

A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas

Imagem: Embrapa Trigo



Sandra Patussi Brammer¹



Introdução

A eletroforese é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Introduzida por Tiselius em 1937, a qual foi inicialmente realizada em meio líquido, sendo posteriormente aperfeiçoada com o emprego de um meio-suporte (Acquaad, 1992). Na década de 1950, a técnica recebeu impulso e aperfeiçoamento, a partir dos experimentos de Smithies (1955) e de Hunter & Market (1957), havendo forte aceitação nas décadas posteriores, tornando-se indispensável nas mais diversas áreas da biologia molecular.

Segundo Torggler et al. (1995), antes do uso da eletroforese o estudo da variação genética em populações naturais era limitado, pois dependia da identificação de mutantes recessivos raros, que, quando em homozigose, apresentavam mudanças morfológicas visíveis.

É aplicada na análise de enzimas, de proteínas e ácidos nucleicos e tem sido amplamente usada em estudos de taxonomia, bioquímica, fisiologia e genética humana, de plantas, de animais e de microrganismos. Em virtude de seu acervo informativo, apresenta grande potencial para caracterização e identificação de fungos, bactérias, vírus, nematóides, cultivares e linhagens de plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos, em estudos de interação patógeno-hospedeiro, além das inúmeras áreas da genética médica e forense (Tanksley & Orton, 1983; Alfenas et al., 1999; Acquaad, 1992; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Atualmente, a eletroforese está sendo usada para determinação e caracterização de moléculas de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA. Recentes progressos na tecnologia do DNA recombinante, no mapeamento de fragmentos e no seqüenciamento de nucleotídeos, oriundos de fragmentos de ácidos nucleicos, têm

¹ Pesquisadora da Embrapa Trigo, Caixa Postal 451, 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: sandra@cnpt.embrapa.br

permitido avanços expressivos e maior precisão dos resultados (Elder & Southern, 1983; Walker & Rapley, 1999).

Princípios da técnica de eletroforese

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico (Fig. 1). Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo). A carga líquida das moléculas é função somatória dos aminoácidos que as constituem. Em razão das proteínas serem substâncias anfóteras, ou seja, capazes de adquirirem carga positiva ou negativa em função do pH, é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, pelo uso de soluções-tampão.

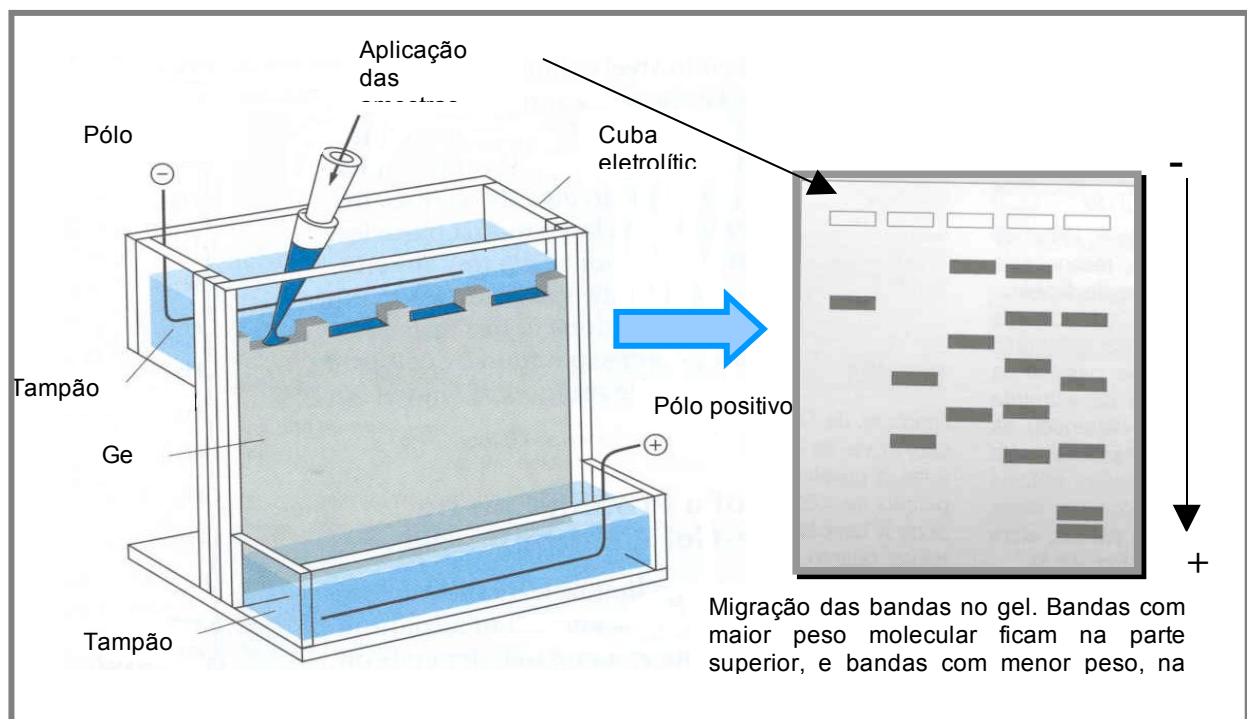


Fig. 1. Representação esquemática da eletroforese.

