

Leandro Ferreira de Aguiar

ESTUDO MOLECULAR E IMUNOQUÍMICO DA
ASPARAGINASE DE *Crotalaria*.

Ag93e

25674/BC

Campinas 1995

LEANDRO FERREIRA DE AGUIAR

ESTUDO MOLECULAR E IMUNOQUÍMICO DA
ASPARAGINASE DE *Crotalaria*.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia
da Universidade
Estadual de Campinas
como exigência parcial
para obtenção do
Título de Doutor em
Ciências.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Leandro Ferreira de Aguiar
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/03/95

Orientador: Prof. Dr. LADASLAV SODEK

CAMPINAS

1995



FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Ag93e Aguiar, Leandro Ferreira de
Estudo molecular e imunoquimico da Asparaginase de *Crotalaria* / Leandro Ferreira de Aguiar. --Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Ladaslav Sodek.
Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Crotalaria*. 2. Asparaginase. 3. Imunoquimica. 4. Imunoglobulinas. 5. Leguminosa. I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

UNIDADE BC
N.º CHAMADA: TI UNICAMP
AG 93e
V. 1 E. 1
TOMBO B. 25674
PROC. 432/95
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/09/95
N.º CPD Cm.00026787-3

Ao meu pai, **Hugo Ferreira de Aguiar** (*In Memoriam*)

Ofereço e Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ladaslav Sodek pela orientação.

Aos professores Paulo Mazzafera, Hiroshi Aoyama e L. G. Santoro pelas contribuições na Pré-Banca.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul que concedeu-me o afastamento para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Química de Proteínas, onde fiz a parte final da purificação da enzima. Aos professores Sérgio e Camilo, meu especial agradecimento.

Aos colegas do Departamento pela amizade e colaboração recebida nos anos de convívio.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, em especial ao João Humberto, Sebastiana, Dulce e Dulcinéia.

Aos meus amigos Edson, Eduardo, Estela, Celso, Dercir, Menoni e Romanini pela amizade e o constante estímulo.

Aos meus irmãos Josefa, Ana Lúcia, Neusa, Bernadete, João José, Paulo Hugo, Águeda e Raquel e meus pais: Maria de Lourdes e Hugo (*In Memoriam*).

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
III. MATERIAL E MÉTODOS.	15
III.1. MATERIAL VEGETAL	15
III.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	16
III.3 ESCOLHA DO MATERIAL.	18
III.4. PURIFICAÇÃO.	20
III.4.1. EXTRAÇÃO INICIAL.	20
III.4.2. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO.	21
III.4.3. PRECIPITAÇÃO COM ETANOL	21
III.4.3.1. REMOÇÃO DO ETANOL	22
III.4.4. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	22
III.4.5. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA	23
III.4.6. CROMATOGRAFIA DE ELETROFORESE DE ALTA EFICIÊNCIA	23
III.5. IDENTIFICAÇÃO DE SUBUNIDADES E PESO MOLECULAR	25
III.6. ELETROFORESE DE GEL DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA NATIVO E DESNATURANTE.. . . .	25
III.7. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	29
III.7.1. IMUNIZAÇÃO.	30
III.8. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS	30
III.8.1. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	30
III.8.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	31

III.9. ELISA	32
III.10. WESTERN BLOTTING.	35
III.11. FILTRAÇÃO EM GEL (SEPHACRYL 200).	38
IV. RESULTADOS.	39
IV.1. ESCOLHA DO MATERIAL.	39
IV.2. PURIFICAÇÃO.. . . .	41
IV.2.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	41
IV.2.6. CROMATOGRAFIA DE ELETROFORESE DE ALTA EFICIÊNCIA.. . . .	49
IV.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.	57
IV.3.1. PESO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES	57
IV.3.2. PESO MOLECULAR DA ENZIMA NATIVA.. . . .	57
IV.3.3.TABELAS DE PURIFICAÇÃO.	61
IV.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.	63
V. DISCUSSÃO.	70
VI.CONCLUSÕES	77
VII. LITERATURA CITADA.. . . .	79

RESUMO.

Identificou-se atividade catalítica da enzima asparaginase no gênero **Crotalaria**. De oito espécies testadas, cinco espécies apresentaram enzima do tipo independente de potássio, enquanto outras três apresentaram enzima do tipo dependente. No gênero **Crotalaria** as espécies com enzima dependente de potássio apresentaram característica unifoliolada, enquanto as espécies independentes de potássio apresentaram característica trifoliolada.

Trabalhou-se na purificação e caracterização de asparaginase de duas espécies dependentes e uma independente de potássio. Para a purificação utilizou-se precipitação com sulfato de amônio, precipitação etanólica, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e eletroforese de gel de poliacrilamida de alta eficiência (HPEC, equipamento da Applied Biosystems). Para caracterização do peso molecular da enzima nativa utilizou-se filtração em gel (Sephacryl-200).

Purificou-se asparaginase dependente de potássio a partir das espécies **C. juncea** e **C. paulina** que apresentam duas isoenzimas em ambas as espécies: uma de peso molecular de 100 kDa e outra de 600 kDa. Para **C. juncea** produziu-se anticorpos policlonais para a enzima de 100 kDa que não identifica a enzima equivalente de **C. paulina**. Purificou-se asparaginase independente de potássio a

partir de **C. zanzibarica** que possui uma só enzima de peso molecular de 100 kDa para a qual foi produzido anticorpos policlonais. Estes reagem tanto com asparaginase de **C. juncea** como de **C. paulina**.

