

ELUIÇÃO DE PROTEÍNAS DE GEL DE POLIACRILAMIDA: DESCRIÇÃO DE METODOLOGIA SIMPLES E ECONÔMICA.

Vera BONGERTZ

RESUMO

Descreve-se uma metodologia simplificada para a eletroeluição quantitativa de proteínas de gel de poliacrilamida. Após coloração do gel pelo Coomassie Brilliant Blue R 250, os componentes identificados são recortados e as proteínas eluídas do gel por um procedimento desenvolvido para uso em aparelho de eletroforese vertical em tubos.

UNITERMOS: Poliacrilamida; Eletroeluição; Proteínas.

INTRODUÇÃO

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) desenvolvida por LAEMMLI⁶ é amplamente utilizada para a análise de proteínas de uma mistura complexa, pois permite a separação dos componentes da mistura de acordo com o seu peso molecular. Aplicando a esta técnica o procedimento descrito por BOULARD & LECROISEY², a produção de anticorpos pode ser obtida utilizando diretamente os fragmentos recortados do gel. A análise funcional das proteínas individualizadas, tais como a determinação da atividade enzimática ou da afinidade por anticorpos ou lectinas, foi viabilizada pela associação da técnica de Western blot⁷ ao SDS-PAGE. Recentemente, ABOU-ZEID et al.¹ produziram antígenos ligados a partículas de nitrocelulose capazes de estimular linfócitos, baseando-se na técnica de TOWBIN³.

Estas metodologias, embora ofereçam grande resolução, não foram desenvolvidas para a caracterização química ou biológica de proteí-

nas, ou mesmo para a obtenção de antígenos purificados, utilizados em Radioimunoensaio ou outro método de imunodiagnóstico.

Para a eluição de proteínas identificadas em gel de poliacrilamida, diversos métodos foram descritos na literatura, baseando-se nos princípios de difusão⁴ ou de eletroforese⁵.

O procedimento de eletroeluição quantitativa aqui descrito é uma modificação da técnica de HANAOKA et al.⁵, desenvolvida para evitar a necessidade da aquisição de novos aparelhos, tornando-a, desta maneira, mais simples e econômica.

MATERIAL E MÉTODOS

A separação eletroforética das proteínas a serem estudadas foi feita pelo método de SDS-PAGE, seguida de revelação pelo corante Coomassie Brilliant Blue R250⁵.

O aparelho de eletroforese vertical em tubos utilizado foi o sistema GE 2/4, Pharmacia, Laboratory Separation Division, Uppsala, Suécia.

Eluição das proteínas do gel de poliacrilamida.

a) Tubos de vidro de paredes finas adequados para uso em aparelho de eletroforese vertical em tubos, como os utilizados rotineiramente para a confecção de pipetas Pasteur, são estirados e as pontas cortadas de modo a formar pequenas constrictões de ambos os lados, tornando o diâmetro cerca de 2 mm menor do que o original.

b) Estes tubos são colocados em posição vertical em um recipiente de fundo chato, no qual é vertido uma solução de poliacrilamida a 10% em volume suficiente para permitir que esta penetre nos tubos até uma altura de cerca de 1 cm.

c) Após a polimerização, retira-se os tubos deste recipiente e adapta-se à extremidade com poliacrilamida, uma membrana de diálise (Spectra/Por, diâmetro 6 mm, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) com cerca de 8 cm de comprimento, reforçando a ligação da membrana de diálise ao tubo de vidro com parafilme (Parafilm "M", American Can Company, Greenwich, CT, USA) e com um pequeno anel elástico de cerca de 2 mm de largura recortado de um tubo de borracha.

d) Mantendo-se o tubo em posição vertical de modo a ficar a membrana de diálise para cima, adiciona-se cerca de 1 ml de tampão de corrida e, após verificação da ausência de bolhas de ar, fecha-se a membrana com uma presilha ("extremidade inferior").

e) Em seguida, adapta-se à extremidade livre uma membrana de diálise com cerca de 2 cm de comprimento, reforçando a ligação com parafilme. ("extremidade superior").

f) Introduz-se este conjunto no aparelho de eletroforese, até que a borda superior do tubo de vidro esteja nivelada com o orifício do aparelho.

g) Preenche-se então o tubo de vidro com tampão de corrida inserindo nos mesmos os fragmentos recortados do gel que contém a proteína a ser eluída (Fig. 1).