O sistema-tampão usado consiste em duas partes: o tampão do gel usado na preparação do gel e o tampão do tanque, ou cuba eletrolítica, na qual se encontram os eletrodos (ânodo e cátodo). Nos tampões dos tanques e do gel, a corrente elétrica é conduzida por íons, e nos eletrodos, por elétrons. Na presença de um sistema-tampão adequado, a hidrólise da água, que se dá na superfície dos eletrodos, permite a troca entre elétrons e íons.

A eletroforese pode ser conduzida em solução com gradiente de densidade ou em diferentes meios-suporte, tais como papel de filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose, gel de agarose, amido ou poliácridamida, entre outros. O suporte deve ser química e fisicamente inerte, de modo a não interferir na mobilidade das moléculas. No caso de eletroforese em géis, especialmente de poliácridamida, a migração das moléculas é profundamente influenciada pelas malhas (poros) do gel.

Em relação a géis de poliacrilamida ou agarose, a porosidade do gel determina o poder de resolução das bandas, sendo este geralmente decorrente do grau de polimerização entre os monômeros. Géis de poliacrilamida são freqüentemente usados para análises de alta resolução (seqüenciamento de DNA/RNA) em análises protéicas e isoenzimáticas que requeiram maior definição das bandas. Géis de agarose também são amplamente usados na separação de DNA/RNA (Walker & Rapley, 1999).

Para que a técnica funcione, deve ser desenvolvida sob voltagem (V), corrente (I) e potência (W) constantes, fornecidas por uma fonte apropriada de energia que tem por princípio converter a corrente alternada em corrente contínua. Além disso, depende de vários fatores, muitos deles oriundos da maneira e das condições que a técnica é conduzida, embora algumas condições mínimas sejam requeridas para seu sucesso.

A velocidade da migração da molécula é proporcional ao campo elétrico e à sua carga líquida e é inversamente proporcional ao seu raio, à distância entre os dois eletrodos e à viscosidade do meio. Uma vez que cada molécula possui sua própria carga e seu próprio tamanho, ela se deslocará sempre numa determinada distância de campo elétrico num dado espaço de tempo. Assim, se uma amostra for submetida à eletroforese, espera-se que cada molécula se concentre numa estreita faixa (banda) no gel. À medida que as moléculas migram no campo elétrico, a resistência da solução geralmente aumenta.

A temperatura também é fator a ser considerado. Quanto mais alta a voltagem ou a intensidade da corrente, maior será o aumento de temperatura. No caso de eletroforese de isoenzimas, temperaturas elevadas podem desnaturar as enzimas, o que, eventualmente, resulta na perda da atividade enzimática. Visando a manter a temperatura baixa durante a eletroforese, o gel pode ser resfriado com auxílio de uma coluna de água fria, em dispositivo apropriado inserido na cuba ou efetuando-se corrida em ambiente refrigerado a 4 °C.

Para que haja migração das moléculas, empregam-se extratos protéicos, DNA, RNA ou qualquer outro tipo de amostra obtido por maceração do tecido, a ser analisado, em soluções-tampão apropriadas. Quantidades mínimas são necessárias para separação das moléculas que são aplicadas no gel e submetidas à eletroforese. A seguir, os géis são removidos das placas (gel de poliacrilamida) ou fatiados (gel de amido) e revelados, visando detectar a presença de proteínas totais, enzimas específicas, DNA ou RNA.

Para proteínas, geralmente os géis são imersos numa solução de "coomasie blue", como corante, e, para enzimas, os géis são incubados em solução específica, contendo os componentes (substrato, coenzimas, solução-tampão e sais) necessários para a revelação das bandas de atividade enzimática. O conjunto das bandas nos géis é denominado Zimograma, que pode ser representado por fotografias ou esquemas.

No caso de moléculas de DNA ou de RNA, vários são os sistemas de revelação das bandas. Estes são consequência dos corantes usados. Quando se usa o corante brometo de etídio no gel ou na amostra, a detecção das bandas é feita através da fluorescência, emitida por esse corante, em presença da luz ultravioleta. Pode-se, também, detectar as bandas através de radioatividade, de nitrato de prata e de quimiluminescência. A escolha é feita a partir do tipo de técnica que se deseja empregar ou da conveniência e praticidade em cada laboratório (Fig. 2).