Para a produção de anticorpos policlonais utilizou-se coelhos. As imunoglobulinas foram purificadas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de imunoafinidade e posteriormente utilizados nos testes de Western Blot.

A isoenzima de 600 kDa de **C. juncea** em SDS-PAGE apresenta duas subunidades, 37 e 20 kDa, enquanto que a de 100 kDa apresenta uma única subunidade de 25 kDa. Esta composta, portanto, composta de 4 subunidades. Utilizando-se anticorpos no teste de Western Blot conseguiu-se identificar o peso molecular da subunidade da asparaginase de **C. zanzibarica**, 25 kDa, igual a **C. juncea**, sendo a enzima nativa composta de quatro subunidades. Não foi possível caracterizar a enzima de **C. paulina** ao nível de subunidade com a mesma metodologia utilizada para **C. juncea**.

SUMMARY

Asparaginase activity was identified in the genus **Crotalaria**. Of eight species tested, five possess the potassium independent enzyme whereas the other three contain the potassium dependent enzyme. Species of the **Crotalaria** genus that contain the potassium dependent enzyme were also characterized as unifoliate whereas the potassium independent species were trifoliate.

The purification and characterization of asparaginase was carried out on two species containing the potassium dependent enzyme and one species with the independent enzyme. The purification procedure involved ammonium sulfate precipitation, ethanol fractionation, ion-exchange and hydrophobic column chromatography and high performance gel electrophoresis (HPEC). Molecular weight of the native enzyme was estimated by gel filtration on Sephacryl S-200.

Potassium dependent asparaginase was purified from the species **C. juncea** and **C. paulina**. Two isoenzymes, one with a molecular weight of 100 kDa and the other of 600 kDa, was found in both species. Polyclonal antibodies were obtained for the 100 kDa enzyme of **C. juncea** which did not recognize the equivalent enzyme of **C. paulina**. The potassium independent asparaginase was purified from **C. zanzibarica** and found contain only a single enzyme with a molecular weight of 100 kDa. The polyclonal antibodies obtained for this

enzyme cross reacted both with the asparaginase of *C. juncea* and *C. paulina*.

Polyclonal antibodies were produced in rabbits. The immunoglobulin fraction was purified by ammonium sulfate precipitation and immunoaffinity chromatography and used in Western Blot analyses.

The 600 kDa enzyme of *C. juncea*, presented 2 subunits by SDS-PAGE, with molecular weight of 20 and 37 kDa, whereas the 100 kDa enzyme presented a 25 kDa subunit, suggesting that the native enzyme is composed of 4 subunits. Through Western Blot analysis, it was possible to identify the asparaginase subunit of *C. zanzibarica* as being the same in the molecular weight as that of *C. juncea* (25 kDa), again suggesting that this enzyme is also made up of 4 subunits. It was not possible to identify the subunits of *C. paulina* using the same methods as for *C. juncea*.

Abreviaturas Utilizadas:

Asn- Asparagina

Asp- Aspartato

BSA- Albumina de soro bovino

BCIP- 5-bromo,4-cloro,3-indoltylfosfato

DTT- Ditiotreitól

ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay

HPEC- Cromatógrafo de eletroforese de alta eficiência

NBT- Nitroblue tetrazolium

OPD- Fenileno diamino dihidroclorato

PAGE- Gel de poliacrilamida em sistema nativo

PBS- Tampão fosfato salino

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE- Gel de poliacrilamida em sistema desnaturante

TBS- Tampão Tris fosfato salino

Tris- Tris (hidroximetil)-aminometano

GS/GOGAT- Glutamina sintetase e glutamina oxo-glutarato amida
transferase

I. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos com alto teor protéico está intimamente relacionada à capacidade de simbiose das leguminosas, seja pela produção de sementes com alto teor protéico utilizadas diretamente na alimentação humana, seja como alimento forrageiro para ruminantes. Estas plantas conseguem associar-se simbioticamente com bactérias do gênero **Rhizobium**, que possuem a enzima nitrogenase. Nesta associação a planta fornece substâncias orgânicas necessárias ao desenvolvimento bacteriano e, por outro lado, a bactéria fixa nitrogênio que é convertido em ureídeos ou aminoácidos, dependendo da espécie, e transportado até os drenos da planta, isto é, locais de síntese protéica.

Os compostos nitrogenados transportados, aminoácidos e ureídeos, são conduzidos pelo xilema e pelo floema. Quando estes compostos são dirigidos às folhas, através da corrente transpiratória o principal elemento condutor é o xilema. A condução é, portanto, restrita portanto restrito ao período diurno e dependente da transpiração. No caso dos frutos este fator não tem a mesma importância, dada à pequena capacidade de transpiração do órgão quando relacionado à necessidade de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva. Neste caso é o floema o principal meio de

transporte para os frutos. Depois que os sítios de produção, associação sistema radicular e bactérias são carregados com compostos nitrogenados, estes são ativamente translocados para o floema e transportados por fluxo de pressão decorrente de um diferencial de potencial osmótico.

