

Degustação de trechos de livros sugeridos

Técnicas eletroforéticas

Fonte: Wilson & Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. Page 399-

Princípios gerais

O termo eletroforese descreve a migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico. Várias biomoléculas, como aminoácidos, peptídeos, proteínas, nucleotídeos, e ácidos nucleicos, possuem grupos funcionais ionizáveis e, portanto, adquirem carga positiva ou negativa em um determinado valor de pH. Assim, quando submetidos a um campo elétrico, essas partículas carregadas irão migrar para o cátodo ou ânodo, dependendo de sua carga líquida.

O equipamento necessário para a eletroforese consiste basicamente de dois itens: uma fonte de tensão e uma unidade de eletroforese. As unidades de eletroforese estão disponíveis em duas formas, as quais permitem realizar migração na vertical ou na horizontal. Géis para eletroforese vertical são disponíveis comercialmente e são utilizados rotineiramente para separar proteínas em gel de poliacrilamida. O gel é formado entre duas placas de vidro que são mantidas juntas por uma pinça, porém separados por um espaçador. O aparato mais comumente utilizado é mostrado na Figura 10.1 (ver no livro). As dimensões do gel são tipicamente de 8.5 cm de largura x 5 cm de altura, com uma espessura de 0.5-1 mm. Um pente de plástico é inserido na solução do gel e removido após a polimerização para formar cavidades (em torno de 10) onde as amostras são inseridas.

Após a montagem do aparato, tanto o topo como a base do gel são imersos em solução tampão apropriado, o qual é importante para manter constante o estado de ionização das moléculas que estão sendo separadas. Qualquer variação no pH pode afetar a carga líquida e portanto a mobilidade da partícula.

Para entender como as partículas são separadas é necessário olhar para algumas equações simples relacionadas à eletroforese. Quando uma diferença de potencial é aplicada (Voltagem, V) através dos eletrodos, gera-se um gradiente de potencial (E), que é numericamente igual à voltagem aplicada V , dividida pela distância, d , entre os eletrodos. Quando o gradiente de potencial, E , é aplicado, a força que age sob a molécula com uma determinada carga q em coulombs é Eq newtons. É a força que direciona a molécula carregada em direção ao eletrodo de carga oposta. No entanto, há também uma força oposta (resistência friccional) que retarda o movimento da molécula carregada. Esta força/resistência friccional é uma medida do tamanho hidrodinâmico da molécula, da forma da molécula, do tamanho do poro em que a eletroforese está sendo conduzida e da viscosidade do tampão. A velocidade, v , da molécula carregada no campo elétrico é dada pela equação:

$$v = \frac{Eq}{f}$$

onde f é igual ao **coeficiente de fricção/friccional**.

Mais comumente, o termo **mobilidade eletroforética** (μ) de um íon é utilizado, o qual é a razão da velocidade de íon (v) em relação à força do campo elétrico (v/E).

$$\mu = \frac{v}{E}$$

Quando uma diferença de potencial é aplicada, moléculas com diferenças na carga líquida irão se separar devido às diferentes mobilidades eletroforéticas. Mesmo moléculas com carga similar vão sofrer separação devido às diferenças no tamanho, e portanto, diferenças na força friccional experimentada. Como será visto abaixo, algumas formas de eletroforese baseiam-se totalmente nas diferenças de cargas para a separação das moléculas, enquanto outros métodos exploram as diferenças no tamanho da molécula e baseiam-se nos efeitos de força friccional para a separação.

Assim, uma vez removido o campo elétrico, quando a primeira molécula atinge o eletrodo, os componentes da mistura estarão separados no gel de acordo com a sua mobilidade eletroforética. As moléculas separadas são então localizadas no gel por meio de coloração com corantes adequados ou por autoradiografia no caso de amostras marcadas radioativamente.

A corrente entre os eletrodos é majoritariamente conduzida pelos íons contidos no tampão e uma pequena parcela pelos íons presentes na própria amostra. A lei de Ohm expressa a relação corrente (I), voltagem (V) e resistência (R) da seguinte forma:

$$\frac{V}{I} = R$$

Portanto é possível acelerar a separação eletroforética aumentando a voltagem aplicada, o que resulta no aumento respectivo da corrente. A distância percorrida pelo íon será proporcional à corrente e ao tempo. No entanto, o aumento de corrente gera um grande problema na eletroforese que é a geração de calor.

Durante a eletroforese o potencial (W , watts) gerado é dado por:

$$W = I^2 R$$

Grande parte deste potencial é dissipada como calor. O aquecimento durante a eletroforese tem as seguintes consequências:

- Aumento na difusão dos íons contidos na amostra e no tampão levando ao alargamento das bandas;
- Formação de correntes convexas, que resulta na mistura das amostras separadas;
- Instabilidade de amostras sensíveis ao calor (desnaturação de proteínas e, portanto, perda de atividade enzimática);
- Diminuição na viscosidade do tampão e, portanto, diminuição na resistência do meio.