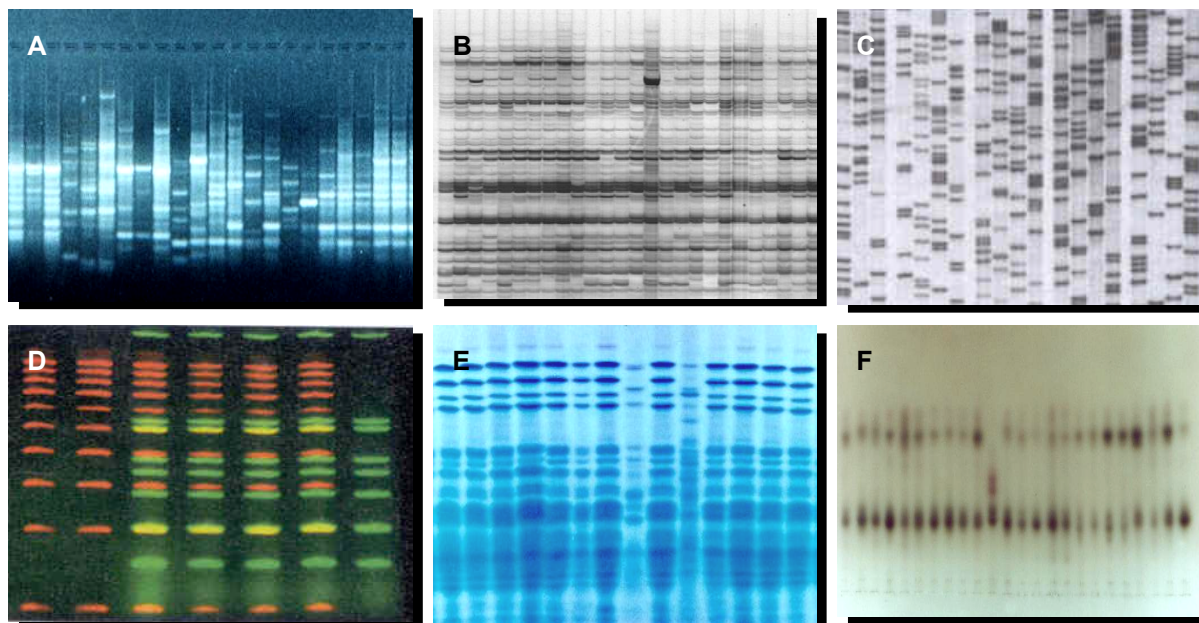


Fig. 2. Diferentes sistemas de revelação dos géis: **a)** brometo de etídio; **b)** nitrato de prata; **c)** raio – X; **d)** quimiluminescência; **e)** coomassie blue e **f)** fast blue BB salt, α e β naftil acetato.

Sistemas de eletroforese

Quanto à posição do gel, o sistema de eletroforese pode ser vertical ou horizontal (Fig. 3), e, quanto à porosidade, pode ser contínuo ou descontínuo. No sistema contínuo, o gel é de porosidade uniforme e o tampão usado na sua preparação é o mesmo empregado na cuba eletrolítica. No descontínuo, há dois sistemas de géis: o gel concentrador e o gel separador, e a solução-tampão empregada no preparo dos géis e das amostras é diferente da do tampão usado na cuba (Hames, 1981; Alfenas et al., 1999).

A eletroforese também pode ser realizada de forma unidirecional ou bi-direcional. No primeiro caso, a passagem da corrente elétrica dá-se em sentido único, enquanto que no segundo, são emitidos pulsos elétricos em mais de um sentido.



Fig. 3. Sistemas de eletroforese quanto à migração das amostras: **A e B** –horizontal, **C e D** – vertical.

Aplicações em análises enzimáticas

As isoenzimas têm sido amplamente empregadas como marcadores genéticos, e suas aplicações vão desde a genética de microrganismos até a genética humana. Apresentam-se como marcadores interessantes para o estudo genético, porque elas são o produto primário dos genes estruturais. Mudanças na seqüência de bases codificadoras, na maioria dos casos, resultarão em mudanças na estrutura primária da proteína correspondente (Scandalios, 1979; Shields et al., 1983).

Isoenzimas separadas eletroforéticamente têm sido usadas para a reconstrução da história evolutiva das espécies, sendo, por outro lado, uma ferramenta taxonômica capaz de caracterizar variantes individuais de uma espécie, apresentando grande valia na sistemática de raças, espécies e gêneros estreitamente relacionados.