Dos compostos que chegam ao fruto imaturo por fluxo de pressão, quais sejam glutamina, asparagina e ureídeos, a asparagina é o composto preponderante para o suprimento de nitrogênio para a síntese de proteínas de reserva da semente. Ao chegar ao tegumento da semente imatura a asparagina é catabolizada em aspartato e amônia pela enzima asparaginase e a amônia é incorporada em compostos orgânicos através do sistema enzimático GS/GOGAT.

Desta maneira a enzima asparaginase desempenha um papel chave no metabolismo da síntese de proteínas de reserva em sementes imaturas de leguminosas. SODEK et al. (1980) identificaram duas formas desta enzima, uma que exige potássio como co-fator, presente em ervilha (**Pisum sativum**), e outra independente de co-fator, do tipo presente em lupinus de jardim (**Lupinus polyphyllus**).

Apesar da importância deste passo metabólico poucos estudos têm sido feitos com esta enzima e os dados existentes recaem principalmente sobre as espécies típicas de clima temperado. Por um lado, isto talvez seja decorrente da falta de um método rápido para

a análise da atividade catalítica da asparaginase, associado à sua instabilidade, e por outro, do fato de existir um número muito menor de pesquisadores em bioquímica vegetal nos países tropicais.

A importância de se conhecer o metabolismo de síntese de proteínas de reserva em que a asparaginase desempenha um papel chave, bem como o desenvolvimento de metodologia que permite uma análise rápida da atividade enzimática da asparaginase (SODEK & LEA 1993), levou a que se passasse a trabalhar com esta enzima.

Após um trabalho inicial a partir do qual identificou-se que as espécies de **Crotalaria** são boas fontes para o estudo desta enzima definiu-se como objetivo estudar a sua presença no gênero, avaliando a necessidade ou não do co-fator potássio. Uma vez feita uma análise exploratória dentro do gênero, escolheu-se espécies de **Crotalaria** com enzima dependente e independente de potássio para serem utilizadas como fonte desta enzima em purificação, caracterização molecular e na produção de anticorpos para estudos imunoquímicos.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O nitrogênio é o nutriente mais limitante para o crescimento das plantas, especialmente em sistemas agrícolas (DATE 1973; HARDY & HAVELKA 1975). As plantas normalmente adquirem nitrogênio do solo na forma inorgânica (nitrato ou amônio). Na ausência de um suprimento de nitrogênio adequado por parte do solo, durante o processo evolutivo certas leguminosas e espécies actinomízicas foram capazes de formar uma associação simbiótica em que os microorganismos fixam nitrogênio atmosférico, para o suprimento da planta em troca de fotossintetizados para o seu metabolismo (SCHUBERT, 1986).

No processo simbiótico com leguminosas, bactérias do grupo do *Rhizobium* associam-se ao tecido radicular, ocorrendo uma alteração fisio-morfológica (nódulo). Nesta associação a planta fornece fotossintetizados e proteção para a bactéria, criando-se condições bioquímicas para que ocorra a redução do nitrogênio atmosférico para formas aproveitáveis pelo vegetal. No nódulo, além do controle do nível de oxigênio pelo hospedeiro, através da legmoglobina, há disponibilidade de substrato (78% do ar atmosférico, em volume, é N_2) e de redutores bioquímicos. Além disso o bacterióide possui a enzima nitrogenase, somente encontrada em procariotos,

proporcionando-se as condições necessárias para a redução do N_2 (SALISBURY & ROSS, 1992). BERGERSEN, (1965) demonstrou que NH_4^+ é o primeiro produto estável da fixação de N_2 nos nódulos de leguminosas. O íon amônia produzido é excretado pelos bacteriídeos para o citoplasma das células do tecido do hospedeiro, onde é assimilado e utilizado na síntese de compostos orgânicos (BERGERSEN & TURNER, 1967). O íon amônia tem que ser rapidamente removido por ser tóxico ao tecido vegetal (GIVAN, 1979).

Quando dependente da associação simbiótica para o suprimento de nitrogênio, as leguminosas podem ser classificadas em exportadoras de amidas e exportadoras de ureídeos. As exportadoras de amidas produzem e translocam asparagina (ASN), glutamina (GLN) ou 4-metilenoglutamina (MeGLN), no caso específico da planta do amendoim (*Arachis hipogea*). As plantas exportadoras de ureídeos exportam alantoína (ALN) e ácido alantóico (ALC), ou ainda citrulina (CIT) (SCHUBERT, 1986). A maioria das espécies exportadoras de amidas produz asparagina e/ou glutamina, conforme mostrado na **Figura 1**. Neste processo o nitrogênio é fornecido pelos bacteriídeos e os esqueletos carbônicos são provenientes da fotossíntese e transportados pelo floema. O sistema simbiótico constitui uma fonte de produtos nitrogenados que serão aproveitados na síntese dos diferentes compostos nitrogenados necessários ao vegetal. Quando o

centro de demanda por nitrogênio é as folhas, a principal via de transporte é o xilema e os compostos são conduzidos pela corrente transpiratória, sendo dependente da transpiração e ocorrendo somente durante o dia. No caso de frutos imaturos, o volume de água transpirado é muito pequeno dado à pequena superfície do órgão. Neste caso os compostos são transportados para o floema através de transporte ativo, envolvendo bomba de prótons (ATPase) (SERVAITES et al., 1979). O fluxo se dá por diferença de pressão causada por um diferencial de potencial osmótico entre a fonte e o dreno.

O mesmo processo é encontrado no transporte de ureídeos pelo floema. No caso de plantas exportadoras de ureídeos, existe uma diferença nos compostos exportados. Quando a planta produz todo o nitrogênio necessário através da associação simbiótica o produto exportado é ureídeos. Quando existe suprimento externo de nitrogênio na forma de nitrato os produtos exportados são aminoácidos. McCLURE et al., (1980) encontraram uma correlação positiva entre o conteúdo relativo de ureídeos na seiva do xilema e a fixação simbiótica de N_2 em soja.

No fruto, morfológicamente, o tecido embrionário está separado do tecido materno, não existindo, para o embrião, uma continuidade entre os tecidos vasculares do fruto e tegumento da semente. Sendo assim, os compostos translocados pelo floema chegam por esta via

somente até o tegumento da semente (THORNE, 1981). Em função das características da composição da seiva do xilema e floema RAINBIRD et al. (1984), trabalhando com nutrição de embriões imaturos de soja em cultivo *in vitro* e testando fontes de nitrogênio, encontraram que glutamina e asparagina eram boas fontes de nitrogênio, enquanto ureídeos não proporcionaram crescimento satisfatório. Estes dados foram consistentes com os encontrados *in vivo*. Dos compostos nitrogenados à disposição do embrião imaturo 59% foi glutamina, 19% asparagina, 7% amônia e 29% outros aminoácidos, não se encontrando ureídeos. Ao que tudo indica, os ureídeos transportados são convertidos em amidas antes do fornecimento destes compostos ao embrião. Esta conversão se dá durante o transporte para o fruto imaturo e no tegumento, antes do seu fornecimento ao embrião. Como o xilema é o principal transportador de ureídeos e o floema de aminoácidos, é de se supor que exista uma conversão de ureídeos para aminoácidos quando da passagem do xilema para o floema.

A importância da asparagina no conteúdo de nitrogênio da seiva do floema há muito registrada. CHIBNAL (1939, citado por SIECIECHOWICZ et al., 1988), já indicava, em sua revisão sobre síntese de proteínas, a importância da asparagina como composto transportador de nitrogênio. Segundo LEA & FOWDEN, (1975) a

asparagina é o componente preponderante entre os compostos nitrogenados não protéicos presentes em leguminosas. Em folhas jovens de plântulas não noduladas de ervilha, *Pisum sativum*, do conteúdo de compostos orgânicos nitrogenados presentes, 70% compreende asparagina e glutamina, sendo que o segundo aminoácido é encontrado em proporção muito menor (URQUHART & JOY 1982). Nos gêneros *Lupinus* e *Spartium* a asparagina é o principal composto

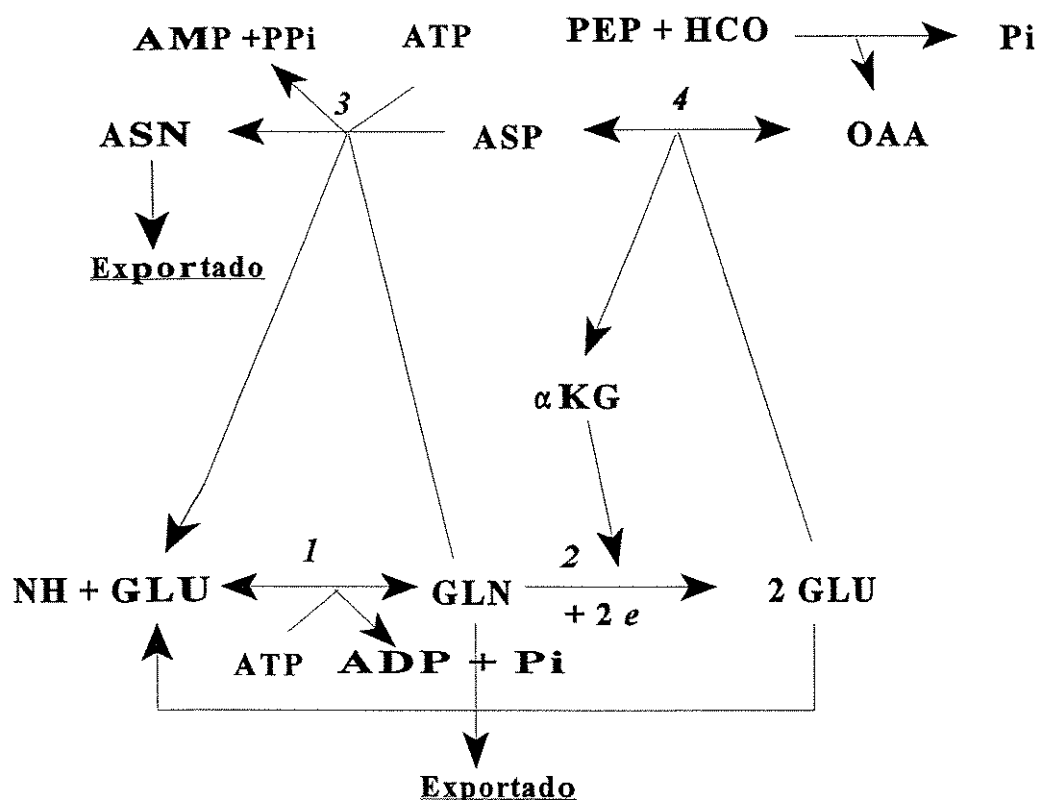


Figura 1. Via metabólica de síntese de amidas em nódulos. Abreviaturas do esquema: GLU (glutamato), GLN (glutamina), α KG (ácido α -cetoglutárico), PEP (fosfoenolpirúvico), OAA (ácido oxaloacético), ASP(ácido aspártico), ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato), Pi (fosfato) e PPi (pirofosfato). A reação 1 é catalizada pela Glutamina sintetase, a 2 pela Glutamato sintetase, a 3 pela Asparagina sintetase, a 4 por uma transaminase e a 5 pela fosfoenol-piruvato carboxilase.