Se uma voltagem constante é aplicada, a corrente aumenta durante a eletroforese devido à diminuição da resistência, e o aumento na corrente aumenta ainda mais o calor liberado. Por esta razão, utilizam-se fontes de tensão estabilizadas, para que forneçam sempre uma voltagem constante, eliminando flutuações na migração devido ao aquecimento.

Geração constante de calor é um problema. Assim, a solução seria realizar a eletroforese em baixa voltagem (baixa corrente) para evitar o aquecimento, mas isso em geral resulta em separações pobres devido ao aumento na difusão decorrente de um tempo muito longo para a separação. Deste modo, em geral, realiza-se a eletroforese em uma condição de voltagem intermediária/razoável que resulte em uma separação aceitável mantendo o aparato em uma condição de baixa temperatura.

Um último fator que afeta a separação eletroforética é o fenômeno de eletroendosmose (fluxo eletroosmótico), decorrente da presença de grupos carregados na superfície do suporte. Por exemplo, o papel possui grupos carboxílicos, a agarose (dependendo da pureza) grupos sulfato e a superfície do vidro utilizado na eletroforese capilar contém grupos silanóis (Si-OH). A Figura 10.3 demonstra como a eletroendosmose ocorre em um tubo capilar, embora o princípio seja igual para qualquer outro suporte. Em tubo capilar, os grupos silanóis ionizam em $\text{pH} > 3$ criando cargas negativas na superfície. O grupo silanol ionizado cria uma dupla camada de cargas.

Gel de Agarose

Agarose é um polissacarídeo linear (massa molecular média de aproximadamente 12000) constituído de repetições de unidades de agarobiose, o qual é constituído de unidades alternadas de galactose e 3,6-anidrogactose. A agarose é um componente do Ágar que é uma mistura de polissacarídeos isolados de algas. Agarose é utilizada normalmente em concentrações de 1 a 3 %. O gel de agarose é preparado suspendendo-se a agarose em água e aquecendo-se até obtenção de um líquido claro. Esta mistura é colocada em uma forma e resfriada até formar um gel. A propriedade gelificante é atribuída à formação de pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares entre as cadeias de agarose. O tamanho do poro do gel é controlado pela concentração da agarose; sendo que poros grandes são formados em baixas concentrações e poros menores são formados em altas concentrações.

Géis de agarose são utilizadas para separações de proteínas e ácidos nucleicos. Para proteínas, os poros formados com gel a 1 % são grandes em relação ao tamanho das proteínas. Esses poros grandes são mais adequados para moléculas maiores como o DNA e o RNA. A vantagem de se utilizar o gel de agarose é a existência de agarose de baixa temperatura de fusão (62-65 °C). Isso possibilita liquefazer o gel aquecendo-se a 65 °C e recuperando-se, por exemplo, o DNA.

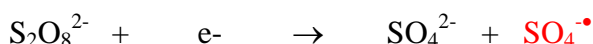
Gel de Poliacrilamida

Eletroforese em gel de acrilamida é frequentemente denominada de PAGE, sendo uma abreviação de *polyacrylamide gel electrophoresis*.

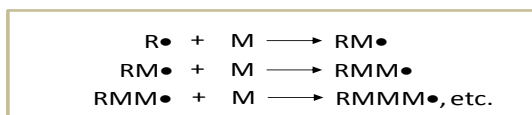
O gel de poliacrilamida é formado pela polimerização de monômeros de acrilamida na presença de quantidades pequenas de *N,N'*-metileno-bisacrilamida (normalmente conhecido como bis-acrilamida) (Fig. 10.5). Note que a bis-acrilamida consiste de duas moléculas de acrilamida ligadas por um grupo metileno e é utilizada como agente formador de ligações cruzadas.

A polimerização da acrilamida é um exemplo de polimerização catalizada por radicais livres, iniciada pela adição de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametyletilenediamine). TEMED

catalisa a decomposição de íons persulfato em ânion sulfato e radical sulfato (uma molécula contendo elétron desemparelhado).



Representando o radical livre como R^{\bullet} (onde o \bullet representa o elétron desemparelhado), e M o monômero de acrilamida, pode-se representar a polimerização da seguinte forma:



Radicais livres são espécies reativas devido à presença do elétron desemparelhado que necessita obter um elétron para se tornar estável. R^{\bullet} reage com M, formando uma ligação simples covalente. Ocorre então um rearranjo dos elétrons na molécula produzindo um novo radical R-M^{\bullet} , o qual é igualmente reativo e capaz de atacar um outro monômero M. Desta maneira, a reação radicalar se propaga produzindo longas cadeias de acrilamida ligadas entre si ocasionalmente por moléculas de bis-acrilamida.