Análises eletroforéticas em plantas e animais mostram que padrões de isoenzimas e a intensidade relativa dos eletromorfos são espécie-específica para órgãos ou tecidos e para estágio de desenvolvimento. O estágio de desenvolvimento em que as isoenzimas aparecem ou desaparecem refletem a ativação ou repressão de genes que controlam a síntese das enzimas.

Aplicações em análises protéicas

A grande maioria das análises protéicas é realizada através do sistema de eletroforese denominado *SDS*, na qual se usa o detergente dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”). Basicamente, a proteína é desnaturada por aquecimento na presença de 2-mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto, e os polipeptídios adquirem a carga negativa do SDS. A separação no gel dá-se unicamente pela diferença dos pesos moleculares (Alfenas et al., 1999).

Um exemplo importante de eletroforese nas análises protéicas é um grupo de proteínas de reserva do trigo, constituídas por subunidades de gluteninas de alto e baixo peso molecular. Essas subunidades auxiliam na escolha de genótipos de trigo com maior potencial para panificação. Apresentam-se poliméricas e representam a classe de proteínas que mais contribui para a viscoelasticidade na produção da massa de panificação. São codificadas por genes do loco *Glu-1* localizados no braço longo dos cromossomos 1A, 1B e 1D. Desse modo, é amplamente aceito que a qualidade tecnológica de trigo é determinada, principalmente, pela fração das proteínas do grão que formarão o glúten, a qual é extremamente influenciada pelos alelos dos locos que codificam essas proteínas, revestindo-se de grande importância prática identificação desses alelos (Payne et al., 1984; Caldeira et al., 2000).

Aplicações em análises de DNA e RNA

A partir da ampla variedade de estratégias de separação de proteínas disponível, a eletroforese tornou-se o primeiro princípio explorado para separação de fragmentos de DNA e RNA. A migração eletroforética de ácidos nucléicos é amplamente empregada em técnicas de biologia molecular, para separar, isolar e manipular fragmentos de DNA/RNA.

Tais moléculas são relativamente simples quimicamente, de modo que apenas tamanho, conformação e composição de duplex podem ser usados para manejo eletroforético. O sentido da migração dos ácidos nucléicos é sempre em direção ao ânodo ou pólo positivo, pois possuem carga total negativa decorrente de seus grupamentos de fosfato. Além disso, em presença de tampões adequados, que permitem a desnaturação das conformações secundárias ou terciárias, fragmentos lineares pequenos, bem como fitas simples, migram mais rapidamente do que os longos e os de fita dupla (Walker & Rapley, 1999).

Os autores acima destacam que várias são as técnicas eletroforéticas usadas na separação dos fragmentos de DNA/RNA. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) emprega gradientes de desnaturantes químicos, a eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) refere-se a gradientes de temperatura e a eletroforese em gel com campo em pulso/inverso (PFGE/IFGE) refere-se a gradientes elétricos.

Referências bibliográficas

- Acquaad, G. **Practical protein electrophoresis for genetic research**. Portland: Discorides Press, 1992. 131p.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1999,

242p.

- CALDEIRA, M. T. M.; LIMA, V. L. A.; SEKI, H. A.; RUMJANEK, F. D. Trigo. **BIOTECNOLOGIA Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.44-48, 2000.
- ELDER, J. K.; SOUTHERN, E. M. Measurement of DNA length by gel electrophoresis II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length. **Anal. Biochem.**, v. 128, p. 227-231, 1983.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- HAMES, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B.D & Rickwood, D. (eds.). **Gel electrophoresis of proteins**. Oxford. IRL Press Limited, 1981, p. 1-91.
- HUNTER, R. L.; MARKET, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**. v. 125, p. 1294-1295, 1957.
- PAYNE, P. I.; JACKSON, E. A.; HOLT, L. M.; LAW, C. N. Genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.67, p.235-243, 1984.
- SCANDALIOS, J. G. Control of gene expression and enzyme differentiation. In: **Physiological Genetics**. 1979, p. 63-107.
- SHIELDS, C. R.; ORTON, T. J.; STUBER, C. W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: Tanksley, S. D. & Orton, T. J (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983, p. 443-468.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. **Biochem. J**. v. 61, p.629-641, 1955.
- TANKSLEY, S. D ; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983, 516p.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas – Variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995, p. 186.
- WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, p.334.



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: **Rainoldo Alberto Kochhann**

Arcênio Sattler, Ariano Moraes Prestes, Cantídio Nicolau Alves de Sousa, Delmar Pöttker, Gilberto Rocca da Cunha, João Carlos Haas, José Roberto Salvadori, Osmar Rodrigues

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Sônia Mognon

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 13 p. html, 3 fig. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 6). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm