculas (BIORAD, 1983; EBY, 1989; MAZZEO & KRULL, 1992).

6. Detecção das macromoléculas separadas pela eletroforese.

Para a utilização das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida foi necessário o desenvolvimento de métodos que permitissem a visualização das macro moléculas separadas nos géis (ALFENAS et al., 1991; FERNANDEZ-PATRON et al., 1992). Dentre as técnicas de coloração existentes, aquela que utiliza o "coomassie brilliant blue R-250" é a mais difundida.

6.1. Coloração com "coomassie blue"

O "coomassie blue", substituiu o "amido black" na coloração de proteínas nos géis. O processo requer a fixação prévia das proteínas, durante 12 horas, em solução de ácido sulfosalicílico a 20%. A fixação das proteínas pode também ser feita utilizando-se solução de ácido tricloroacético (TCA) a 12%. Após a fixação, os géis são corados com solução aquosa de "coomassie blue" a 0,25%. O tempo de coloração depende da concentração de acrilamida no gel utilizado. Normalmente, o processo de coloração varia de uma a duas horas.

A coloração em excesso resulta na retenção de "background" entre as bandas protéicas. O excesso de corante pode ser removido através de sucessivas lavagens do gel com solução de ácido acético glacial a 7%.

Uma variação deste método consiste na fixação e coloração simultânea das proteínas. Uma solução é preparada dissolvendo-se 1,25g de "coomassie blue" numa mistura de 454ml de metanol a 50% e 46ml de ácido acético glacial. Esta solução corante deve ser filtrada antes de ser utilizada. Os géis serão mergulhados nesta solução por um período de até duas horas, dependendo da concentração do gel.

A descoloração dos géis é realizada através de sucessivas lavagens com solução composta de ácido acético glacial, metanol e água (50:200:750ml). Os géis descorados devem ser guardados em soluções de ácido acético entre 7,0% e 7,5%.

Os géis também podem ser descorados eletroforéticamente. Os géis corados são recolocados em tubos ou placas e, então, submetidos a uma segunda eletroforese com tampão cuja concentração seja mais elevada do que aquela utilizada no preparo do gel. Este procedimento reduz o tempo de descoloração e a coloração de fundo ("background") entre as bandas protéicas.

6.2. Coloração com nitrato de prata

O método de coloração utilizando o nitrato de prata é cerca de 100 vezes mais sensível do que o método que utiliza o "coomassie blue", para a detecção de proteínas separadas em géis de poliácridamida.

Este método é composto de várias etapas que são descritas a seguir:

1. o gel deve ser embebido em solução de glutaraldeído a 10%, por 30 minutos;
2. Enxaguar o gel com 1000ml de água destilada, por 10 minutos. Trocar a água de lavagem mais duas vezes. Deixar o gel embeber na última água de lavagem por, pelo menos, duas horas. Recomenda-se esta embebição pelo período de uma noite (12 horas);
3. após a drenagem da água de embebição, embeber o gel na solução amoniaca de prata (coloração). Para preparar 100ml desta solução, adicionar 1,4ml de hidróxido de amônia (NH_4OH) a 21ml de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,36%. Sob agitação vigorosa, adicionar vagarosamente 4,0ml de solução de nitrato de Prata (AgNO_3) a 19,4%. Um precipitado instável pode se formar. Após sua dissolução,

adicionar o volume de água destilada necessário para completar o volume da solução corante (100ml). Para obter uma coloração adequada e evitar a aderência do gel às paredes do recipiente de coloração, a quantidade de solução corante utilizada deve ser suficiente para que o gel flutue na mesma. Para evitar a deposição da prata sob a superfície do gel, esta etapa de coloração não deve ultrapassar 15 minutos e deve ser realizada sob agitação do recipiente contendo o gel e a solução corante. Como a solução amoniacal de prata pode tornar-se explosiva com a evaporação, deve ser descartada imediatamente após sua utilização;

4. decorrido o tempo de coloração, remover o gel da solução corante e transferi-lo para outro recipiente contendo água destilada, também em volume suficiente para que o gel flutue. Deixar o gel na água por dois minutos sob agitação; e
5. em seguida, transferir o gel para o outro recipiente contendo solução recém preparada de ácido cítrico 0,005% e formaldeído 0,019%. A solução de formaldeído é preparada a partir de "solução mãe" de formaldeído a 38% contendo 10% a 15% de metanol. As proteínas coradas tornar-se-ão visíveis nesta última etapa do processo. Normalmente, o gel é removido dessa solução, quando um "background" escuro começa a formar-se. Entretanto, as bandas protéicas muito delgadas apenas tornam-se visíveis quando um forte "background" é formado.

