

# AJUSTE DE METODOLOGIA DA ELETROFORESE DE PROTEÍNAS PARA OBTENÇÃO DE FENÓTIPOS ISOENZIMÁTICOS DE MORANGA

ANTONIO TEIXEIRA DO AMARAL JÚNIOR <sup>(1)</sup>, VICENTE WAGNER D. CASALI <sup>(2)</sup>,  
CARLOS FLORIANO DE MORAES <sup>(2)</sup> e MARIA APARECIDA N. SEDIYAMA <sup>(2)</sup>

## RESUMO

Modificações no procedimento eletroforético foram introduzidas para uma satisfatória obtenção de fenótipos isoenzimáticos de moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne). Extratos de folhas definitivas de oito acessos de moranga foram submetidos à análise eletroforética para revelação dos seguintes sistemas: esterase (EST); fosfatase ácida (ACP); transaminase do glutamato oxaloacetato (GOT), desidrogenase do malato (MDH) e peroxidase (PO). Os resultados apontaram a ineficiência do tampão extrator utilizado e satisfatória qualidade do gel de amido de milho nas resoluções dos sistemas EST, ACP, GOT e MDH. Para o sistema PO, adequado efeito de peneiramento molecular só foi possível com a utilização do amido hidrolisado de batata (Sigma). Ajustes no tempo de cozimento do gel, manuseio da corrente elétrica, preparo de soluções corantes e tempo de revelação indicaram os melhores protocolos ao procedimento eletroforético.

**Termos de indexação:** moranga, *Cucurbita maxima* Duchesne, eletroforese, isoenzimas.

## ABSTRACT

### ADJUSTMENT OF THE METHODOLOGY OF PROTEIN ELECTROPHORESIS TO OBTAIN ISOZYMATIC PHENOTYPES OF PUMPKIN

Changes in the electrophoresis procedures were introduced to obtain a better isozymatic phenotypes of pumpkin (*Cucurbita maxima* Duchesne). Extracts of eight access of pumpkin's leaves were subjected to electrophoresis analysis in order to reveal the following systems: esterase (EST), acid phosphatase (ACP), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), malato dehydrogenase (MDH) and peroxidase (PO). The results pointed out the inefficiency of the extractor buffer used, and the satisfactory quality of maize starch gel electrophoresis in the resolution of EST, ACP, GOT and MDH systems. For PO system a better effect of "molecular sieving" was only possible when potato starch gel (Sigma) was used. Adjusting the starch cooking time, handling the electric current, preparing the staining solutions and revealing time indicated the best protocol to the electrophoresis process.

**Index terms:** pumpkin, *Cucurbita maxima* Duchesne, electrophoresis, isozymes.

---

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 25 de novembro de 1993 e aceito em 27 de maio de 1994.

<sup>(2)</sup> Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa (MG).

## 1. INTRODUÇÃO

Grande avanço na área da genética bioquímica, nos últimos anos, foi possível pelo uso da eletroforese de proteínas (Gottlieb, 1977, Barros, 1991).

A eletroforese é um processo de difusão forçada, num campo elétrico, através de um meio-suporte, em que uma corrente contínua é empregada para separar as isoenzimas (diferentes formas moleculares de uma mesma enzima), com base nos efeitos de peneiramento molecular e diferenças de cargas eletrostáticas (Brewer & Sing, 1970; Tanksley & Orton, 1983; Pasteur et al., 1988).

O procedimento eletroforético tornou-se um poderoso instrumento na separação e identificação de enzimas, quando foi combinado, por Hunter & Markert (1957), com o uso de corantes, o que permitiu a identificação de enzimas particulares entre inúmeras que possam estar presentes em um extrato de tecido (Brewer & Sing, 1970; Barros, 1991).

Em relação à moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne), poucas investigações sobre isoenzimas têm sido realizadas, tanto no desenvolvimento da técnica quanto no emprego em estudos genético-bioquímicos (Tanksley & Orton, 1983).

Embora de fácil condução, o método eletroforético requer adaptações para a espécie vegetal com que se está trabalhando, particularmente a escolha de tecido mais adequado a ser analisado, diante dos objetivos do estudo (Alfenas et al., 1991; Oliveira, 1992). Geralmente, algumas modificações devem ser introduzidas, visando à obtenção de zimogramas com resolução que permita a clara identificação dos fenótipos obtidos. Esse foi precisamente o objetivo do presente trabalho envolvendo alguns sistemas isoenzimáticos da moranga.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de bandas dos sistemas enzimáticos de esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), transaminase do glutamato oxaloacetato

(GOT), desidrogenase do malato (MDH) e peroxidase (PO), foram utilizados oito acessos de moranga, de diversas procedências, do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (Quadro 1).