nitrogenado presente na seiva do floema coletada a partir dos frutos (PATE et al., 1974; 1975). Em **Lupinus albus** ela representa 50 a 70% do nitrogênio conduzido para os frutos e sementes (ATKINS et al., 1975). SIECIECHOWICZ et al., (1988), fazendo uma revisão sobre o metabolismo de asparagina em plantas concluíram que a asparagina e, em menor quantidade, a glutamina, são os principais constituintes nitrogenados da seiva do xilema de muitas plantas, incluindo as leguminosas de clima temperado noduladas e não noduladas, tais como **Pisum**, **Lupinus**, **Vicia**, **Trifolium**, **Medicago** e **Lotus**, bem como em leguminosas tropicais não noduladas, como **Vigna** e **Phaseolus**, além das plantas actinomílicas **Casuarina** e **Myrica**.

Os compostos nitrogenados são freqüentemente os principais componentes da matéria seca da seiva do xilema, ocupando uma segunda posição, após os carboidratos, na seiva do floema (HALL & BAKER, 1972; DIE & WILLESEN, 1975; ZIEGLER, 1975). Os compostos orgânicos nitrogenados do floema são representados principalmente por asparagina e arginina (BOLLARD, 1960; TROMP & OVAA, 1979). Em **Vigna unguiculata**, PEOPLES et al., (1985) encontraram que todo o nitrogênio requerido pelo fruto em desenvolvimento era fornecido por amidas e ureídeos, sendo o primeiro transportado pelo floema e o segundo pelo xilema.

O metabolismo da asparagina é processado por duas enzimas, a

asparaginase (E.C.3.5.1.1.) e a asparagina-piruvato aminotransferase (E.C.2.6.1.14.). Em sementes em desenvolvimento existe uma alta atividade da enzima asparaginase e apenas traços da asparagina-piruvato aminotransferase. Isso indica que a primeira é a responsável pelo metabolismo da asparagina na semente imatura. Em folhas jovens a asparaginase tem alta atividade na fase inicial de crescimento, mas esta cai rapidamente com o tempo, enquanto a asparagina-piruvato aminotransferase permanece com alta atividade durante toda a vida da folha (IRELAND & JOY 1981). Este padrão metabólico, em que a asparaginase apresenta alta atividade em sementes imaturas e a asparagina-piruvato aminotransferase prevalece em folhas, parece ser geral entre as leguminosas, dado o número de trabalhos que relatam este comportamento (ATKINS et al., 1975; TA et al., 1984; SIECIECHOWICZ et al., 1985;1988). Esta primeira via de catabolismo de asparagina envolve a transaminação para produzir ácido 2-oxosuccinato. Acredita-se que esta via ocorre predominantemente em folhas verdes, em que amino grupos são requeridos para a síntese de glicina no processo de fotorespiração (ATKINS et al.,1983; JOY,1988). Estes dados são coerentes com a localização subcelular da asparagina-piruvato aminotransferase que foi encontrada somente em peroxissomas (IRELAND & JOY, 1983).

O metabolismo da asparagina que chega à semente imatura dá-se

inicialmente no tegumento da semente. Com o desenvolvimento do embrião, ocorre um aumento da atividade neste, enquanto naquele ela diminui. (LEA et al., 1978; MURRAY & KENNEDY, 1980; PEOPLES, et al., 1985; RATAJCZAK, 1986). Como o tegumento da semente é um tecido pobre em componentes protéicos, no estágio que apresenta alta atividade da enzima asparaginase, ele é o tecido mais adequado para purificação.

Para a purificação da enzima asparaginase tem-se utilizado basicamente o protocolo descrito por LEA et al., (1978). Estes autores foram os primeiros a trabalhar com purificação de asparaginase de vegetais. Eles definiram o pH ideal para a enzima (8.0-8.2), temperatura para purificação (4 °C), o Km para asparagina (12,2 mM) e necessidade de protetor de grupos sulfidrílicos. Para a purificação utilizaram tampão Tris-HCl pH 8.0, 50 mM, 10% de glicerol, 1mM de PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil) e 12.5 mM de 2-mercaptoetanol. O procedimento de purificação envolveu precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e PAGE. Um aspecto importante no aperfeiçoamento do processo de purificação foi a identificação de que a asparaginase é estável em soluções etanólicas de até 60% (SODEK et al., 1980). Como são poucas as proteínas que apresentam esta característica,

consegue-se uma boa purificação somente com a precipitação etanólica. Outro avanço foi o desenvolvimento de uma técnica rápida para a análise da atividade catalítica da enzima (SODEK & LEA 1993). Inicialmente a atividade foi avaliada pela produção de íon amônio, detectado por cromatografia de camada delgada (LEA et al., 1978) e, posteriormente, utilizou-se asparagina marcada com C^{14} (SODEK et al., 1980). Ambos os métodos são bastante trabalhosos e demorados. SODEK & LEA (1993) desenvolveram o método de microdifusão de amônia em que esta é capturado com H_2SO_4 .