É importante mencionar que o oxigênio presente em solução pode sequestrar (neutralizar) os radicais formados. Portanto recomenda-se degaseificar a solução do gel antes da polimerização. A degaseificação tem também um segundo intuito que é remover bolhas de ar formadas durante a polimerização da acrilamida.

A fotopolimerização é uma alternativa para a polimerização do gel. Neste caso o persulfato e o TEMED são substituídos por riboflavina e o gel é irradiado por 2-3h. A fotodecomposição da riboflavina gera os radicais necessários para o início da polimerização.

O gel de poliacrilamida é definido em termos de porcentagem total da acrilamida presente e o tamanho do poro gerado pode ser alterado variando-se a porcentagem de acrilamida. Os géis de acrilamida podem ser preparados na porcentagem entre 3-30 % de acrilamida. Baixas porcentagens resultam em géis com tamanho de poro maior.

Eletroforese de proteínas

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE é o método mais utilizado para análises qualitativas de proteínas. É um método particularmente útil para acompanhar a purificação de proteínas. Sendo um método em que proteínas são separadas segundo o tamanho, a análise de proteínas por SDS-PAGE também é útil para a determinação da massa molecular relativa da proteína.

O SDS é um detergente aniônico. Amostras aplicadas no SDS-PAGE são previamente fervidas por 5 min em tampão de amostra contendo SDS e β -mercaptoetanol. O β -mercaptoetanol reduz as pontes de disulfeto que mantém a estrutura terciária de proteínas e o SDS liga-se fortemente à proteína desnaturando-a. As proteínas presentes nas amostras são totalmente desnaturadas através deste tratamento adquirindo uma forma alongada em forma de tubo cercada de várias moléculas de SDS ao longo da cadeia. Em média, uma molécula de SDS liga-se a dois resíduos de aminoácidos. A

estrutura nativa original da molécula é, portanto, completamente rodeada por moléculas de SDS carregadas negativamente. As estruturas alongadas em forma de tubo são mantidas graças às repulsões entre as cargas negativas que recobrem a cadeia polipeptídica, o que impede qualquer dobramento da proteína de volta à sua estrutura tridimensional. O tampão de amostra também contém um corante, o azul de bromofenol, que permite a visualização da corrida eletroforética, e o glicerol, que aumenta a densidade final da amostra, fazendo com que ela permaneça no fundo do pocinho de aplicação.

Uma vez aplicadas todas as amostras, liga-se a fonte de tensão. É importante observar que a amostra não é aplicada diretamente no gel de separação (normalmente em torno de 5 cm) e sim sob uma camada de gel mais poroso (em geral em torno de 0.8-1 cm) conhecido como gel de empilhamento. É neste gel de empilhamento que se produzem as cavidades onde são injetadas as amostras. O objetivo do gel de empilhamento é concentrar a amostra da proteína para formar bandas finas antes de entrar no gel de separação. Este objetivo é alcançado utilizando diferenças na força iônica e no pH entre o tampão de eletroforese e o tampão do gel de empilhamento e envolve um fenômeno conhecido como *isotacoforese*.

O gel de empilhamento possui um poro bem grande (4 % de acrilamida), o qual permite que as proteínas migrem livremente e se concentrem sob o efeito do campo elétrico. O efeito de afinamento da banda baseia-se no fato de que íons glicinato ([glicina]) presentes no tampão de eletroforese possuem uma mobilidade eletroforética menor do que o complexo proteína-SDS ([proteína-SDS]) o qual por sua vez, possui mobilidade menor que íons cloreto (Cl^-) presentes no tampão (loading buffer) e no tampão do gel de empilhamento. Quando a corrente é ligada, todas as espécies iônicas precisam migrar com a mesma velocidade, do contrário elas funcionariam como breque no circuito elétrico. O íon glicinato pode se mover na mesma velocidade que o cloreto somente se eles estiverem em uma região de força de campo mais forte. A força de campo é inversamente proporcional à condutividade, que é proporcional à concentração. O resultado é que as três espécies de interesse ajustam as suas concentrações $[\text{Cl}^-] > [\text{proteína-SDS}] > [\text{glicinato}]$. Há somente uma pequena quantidade do complexo proteína-SDS, portanto eles se concentram em uma banda bastante estreita na divisa entre os íons glicinato e cloreto. Uma vez que o glicinato atinge o gel de separação ele torna-se totalmente desprotonado devido ao pH mais elevado e então a sua mobilidade aumenta (o pH do gel de empilhamento é de 6.8, enquanto do gel de separação é de 8.8). Portanto, o glicinato deixa para trás o complexo proteína-SDS o qual passa a migrar no gel de separação de acordo com o tamanho de cada proteína. O complexo proteína-SDS carregado negativamente migra para o ânodo, e como todas as proteínas possuem a mesma carga líquida por unidade de comprimento, elas migram no gel de separação com a mesma mobilidade. No entanto, à medida que eles passam no gel de separação as proteínas de tamanhos diferentes se separam devido às propriedades “peneirantes” do gel. De forma simples, quanto menor a proteína mais facilmente ela passa através dos poros do gel, enquanto proteínas maiores têm sua migração retardada pela força friccional (resistência) resultante do efeito peneira do gel. Sendo uma molécula pequena, o azul de bromofenol é o que migra com mais facilidade indicando a localização da frente da eletroforese.