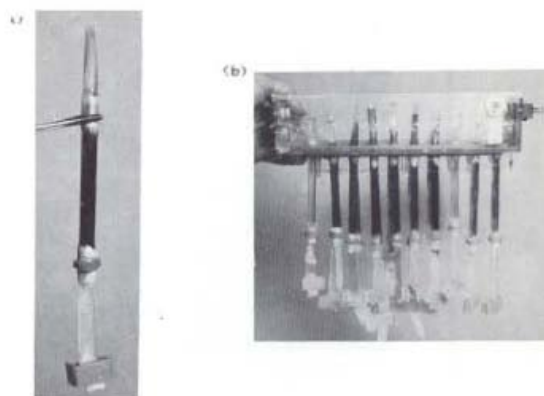


Fig. 1 — Tubos preparados para eletroeluição: (a) antes e (b) após acondicionamento na câmara de tampão superior do sistema de eletroforese GE 2/4 (Pharmacia).

h) Segue-se a eletroforese convencional, aplicando-se uma corrente contínua constante de 2 mA por tubo.

RESULTADOS

Nas condições descritas, a eluição total das proteínas ocorre em aproximadamente 16 horas. O término da eluição é indicado pela migração total do azul de Coomassie dos fragmentos de gel para a membrana de diálise inferior (Fig. 2). O rendimento da eletroeluição, avaliado após precipitação dos eluatos pela acetona⁷, variou de 75 a 92%, para o isolamento de proteínas de soros de animais infectados por *Leishmania donovani*. Neste trabalho (manuscrito em preparação), foram isoladas proteínas de peso molecular aproximado 19, 31, 40, 70, 98, 110 e 145 KDa, rotineiramente. Os rendimentos menores (75 a 82%) foram obtidos quando concentrações inferiores a 2 μ g de proteína estavam presentes no gel a ser eluído (isolamento da banda de albumina bovina do padrão de peso molecular Sigma SDS-7) e/ou quando o peso molecular da proteína foi superior a 80 KDa (isolamento das bandas de peso molecular 98, 110 e 145 KDa). Controles foram efetuados eluindo-se albumina de soro bovino em concentrações de 5 a 1000 μ g por tubo, obtendo-se igual rendimento em três experiências consecutivas.

Para a obtenção de proteínas livres do detergente SDS, a poliacrilamida empregada para fechar a extremidade inferior do tubo de vidro deverá conter uma concentração de 6 M de uréia,

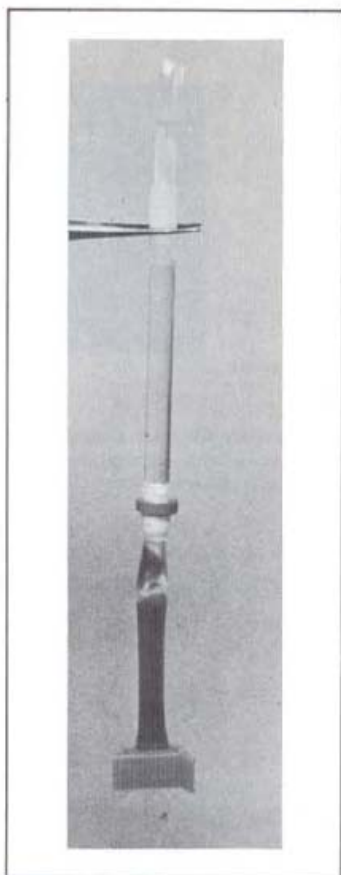


Fig. 2 — Aspecto do tubo após eletroeluição total da proteína dos fragmentos de gel.

como descrito por HANAOKA et al.⁵. Neste caso, para permitir a retirada quantitativa do SDS, o volume de poliacrilamida/uréia introduzida deverá ocupar cerca de 50% da altura do tubo de vidro.

DISCUSSÃO

O procedimento apresentado foi desenvolvido para permitir o uso da técnica de eletroeluição quantitativa desenvolvida por HANAOKA et al.⁵ utilizando somente material já disponível no laboratório. Basicamente, um tubo de vidro adequado para aparelho de eletroforese em tubo foi fechado em sua extremidade inferior com poliacrilamida. A poliacrilamida polimerizada permite livre passagem de eletrólitos e proteínas mas retém sólidos. As proteínas, carregadas pela corrente de eletrólitos, passam pela poliacrilamida e são retidas na membrana de diálise inferior.

A membrana de diálise superior tem a função de evitar a contaminação com quaisquer substâncias eventualmente presentes no tampão de eletroforese, de peso molecular superior ao limitado pelos seus poros (exclusão usada: 12 KDa). Desta maneira, pode-se reutilizar o tampão de corrida, o que implica em uma economia considerável.

Experiências em andamento demonstraram que as proteínas assim eluídas mantêm sua imunogenicidade e sua antigenicidade (manuscrito em preparação). Entretanto, para a obtenção de proteínas livres de SDS, o tratamento com uréia poderá eventualmente ser indicado, como por exemplo na recuperação de enzimas ativas do gel de SDS-PAGE. Verifica-se, entretanto, que o volume de acrilamida contendo uréia a ser colocado no tubo deverá ser aumentado para que possibilite a total renaturação da proteína eluída dos fragmentos de gel, o que implica na necessidade de preparar um número maior de tubos de eluição.

O procedimento apresentado para eluição de proteínas de gel de poliacrilamida demonstrou ser uma técnica quantitativa, simples e de aplicação direta sem necessitar a elaboração de aparelhagem específica.

SUMMARY

Elution of proteins from polyacrylamide gels: a simple and economic procedure.

A simplified methodology for the quantitative electroelution of proteins from polyacrylamide gels is described. After staining with Coomassie Brilliant Blue R 250, the identified bands are excised from the gel and the proteins eluted using a procedure developed for use in conventional tube gel electrophoresis equipment.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Comitê de Imunologia de Leishmaniose da Organização Mundial da Saúde (Immeish — TDR-WHO) número ID 850349 e pelo CNPq (PIDE-VI) projeto número 400720/85. Agradecemos a Maria Solange Correia Soeiro pela assistência técnica e a Jorge Carvalho Cruz pelos serviços fotográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-ZEID, C.; FILLY, E.; STEELE, J. & ROCK, G. A. W. — A simple method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from western blots into antigen bearing particles. *J. Immunol. Meth.*, 98: 5-10, 1987.
2. BOULARD, C. & LECROISEY, H. — Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein. *J. Immunol. Meth.*, 50: 221-226, 1982.
3. GODING, J. W. & HANDMAN, E. — Electrophoretic analysis of protein antigens. In: MOREL, C. M., ed. — *Genes and antigens of parasites: a laboratory manual*. 2nd. ed. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 1984. p. 383-415.
4. HAGER, D. A. & BURGESS, R. R. — Elution of proteins from sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity: results with Sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, Wheat Germ DNA topoisomerase and other enzymes. *Anal. Biochem.*, 109: 76-86, 1980.
5. HANAOKA, F.; SHAW, J. L. & MUELLER, G. C. — Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 99: 170-174, 1979.
6. LAEMMLI, U. K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685, 1970.
7. TOWBIN, H.; STAEGELIN, T. & GORDON, J. — Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.)*, 76: 4350-4354, 1979.
8. TUSZYNSKI, G. P. & WARREN, L. — Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. *Anal. Biochem.*, 67: 55-65, 1975.

Recebido para publicação em 6/6/1988