A asparaginase presente em sementes imaturas apresenta duas formas quanto à necessidade de co-fator. A forma presente em sementes imaturas de ervilha (*Pisum sativum*) é dependente de potássio que, além de ativá-la, também a protege contra a desnaturação pelo calor. Já a forma presente em sementes imaturas de *Lupinus polyphyllus* é independente deste co-fator (SODEK et al., 1980). Segundo SIECIECHOWICZ et al., (1988), a constatação da existência de forma enzimática de asparaginase dependente de potássio esclareceu em parte a ocorrência intermitente de atividade de asparaginase em plantas.

Os primeiros registros de atividade de asparaginase em extratos de plantas foram obtidos com *Lupinus albus*, em embriões imaturos, por ATKINS et al., (1975). LEA et al., (1978), trabalhando com

Lupinus polyphyllus, obtiveram os primeiros parâmetros sobre cinética enzimática e características moleculares; obtiveram um Km de 12.2 mM para asparagina, definiram pH ótimo de 8.0-8.2. Eles encontraram um peso molecular de 72 kDa por gradiente de sacarose, e em SDS-PAGE observaram que desagregava em uma subunidade de 38 kDa. CHANG & FARNDEN (1981), estudando a distribuição da atividade de asparaginase em diversos órgãos de *Lupinus arboreus* e *Lupinus angustifolius* (folhas jovens, extremidades de raízes, gemas foliares e sementes em desenvolvimento), constataram que em sementes em desenvolvimento a atividade enzimática nas duas espécies era independente de potássio, enquanto nos demais órgãos das duas espécies a atividade era dependente de potássio. Para *L. arboreus* e *L. angustifolius*, após purificação da enzima, obtiveram um peso molecular da enzima nativa de 75 kDa por filtração em gel. Para as duas espécies, em SDS-PAGE, a enzima produziu subunidades de 11-15.5 kDa. SODEK et al., (1980) obtiveram um peso molecular de 68.3 kDa por gradiente de sacarose para ervilha (*Pisum sativum*). Em estudos mais recentes e, utilizando-se técnicas mais refinadas, constatou-se que a asparaginase em *L. arboreus* existe na forma de três isoenzimas constituídas de polipeptídeos que vão de 14 a 19 kDa (LOUGH et al., 1992). SODEK & LEA (1993), utilizando FPLC e técnicas imunoquímicas, obtiveram um peso molecular de 71 kDa, por

filtração em gel, para a enzima independente de potássio extraída de tegumento de sementes imaturas de **Lupinus polyphyllus**, enquanto em SDS-PAGE ela mostra duas subunidades, 35 e 36 kDa. Para a enzima dependente de potássio extraída de tegumento de semente imatura de ervilha (**Pisum sativum**) obtiveram peso molecular de 61 kDa. O anticorpo produzido para a forma independente de asparaginase, extraída de **L. polyphyllus** não reconheceu a forma dependente extraída de ervilha. Desta maneira, esses autores consideraram que a característica de dependência ao co-fator potássio é preponderante nas propriedades antigenicas da molécula. Estes dados são coerentes com os obtidos por LEA et al., (1984). Estes autores produziram anticorpos para asparaginase extraída de tegumento de sementes imaturas de **Lupinus polyphyllus** que foram testadas contra outras espécies do mesmo gênero, havendo reação somente com as espécies portadoras de enzima do mesmo tipo, isto é, independente de potássio.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL

As primeiras espécies de **Crotalaria** para as quais obteve-se resultados positivos foram espécies invasoras crescendo espontaneamente no campo. A partir dos primeiros resultados

sementes foram germinadas e cultivadas em canteiros na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp e posteriormente indentificadas. Além das espécies coletadas no campo, obteve-se outras espécies provenientes da Seção de Leguminosas do Instituto Agrônômico de Campinas e do CENARGEN, EMBRAPA. As espécies trabalhadas foram: *C. zanzibarica*, *C. incana*, *C. mucronata*, *C. lanceolata*, *C. anagiroides*, *C. estipularia*, *C. paulina* e *C. juncea*.

III.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A análise de atividade da asparaginase foi feita através do método de microdifusão de amônia (SODEK & LEA, 1993). Por este método 50 μ l de uma solução 50 mM de asparagina, em tampão de extração (Tris 50 mM, 10% de glicerol, 1 mM de DTT, pH 8,0 e 50 mM de KCl) são incubados à 35 °C por uma hora em tubo Eppendorf. A reação é interrompida com 500 μ l de solução 50% de K_2CO_3 que tem por função, além de interromper a reação, fazer com que a amônia produzida na reação seja liberada. Após a interrupção da reação, o tubo é tampado com uma tampa avulsa contendo uma gota de 5 μ l de ácido sulfúrico concentrado em sua face interna. Desta maneira toda a amônia que se volatiliza reage com o ácido formando $(NH_4)_2SO_4$. Deixa-se de um dia para o outro a temperatura ambiente ou incuba-se

por três horas a 37 °C para a completa liberação de amônia. A amônia capturada é analisada pelo método de McCULLOUGH, (1967), segundo o qual a gota inicialmente reage com 500 μ l de uma solução contendo 2.5 g de fenol, 12.5 mg de nitroprussiato de sódio em 250 ml de água. A acidez é neutralizada por 100 μ l de uma solução 2 N de NaOH e, em seguida, adiciona-se 500 μ l de uma solução composta de 1.25 g de NaOH, 5.3 g de Na_2HPO_4 e 2.5 ml de solução 5% de NaOCl em 250 ml de H_2O . Após incubação por 40 minutos a 37 °C, lê-se a absorbância em 630 nm.