Quadro 1. Acessos de moranga com as respectivas codificações e procedências

Acessos	Procedências
BGH 1908	Aimorés (MG)
BGH 4520	EMBRAPA - Brasília (DF)
BGH 5458	ESALQ - Piracicaba (SP)
BGH 5615	EMBRAPA - Brasília (DF)
BGH 5618	Ceará
BGH 5628	Ceará
BGH 5642	EMBRAPA - Brasília (DF)
BGH 6158	EMPASC (SC)

Amostras de cerca de 1,0 g da terceira folha definitiva foram coletadas de cada planta apresentando quatro folhas definitivas e maceradas imediatamente em almofariz, recebendo, parte das amostras, 2,0 ml do tampão extrator 0,1 M Tris-HCl (pH 7,2), PVP a 40% e  $\beta$ -mercapto-etanol a 0,1%, enquanto as demais não receberam tampão extrator. O extrato de cada amostra, após filtrado em lenço de papel, foi absorvido em tiras de papel cromatográfico Whatman 3 MM, medindo 10 x 4 mm e imediatamente recolhidas em tubos Eppendorf, que foram armazenados em "ultrafreezer", a  $-85^{\circ}\text{C}$  por 70 dias. A eletroforese foi conduzida em géis de amido de milho e de amido hidrolisado de batata (Sigma). No preparo dos últimos, utilizou-se o procedimento sugerido por Alfenas et al. (1991). Para tanto, cozinhou-se até a fervura, em fogo com chama baixa, 39 g de amido hidrolisado de batata em 300 ml de solução-tampão do gel, em frasco Kitasato. A suspensão de amido foi vertida em fôrma de acrílico, procurando evitar a formação de bolhas. Em relação aos géis de amido de milho, utilizou-se o proposto por Conckle et al. (1982), modificando-se apenas o tempo de cozimento. Neste, 42 g de amido

de milho foram adicionados a 350 ml da solução-tampão, em frasco de Erlenmeyer, que foi submetido ao cozimento, em fogo com chama baixa, durante quatro minutos para os sistemas EST, ACP, GOT e PO, e seis minutos para o MDH. O gel resultante foi vertido em fôrma de acrílico e, esta, coberta com uma placa de vidro recém-aquecida a fim de uniformizar a superfície e evitar o excesso de evaporação. Os sistemas tampão gel/eletrodo utilizados foram os propostos por Shaw & Prasad (1970) para esterase (EST) e desidrogenase do malato (MDH), e Soltis et al. (1983) para a fosfatase ácida (ACP), transaminase do glutamato oxaloacetato (GOT) e peroxidase (PO).

As tiras com as amostras foram aplicadas nos géis e procedeu-se a uma pré-corrída, em balcão frigorífico a 4°C, com a corrente constante a 150 V por 30 minutos. Após, retiraram-se as tiras e ajustou-se a voltagem para 300 V, exceto para o sistema peroxidase (PO), em que se empregou a de 200 V. As voltagens permaneceram constantes até o final da corrida, quando a anilina indicadora percorreu 8 cm a partir da origem.

A solução de revelação da esterase (EST) constituiu-se de 20,0 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, 20,0 mg de  $\beta$ -naftil acetato, 50,0 mg de "fast blue RR salt", 5,0 ml de tampão fosfato de 1,0 M (pH 6,0) e 45,0 ml de água destilada. Na obtenção dessa solução, dissolveu-se o "fast blue RR salt" na água destilada e, em seguida, adicionou-se o substrato ( $\alpha$ ,  $\beta$ -naftil acetato) e o tampão. Para o preparo da solução de coloração da fosfatase ácida (ACP), dissolveram-se 45,0 mg de "fast garnet GBC salt" em 50,0 ml de tampão acetato (0,008 M de acetato de sódio; 0,06 M de ácido acético), pH 5,0, e adicionaram-se 90,0 mg de  $\alpha$ -naftil fosfato ácido de sódio, 20,0 mg de cloreto de magnésio, 125,0 mg de PVP-40 a 10% e 500,0 mg de cloreto de sódio. Na coloração da transaminase do glutamato oxaloacetato (GOT), dissolveram-se 100,0 mg dos ácidos L-aspártico e  $\alpha$ -ceto glutárico em 90,0 ml de água destilada e 100,0 ml do tampão triscitrato (0,2 M), pH 8,0. O pH foi ajustado

para 8,0 com NaOH, adicionando-se, em seguida, 5,0 mg de piridoxal 5'-fosfato e 100,0 mg de "fast blue RR salt" (Soltis et al., 1983). A coloração desidrogenase do malato (MDH) foi obtida pela adição de 15,0 mg de NAD<sup>+</sup>, 1,0 mg de PMS, 15,0 mg de MTT, 1,8 ml de Na-L malato 0,1 M (pH 7,0), 1,3 ml de NaCN, 7,5 ml de tampão triscitrato 0,5 M (pH 7,1) e 35,0 ml de água destilada. Para a peroxidase (PO), a coloração foi obtida pela adição de 50,0 mg de 3-amino-9-etil-carbazole, 5,0 ml de dimetilformamida, 0,5 ml de água oxigenada a 3%, 92,5 ml de tampão acetato de sódio (0,05 M) pH 5,0 e 2,0 ml de cloreto de cálcio (0,1 M) (Shaw & Prasad, 1970).