Após esta etapa o gel deve ser lavado por, pelo menos, uma hora, sob agitação, procedendo-se a troca da água de lavagem por três vezes.

Os géis super-corados podem ser descorados utilizando-se solução preparada com fixador rápido Kodak, diluído em água destilada na proporção de 1:4. É conveniente que a descoloração seja realizada após a quinta etapa do processo de coloração, ou seja, antes do processo de lavagem do gel.

A descoloração pode ser interrompida retirando-se o gel do recipiente contendo a solução descorante e transferindo-o para outro recipiente contendo solução hipo/clarificante Kodak, também preparada numa diluição 1:4, com água destilada.

Nos géis cuja concentração de acrilamida é superior a 10% o "background" formado pode ser excessivamente escuro. Entretanto, este problema pode ser minimizado fazendo-se uma pré-fixação do gel, utilizando uma solução de metanol a 50%, contendo 10% de ácido acético. A fixação deve ser feita por 30 a 60 minutos. Após a fixação, a solução fixadora é descartada e o gel deverá ser então embebido, por 12 horas, em uma solução contendo 5% de metanol e 7% de ácido acético.

6.3. Técnicas fluorescentes

Existem dois métodos fluorescentes para detecção de proteínas separadas em géis. O primeiro e mais sensível, utiliza a fluorescamina, um composto não fluorescente que reage especificamente com aminas primárias originando um produto fluorescente. Este método pode ser utilizado após a separação das proteínas no gel, ou antes da eletroforese, se o gel a ser empregado na separação contiver SDS.

Embora haja uma correlação direta entre a intensidade de fluorescência observada e a concentração de grupos amino, o grau de fluorescência não pode ser considerado como uma medida quantitativa da concentração protéica devido à variação no conteúdo de lisina existente nas proteínas e, também, porque ocorre uma redução na fluorescência com o passar do tempo.

O problema desta técnica, quando utilizada antes da eletroforese, no caso de géis contendo SDS, reside no fato da fluorescamina reagir com as proteínas de baixo peso molecular, que contém grandes quantidades de lisina. Esta ligação da fluorescamina com as proteínas de baixo peso molecular altera o peso molecular das mesmas e, nestas condições, a determinação do peso molecular de proteínas através da eletroforese fica comprometida.

O segundo método de detecção de proteínas em géis, empregando reações de fluorescência, utiliza o sulfonato de anilino-naftaleno (ANS) sob a forma de um sal de magnésio, não fluorescente em água, mas que apresenta fluorescência intensa quando dissolvido em solventes orgânicos, ou quando se liga às regiões hidrofóbicas superficiais das proteínas. Esta técnica é menos sensível e requer desnaturação prévia das proteínas, o que é conseguido através da incubação do gel por dois a cinco minutos em

solução 3 N de ácido clorídico. Em seguida, o gel é incubado com solução tampão do reagente de fluorescência (ANS) para a posterior detecção das bandas protéicas fluorescentes.

Esta técnica pode ser, também, empregada sem a prévia desnaturação protéica prévia, o que irá permitir a recuperação das proteínas em sua forma nativa, separadas no gel. Entretanto, na ausência de desnaturação ácida há uma redução de 10 a 20 vezes na sensibilidade do método.

6.4. Visualização de enzimas através de reações com substratos específicos

O método mais específico para detecção ou visualização de proteínas é aquele que localiza uma enzima em particular no gel. A maioria desses métodos consiste no acoplamento de uma reação catalizada enzimaticamente (direta ou indiretamente) com uma reação química que formará um produto (composto químico) insolúvel e intensamente colorido.