A curva padrão é feita com soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, procedendo-se a microdifusão e a análise como descrito acima.

III.3 ESCOLHA DO MATERIAL.

Dado a pouca disponibilidade de informações sobre a asparaginase e a sua dispersão entre as leguminosas tropicais, a primeira fase da escolha do material constituiu-se de um levantamento daqueles que potencialmente poderiam ser utilizados para purificação da enzima. Nestes ensaios exploratórios para a identificação da presença ou não de atividade e da dependência ou não do potássio como co-fator, lançou-se mão do planejamento experimental descrito a seguir.

Utilizou-se três repetições em cada ensaio e todos os procedimentos de purificação foram feitos à temperatura próxima de 4°C . As sementes foram trituradas em almofariz previamente gelado e, para cada grama de sementes imaturas, adicionou-se 4 a 5 ml de tampão de extração composto de Tris 50 mM, 10% de glicerol, 1 mM de DTT, pH 8.0 e 50 mM de KCl. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 RPM (rotor JA-20 da centrífuga modelo J2-21 da Beckman) por 20 min. Do sobrenadante retirou-se duas alíquotas de 1.0 ml cada, que foram dessalinizadas em coluna de sephadex G 25, uma equilibrada com tampão de extração com KCl e outra com tampão sem KCl. Os extratos assim obtidos foram utilizados nos seguintes ensaios:

50 μ l do extrato com KCl

A 50 μ l de solução de Asn 50 mM

50 μ l de tampão de extração com KCl

50 μ l do extrato sem KCl

B 50 μ l de solução de Asn 50 mM

50 μ l de tampão de extração sem KCl

50 μ l do extrato sem KCl

C 50 μ l de solução de Asn 50 mM

50 μ l de tampão de extração com KCl

50 μ l de solução de Asn 50 mM

D 100 μ l de tampão de extração

50 μ l de tampão de extração

E 50 μ l de solução 2 mM de NH_4^+

50 μ l de solução de Asn 50 mM

A, B e C constituem o experimento pelo qual é possível identificar a presença ou não de atividade catalítica e se a enzima é dependente do co-fator potássio. "D" é o "branco" do experimento utilizado para zerar o espectrofotômetro e "E" é o padrão. Cada um destes ensaios foi feito no tempo "0"; ou seja, assim que se adicionou o extrato de semente imatura ao substrato, a reação foi interrompida com 500 μ l de solução de K_2CO_3 50% e o ensaio colocado para incubar tampado com tampa avulsa contendo em seu interior 5 μ l de H_2SO_4 . Outro ensaio igual ao anterior foi colocado para incubar a 35 °C por 60 minutos. Após a incubação adicionou-se 500 μ l de K_2CO_3 50%. Cada um dos ensaios, tempo zero e incubado, foi repetido 3 vezes.

III.4. PURIFICAÇÃO

III.4.1. EXTRAÇÃO INICIAL

Após a extração inicial das proteínas de sementes imaturas em almofariz, em uma relação de aproximadamente 1 grama de sementes imaturas (com o endosperma líquido) para cada 4 a 5 ml de tampão de extração, sempre com temperatura controlada, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada (4 °C) por 20 min a 10000 RPM. Após o descarte do precipitado, retirou-se uma alíquota de 1 ml do sobrenadante para análise da atividade inicial e proteína. O

restante do sobrenadante foi processado nas fases seguintes.

III.4.2. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

Ao sobrenadante obtido na extração inicial adicionou-se 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (78% de saturação) para cada ml de sobrenadante e deixou-se em banho de gelo com agitação suave até que todo o sal fosse dissolvido. Nestas condições a enzima asparaginase é precipitada sem que ocorra desnaturação, e, como algumas proteínas não são precipitadas nesta condição, consegue-se uma purificação parcial e redução do volume. O extrato protéico foi então centrifugado a 10000 RPM por 15 min em centrífuga refrigerada e o precipitado obtido foi ressuspendido em volume mínimo de tampão de extração.

III.4.3. PRECIPITAÇÃO COM ETANOL

É importante que o volume de tampão no qual o precipitado é ressuspendido seja mínimo, porque após a precipitação etanólica o etanol terá que ser removido para prosseguir-se na purificação. O volume total é limitante quando se vai remover o etanol.

Ao precipitado ressuspendido em tampão de extração, adicionou-se álcool etílico gelado até a concentração final de 60% , sendo que nestas condições a enzima não se desnatura nem precipita (SODEK et al., 1980). A cada 4 ml de extrato adicionou-se 6 ml de etanol

gelado. A solução foi deixada a -20°C por pelo menos 1 hora. Após este período, centrifugou-se a 5000 RPM por 20 min, descartando-se o precipitado.