Quando o corante atinge a extremidade do gel, desliga-se a corrente (fonte de tensão) e o gel então é removido e colocado em uma solução de coloração (normalmente utiliza-se o Coomassie Blue) e depois descolorido utilizando-se uma solução de descoloração. A solução de descoloração remove o corante que não se ligou ao gel, deixando visíveis

as bandas de proteínas coradas em azul em um gel transparente. Um minigel leva em torno de 1 h para o preparo, 40 min para a corrida em 200 V e 1 h para coloração em azul de coomassie. Fazendo-se uma descoloração rápida é possível visualizar as bandas em 20 min, porém as bandas são melhor visualizadas após descoloração por uma noite. A massa molecular relativa (Mr ou PM, peso molecular) de uma proteína pode ser determinada comparando-se a mobilidade da proteína com o de padrões de Mr conhecido. Plotando-se um gráfico de $\log Mr$ x migração relativa, constrói-se uma curva de calibração (curva padrão) que permite a determinação da Mr da proteína de interesse.

A análise por SDS-PAGE é utilizada para acompanhar a purificação de proteína em cada etapa de purificação. Uma proteína pura aparece como uma banda única no gel, a não ser que a proteína seja constituída por duas subunidades de tamanhos distintos. Neste último caso, aparecerão duas bandas no gel, cada uma correspondendo a uma subunidade da proteína.

Gel nativo

Apesar do SDS-PAGE ser o método mais frequentemente utilizado, ele não serve para experimentos em que o objetivo seja detectar uma proteína (em geral uma enzima) com base na sua atividade biológica, pois a proteína é totalmente desnaturada na análise por SDS-PAGE. Neste caso, necessita-se de uma análise em condições não-desnaturantes em gel nativo. Para esta finalidade utiliza-se o gel de poliacrilamida (em geral na porcentagem de 7.5 %), mas tudo é feito na ausência do SDS para não desnaturar a proteína. Nestas condições as proteínas possuem carga líquida distinta no pH do gel (em geral 8.7) e as proteínas são separadas de acordo com suas respectivas mobilidades eletroforéticas no gel. Nas análises em gel nativo é difícil prever o comportamento de cada proteína, mas devido às diferentes cargas e formas, em geral consegue-se uma boa separação das proteínas em uma mistura. A enzima de interesse pode ser identificada incubando-se o gel em solução contendo um substrato adequado. Em geral utiliza-se um substrato que resulte na formação de um produto colorido.

Detecção de proteínas no gel

O corante mais comumente utilizado para detectar proteínas em um gel é o Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). A coloração normalmente é feita com uma solução a 0.1 % de CBB em metanol:água:ácido acético glacial (45:45:10). A mistura ácido-metanol serve como um agente desnaturante que precipita e fixa as proteínas no gel, evitando que as proteínas sejam perdidas no processo de lavagem do gel. A coloração por CBB requer em torno de 0.1 μg (100 ng) de proteína.

Quando se requer uma coloração mais sensível que detecte concentrações mais baixas de proteína, utiliza-se a coloração por prata. No processo de coloração o íon de prata (Ag^+) é reduzido à prata metálica na proteína, onde a prata se deposita formando uma banda de cor marrom. A coloração por prata pode ser utilizada imediatamente após a eletroforese ou depois da coloração com CBB. A coloração por prata é pelo menos 100 vezes mais sensível que o CBB detectando proteínas em torno de 0.001 μg (1 ng). Outros corantes utilizados são o Sypro Orange (30 ng) e Sypro Ruby (10 ng).

Análises quantitativas da proteína podem ser feitas realizando-se um escaneamento por densitometria. Existem vários equipamentos comerciais (Densitômetros, Scanners) que detectam as bandas através do uso de um laser e medindo-se a transmitância.

Embora a análise por eletroforese em gel seja um método analítico, em algumas situações ela pode ser utilizada para separar ou purificar proteínas. Neste caso corta-se a banda contendo a proteína de interesse. Em geral esse procedimento é feito para análises que requerem quantidade muito pequena de amostra como, por exemplo, para análises por espectrometria de massas.