A revelação da peroxidase (PO) foi realizada em refrigerador, a 4°C, por duas horas, enquanto as demais enzimas foram reveladas a 37°C no escuro, por 2h30min, à exceção da esterase (EST), para a qual se utilizaram 3h30min.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tampão extrator mostrou-se ineficaz na inativação de metabólicos secundários, uma vez que a revelação dos sistemas com e sem a sua utilização apresentaram resolução com qualidades similares. Ademais, amostras com tampão extrator armazenadas no "ultrafreezer" tenderam a apresentar uma crescente redução na nitidez das bandas isoenzimáticas. Entre as enzimas testadas, as isoenterases foram as mais sensíveis, pois foi constatado polimorfismo nas análises efetuadas com amostras coletadas no mesmo dia, ao contrário das armazenadas no "ultrafreezer", em que a variabilidade não se expressou. Por conseguinte, sugere-se a avaliação de tampões extratores mais complexos, que possam assegurar a viabilidade das amostras destinadas ao armazenamento.

O meio-suporte, constituído de amido de milho, mostrou qualidades satisfatórias na separação das bandas isoenzimáticas dos sistemas esterase, fosfatase ácida, transaminase do glutamato oxaloacetato e desidrogenase do malato (Figura 1), de forma semelhante ao obtido com

o amido hidrolisado (Sigma). Em relação à peroxidase (Figura 1), os géis de amido de milho não permitiram adequado efeito de peneiramento molecular, mostrando bandas indefinidas, caracterizadas por arraste, principalmente na parte superior dos géis.

Com relação ao tempo de cozimento do gel, constatou-se que o período de quatro minutos para a desidrogenase de malato proporcionou géis quebradiços, de difícil manuseio. O cozi-

mento por seis minutos melhorou sensivelmente a qualidade do meio-suporte, permitindo a obtenção de géis translúcidos, transparentes e elásticos.

A pré-corrida, inicialmente realizada a 200 V, proporcionou excessivo arraste de bandas em todos os sistemas avaliados, talvez em decorrência de excessiva liberação das proteínas das tiras para o gel, o que foi contornado pela redução da corrente para 150 V.