As vantagens desses métodos são a rapidez na qual as enzimas são visualizadas e a especificidade. Entretanto, podem ocorrer dois problemas. O primeiro seria a possibilidade de ocorrer coloração não específica e o segundo seria a instabilidade da coloração das bandas no gel. No primeiro caso, recomenda-se reações comprobatórias com outros substratos e no segundo, que se faça um registro permanente do gel através de fotografia, ou que se proceda a leitura do mesmo em densitômetro.

6.5. Visualização de macromoléculas

Nestas técnicas são utilizados o azul de alcian para corar glicoproteínas, o brometo de etídio para corar DNA e o azul de metileno e a pironina para corar RNA. Um corante relativamente novo foi, genericamente, denominado de "corante total" devido a sua capacidade de corar a maioria das macromoléculas. Este corante, uma carbocianina catiônica, cora o RNA de violeta azulado, o DNA de azul, as proteínas de vermelho, os mucopolissacarídeos ácidos de várias nuances do azul ao violeta e as fosfoproteínas de azul. Atualmente, é o corante mais utilizado na coloração de RNA.

6.6. Detecção de macromoléculas radioativas

A principal desvantagem dos métodos de coloração é a impossibilidade de quantificação das proteínas separadas e coradas no gel. A não ser que o laboratório possua um densitômetro para proceder a leitura dos mesmos. Com a utilização da técnica de detecção de macromoléculas marcadas o problema de quantificação foi superado. Além da quantificação de macromoléculas a utilização combinada de técnicas radioquímicas e eletroforéticas tem facilitado muito o estudo das vias metabólicas da síntese de macromoléculas, bem como dos mecanismos de controle destas vias. Após a separação eletroforética, as macromoléculas radioativas podem ser detectadas de três maneiras. A primeira e mais antiga delas, é através de autoradiografia, onde o gel, depois de seco entre duas folhas de papel celofane é colocado sobre um filme de raio X e pressionado entre duas placas. Após um período de tempo de exposição apropriado o filme de raio X é retirado e revelado. Assim, as áreas do filme que ficaram em contato com o material radioativo são expostas. É um método de custos reduzidos e especialmente útil para comparações qualitativas de proteínas separadas em géis de placa.

Para uma quantificação precisa, o gel deve ser dividido em pequenas porções correspondentes às bandas protéicas separadas no mesmo e a radioatividade presente, em cada porção, deve ser determinada em espectrômetro de cintilação. Os géis a serem analisados devem ser congelados e, então, fatiados com o auxílio de equipamento próprio, que possui lâminas e espaçadores entre as mesmas, que regulam a espessura dos cortes (até 1mm de espessura). Após o corte, as fatias do gel são removidos das lâminas com o auxílio de agulhas próprias e transferidas para os frascos do cintilador. Para a determinação da radioatividade, faz-se necessário a dissolução prévia do gel de poliacrilamida com solução de peróxido de hidrogênio a 30%, ou com base quaternária como solvente ou protocolo a 37°C por 12 a 16 horas. Após a dissolução do gel, o fluido de cintilação é adicionado e a radioatividade determinada.

O emprego deste método é parcialmente comprometido pelo fato do peróxido de hidrogênio ser um forte oxidante e agente carbonizante. Este inconveniente pode ser contornado através da substituição mol a mol da N, N' - metileno-bisacrilamida, na composição dos géis, pela N, N'-dialiltartarodiamida (DATD). Com esta substituição de componentes, os

géis tomam-se solúveis em solução de ácido periódico à 2%, num período de duas a três horas, em temperatura ambiente. O ácido periódico, nesta concentração, não reage com o líquido de cintilação nem oxida a amostra.

Entretanto, quando o DATD é utilizado, a polimerização completa do gel requer um período de tempo duas a três vezes maior do que quando a bis-acrilamida é utilizada e, em géis cuja concentração é inferior a 10%, não ocorre a relação linear entre a mobilidade e o log do peso molecular das proteínas separadas nesses géis. Em géis com concentração igual ou superior a 10%, a migração das proteínas é idêntica àquela quando a bisacrilamida é utilizada, ou seja, há relação linear entre a mobilidade e o log do peso molecular das proteínas que estão sendo separadas.

Uma maneira mais elaborada de fracionar os géis é através da utilização de um autodivisor de géis. Neste equipamento as "fatias" longitudinais do gel, correspondentes a cada conjunto de proteínas separadas (cada "poço"), são introduzidas em um tubo de vidro e, com o auxílio de pistão, são forçadas a passar por uma tela de malhas finas localizadas na extremidade do tubo de vidro. Os fragmentos de gel resultantes são lavados por uma corrente (fluxo) de solução tampão bombeada através da tela por uma bomba "tipo seringa". Como resultado, têm-se uma solução com partículas que representam, acuradamente, a disposição das macromoléculas no gel. Esta solução, contendo as partículas, é coletada em frascos, num coletor de frações, de modo que cada frasco contenha partículas do gel com 1mm a 2mm de espessura. Após a coleta das frações, 1ml de água destilada é adicionado a cada frasco que, em seguida, são congelados para facilitar a eluição das proteínas do gel. Na sequência, o líquido de cintilação é adicionado e a radioatividade, em cada frasco, é determinada. O fato do gel não ser solubilizado, não irá interferir no processo de determinação da radioatividade porque o material radioativo (macromoléculas) não estará no gel e sim dissolvido no fluido.

7. Considerações Finais

O rápido desenvolvimento das técnicas de eletroforese advém, principalmente, dos altos investimentos na pesquisa e desenvolvimento de aparelhos, técnicas analíticas e suas aplicações, realizados pelas grandes companhias especializadas.

Atualmente, pode-se adquirir no mercado diferentes sistemas de eletroforese integrados ou modulares, com altíssima eficiência, como por exemplo o HPE (High performance Electrophoresis), todos informatizados, inclusive com "softwares" próprios para as análises (REDMAN & JACOB, 1991).

Entretanto, até o momento, nenhuma empresa desenvolveu o equipamento adequado à todas as aplicações. Assim sendo, encontra-se disponível no mercado uma diversidade de modelos com diferentes performances para escolha, segundo as necessidades do usuário.

8. Bibliografia

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas Isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 241p.
- ANDREWS, A.T. **Electrophoresis: theory, techniques, biochemical and clinical applications**. Frome Somerset: Butter & Tanner, 1988. 452p.
- BIO-RAD. Capillary electrophoresis is here. **Laboratory Practice**, London, v. 38, n.4, p.13-14, 1983.
- CHOPRA, B. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of proteins. **Laboratory Practice**, London, v.12, p.1123-1131, 1982.
- CLARK JUNIOR, M.; SWITZER, L. **Experimental biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 1977. 355p.
- COOPER, T.G. Eletrophoresis. In: COOPER, T.G. **The tools of biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1977. Capítulo 6. p.194-234.
- CROMPTON, S.W.; BROWNLEE, R.G. Capillary electrophoresis. **Biotechniques**, Natick, v.6, p.432-439, 1988.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, London, v.195, p.281-283, 1962.
- EBY, M. The reality of capillary electrophoresis. **Biotechniques**, Natick, v.7, p.903-911, 1989.
- ELSHARKAWY, T.A.; HUISING, D. Identification of xantomonas species by acrylamide disc gel electrophoresis of soluble proteins **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, n.8, p.1049, 1968.
- FERNANDEZ-PATRON, C.; CASTELLANO-SERRA, L. Reverse staining of sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gels by imidazole zinc salts: sensitive detection of unmodified protein. **Biotechnique**, Natick, v.12, n.4, p.564-573, 1992.
- GORDON, A.H. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. London: Elsevier Science, 1975.
- HAMES, B.D. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. In: Hames, B.D.; Rickwood, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 8.ed. Oxford: IRL Press, 1980. p.1-90.
- LAEMMLI, U.K. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.121, p.321-349, 1964.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, London, v. 227, p.680-685, 1970.
- LARSEN, A.L. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, **Glycine max** (L.) Merrill. **Crop Science**, Madson, v.7, p.311-313, 1967.
- LEHNINGER, A.L. **Bioquímica: componentes moleculares das células**. 2.ed. São Paulo: Edgar Blucher, 1976. v.1. 262p.