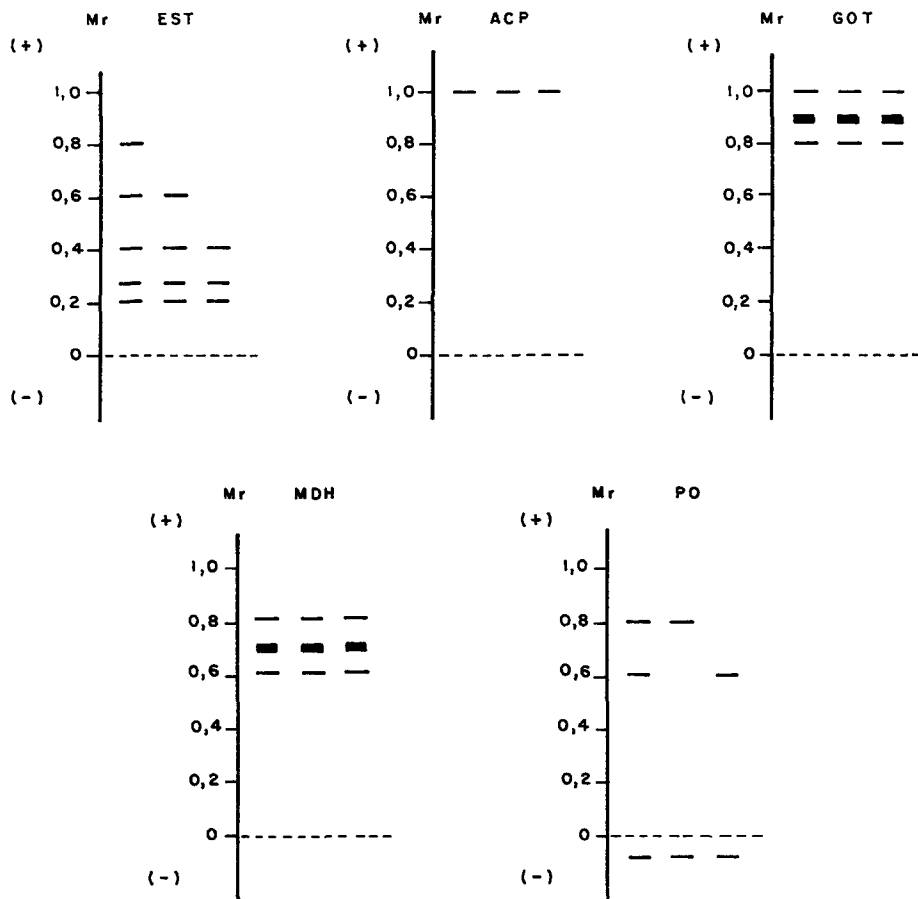


Figura 1. Representação esquemática dos fenótipos isoenzimáticos da esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), transaminase do glutamato oxaloacetato (GOT) e desidrogenase do malato (MDH) em géis de amido de milho, e da peroxidase (PO) em géis de amido hidrolisado de batata (Sigma), em acessos de moranga.

O posterior ajuste da voltagem para 200 V, utilizada no sistema peroxidase, permitiu melhor concentração das bandas isoenzimáticas, do que a de 300 V, que se mostrou mais adequada para os demais sistemas.

As modificações implementadas nos protocolos de coloração para os sistemas esterase, fosfatase ácida e malato desidrogenase, melhoraram sensivelmente a resolução das bandas isoenzimáticas. Em relação à desidrogenase do malato, por exemplo, a redução de Na-L malato e NaCN para 1,80 e 1,30 ml respectivamente, tornou as bandas mais definidas, sem sobreposição e com reduzido arraste. De forma semelhante, acentuada melhoria na resolução da esterase e fosfatase ácida foi obtida com a adoção de 40,0 mg de "fast blue RR salt" e 45,0 mg de "fast garnet GBC salt" respectivamente. Cabe ressaltar que, para a desidrogenase do malato, a substituição do dimetiltiazol difeniltetrazólio (MTT) por *Nitro blue* tetrazólio (NBT) resultou em bandas praticamente inidentificáveis.

Os sistemas isoenzimáticos revelados no escuro, a 37°C por 2h30min, apresentaram bandas de resolução satisfatória, exceto para o sistema esterase, onde esse tempo foi insuficiente para a identificação de bandas, na metade superior do gel, de interesse na discriminação genotípica, em face do polimorfismo constatado. Entretanto, passando para 3h30min, a visualização dessas bandas tornou-se bem nítida. Períodos de revelação superiores produziram bandas superpostas, impossibilitando a identificação de polimorfismo.

#### 4. CONCLUSÕES

As modificações introduzidas na eletroforese de isoenzimas permitiram as seguintes conclusões:

1. O tampão extrator mostrou-se inócuo na manutenção da atividade das amostras armazenadas do "ultrafreezer", principalmente para o sistema esterase;

2. A realização da pré-corrída a 150 V, em vez de 200 V, possibilitou menor arraste de bandas, em todos os sistemas testados;

3. O tempo de seis minutos de cozimento dos géis melhorou sensivelmente a qualidade da resolução desidrogenase do malato;

4. A substituição do MTT por NBT, na coloração da desidrogenase do malato, conduziu à obtenção de bandas praticamente inidentificáveis;

5. Os géis de amido de milho apresentaram qualidades propícias às corridas eletroforéticas, com boa elasticidade, transparência e translucidez, verificando-se resolução semelhante à obtida em géis de amido hidrolisado de batata (Sigma) nos sistemas EST, ACP, GOT e MDH.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, Universidade Federal, 1991. 242p.
- BARROS, L.M. *Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (Anacardium occidentale L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas*. Piracicaba, 1991. 256p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ-USP, 1991.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. *An introduction to isozyme techniques*. New York, Academic Press, 1970. 186p.
- CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C. *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Washington, USDA-Forest Service, 1982. 18p. (General technical report, PSW-64)
- GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant systematic. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, St. Louis, **64**(2):161-180, 1977.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis in starch gel. *Science*, Washington, D.C., **125**:1294-1295, 1957.
- OLIVEIRA, A.C.B. *Isozimas na identificação de génotipos de soja [Glycine max (L.) Merrill]*. Viçosa, 1992. 87p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)-UFV, 1992.

- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, G.; CATALAN, J. & BRITTON-DAVIDIAN, J. *Practical isozyme genetics*. New York, Halsted Press, 1988. 215p.
- SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, New York, 4:297-320, 1970.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C. & GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, Greensboro, 73:9-27, 1983.
- TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier, 1983. 516p.