- LEWIS, V.J.; WILLIAMS, D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, London, v.195, p.281-283, 1962.
- MAZZEO, J.; KRULL, I. Coated capillaries and additives for the separation of proteins by capillary isoelectric focusing **Biotechniques**, Natick, v.10, n.6, p.790-794, 1992.
- NEVILLE, D.M. Molecular weight determination of protein dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, p.6328-6334, 1971.
- OAKLEY, B.R.; KIRSEH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.105, p.361-363, 1980.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.250, n.10, p.4007-4021, 1975.
- ORNSTEINS, L. Disc electrophoresis - I. Background and theory. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York, NY. v. 121, p.321-349, 1964-65.
- PARKER, M. Working in harmony HPLC/HPCE **Laboratory Practice**, London, v.40, n.6, p. , 1991.
- POULIK, M.D. Starch gel electrophoresis in a continuous system buffer. **Nature**, London, v.180, p.1477-1479, 1957.
- REDMAN, T.; JACOBS, T. Electrophoretic gel image analysis software for the molecular biology laboratory. **Biotechniques**, Natick, v.10, n.6, p.790-794, 1991.
- SARGENT, J.R.; GEORGE, S.G. **Methods in zone electrophoresis**. England: BDH Chemicals, 1975. 219p.
- SHAW, C.R. Electrophoretic variation in enzymes. **Science**, Washington, v.149, p.936-943, 1965.
- SMITH, J.M.; POWELL, D.A. A disc gel electrophoresis comparison of protein patterns of **Erwinia amylovora** with other bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v.58, p.972-975, 1968.
- STEINER, W.M.; JOSLYN, D.L. Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitos. **Mosquito News**, Fresno, v.39, p.35-53, 1979.
- TAKÁCS, O.; KERESÉ, I. Electrophoretic methods. In: Keresé, I.; Calmers, R.A. **Method of protein analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p.87-158.
- WEBER, K.; OSBORN, M. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.244, 4406-4412, 1964.

IMPRESSO NO SETOR DE SERVIÇOS GRÁFICOS
do Centro Nacional de Pesquisa de Soja
Rod. Carlos João Strass (Londrina-Warta) - Acesso Orlando Amaral
Fone: (043) 320-4166 – Fax: (043) 320-4186 – Telex: 432208
Cx. Postal 231 – 86.001-970 – Londrina, PR

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

Aqui a ciência se transforma em tecnologia capaz de produzir milhares de toneladas de alimentos no campo.

TEMOS O QUE VOCÊ PROCURA

Tecnologias

que permitem a exploração econômica e racional das propriedades agrícolas

Serviços

que levam à qualidade da produção

Produtos

que asseguram a eficiência das técnicas geradas por nossos cientistas.

*Conheça a pesquisa brasileira de soja.
Venha falar conosco!*

Área de Difusão de Tecnologia, Marketing e Comercialização

TECNOLOGIAS: CULTIVARES PRODUTIVAS ❖ MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS ❖ SOJA NA ALIMENTAÇÃO ❖ MANEJO DE PLANTAS DANINHAS ❖ ROTAÇÃO DE CULTURAS ❖ MANEJO DE SOLOS ❖ SERVIÇOS: ORIENTAÇÃO TÉCNICA ❖ ANÁLISES LABORATORIAIS ❖ CONSULTORIAS ❖ CURSOS ❖ PALESTRAS ❖ PRODUTOS: PUBLICAÇÕES TÉCNICAS

CNPSo: Busca de soluções, compromisso com o homem



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo

Rod. Carlos João Strass ♦ Londrina/warta ♦ fone (043) 320-4166 ♦
fax (043) 320-4186 ♦ cx. postal 231 ♦ 86001-970 ♦ londrina, pr