III.4.3.1. REMOÇÃO DO ETANOL

O etanol foi removido do extrato utilizando-se uma coluna de 150 ml de Sephadex LH-20, previamente equilibrada com tampão de extração. Na calibração da coluna obteve-se um volume vazio de 60 ml e o início da saída do etanol a 115 ml. Nestas condições a capacidade máxima da coluna foi de 50 ml. Utilizou-se um fluxo da ordem de 0,8 ml por min

III.4.4. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

O extrato sem álcool foi aplicado a uma coluna de DEAE-Sephacel de 10 ml, previamente equilibrada com tampão de extração contendo 50 mM de KCl. A remoção das proteínas foi feita utilizando-se um sistema de gradiente linear de 50 a 350 mM de KCl em tampão de extração em um volume total de 90 ml. Durante a eluição das proteínas coletou-se frações de 1,6 ml (36 gotas) com um fluxo de $0,8\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ regulado por uma bomba peristáltica. Após a eluição das proteínas procedeu-se à avaliação da atividade da enzima e do conteúdo de proteínas em cada uma das frações. Aquelas onde

constatou-se presença de atividade da enzima foram reunidas para procedimentos posteriores de purificação.

III.4.5. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

As frações eluídas da coluna de DEAE-Sephacel em que se constatou a presença de atividade foram reunidas e a concentração de KCl elevada para 1,55 M. Em uma coluna de 10 ml de Fenil-sepharose, previamente equilibrada com tampão de extração com 1,55 M de KCl, foi aplicada a amostra. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 ml de tampão de extração 1,55 M e as proteínas foram eluídas em um único passo com tampão de extração 50 mM de KCl. Frações de 1,6 ml foram recolhidas em coletor de frações, nas quais analisou-se a atividade de asparaginase e o conteúdo de proteínas.

III.4.6. CROMATOGRAFIA DE ELETROFORESE DE ALTA EFICIÊNCIA

As frações da coluna de Fenil-sepharose em que detectou-se atividade catalítica foram reunidas e dessalinizadas em coluna Sephadex G-25, equilibrada com tampão de extração com 50 mM de KCl. Em seguida, a amostra foi aplicada ao HPEC (High Performance Eletroforetic Chromatography) modelo 230-A, equipamento da Applied Biosystems. Inicialmente utilizou-se gel com 5% de poliacrilamida em coluna (50x2,5 mm) sob refrigeração a 5°C. O tampão superior foi

Tris-Glicina, 25 mM e 192 mM, respectivamente, pH 8,6 e fluxo de 1,5 a 2,5 ml.min⁻¹, e o inferior foi Tris 25 mM pH 8,3, com fluxo de 1,5 a 2,5 ml.min⁻¹. O tampão de eluição foi Tris 50 mM, pH 8,3, com fluxo da ordem de 18 µl.min⁻¹. Antes de se proceder a análise realizou-se uma pré-corrida, sendo que nos 30 min iniciais a corrente variou de 0,4 a 0,8 mA e o restante da pré-corrida permaneceu constante em 0,8 mA. O monitor de UV foi ajustado para 280 nm e a sensibilidade para 1 AUFS. Após o registro de um pico devido à remoção de substâncias derivadas da degradação da poliacrilamida, o gel estava pronto para ser utilizado (dependendo das condições, um mesmo gel pode ser utilizado para até 10 análises). Aplicou-se o volume máximo possível, ou seja 90 µl. Na amostra foi colocado azul de bromofenol como indicador de corrida. Após a saída do azul de bromofenol, coletou-se frações a cada 4 min, correspondendo a um volume de 60 µl, que foram imediatamente incubadas com o mesmo volume de solução de asparagina 50 mM para avaliação da atividade catalítica, de acordo com método já descrito. A partir do mesmo extrato fez-se uma segunda separação utilizando o HPEC e, em seguida, as frações obtidas foram utilizadas em análise eletroforética em gel para proteína nativa de 10% poliacrilamida, que foi corado com prata seguindo-se o método de OAKLEY et al., (1980).

III.5. IDENTIFICAÇÃO DE SUBUNIDADES E PESO MOLECULAR

Após a identificação molecular da enzima em eletroforese de gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante, utilizando-se BSA como proteína de referência, verificou-se o peso molecular da subunidade ou subunidades da enzima em sistema desnaturante, com SDS 12,5%, utilizando-se um padrão de peso molecular de 14000 a 94000 da Pharmacia constituído pelas seguintes proteínas: $\square$ lactoalbumina, 14,4 KDA, inibidor de tripsina, 20,1 KDA, anidrase carbônica, 30 KDA, ovalbumina, 43 KDA, albumina, 67 KDA e fosforilase c com 94 KDA. Os padrões foram aplicados em paralelo às amostras purificadas da enzima. Ambos os procedimentos são descritos em seguida.

III.6. ELEKTROFORESE DE GEL DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA NATIVO E DESNATURANTE.

Utilizou-se o sistema descontínuo de gel de poliacrilamida modificado de LAEMMLI em sistema desnaturante e "nativo". No sistema desnaturante todos os reagentes tem em sua composição 0,1% de SDS. Este reagente desagrega possíveis subunidades e faz com que a densidade de carga, ou seja, a relação entre peso molecular e

carga de superfície seja uma constante. Desta maneira as proteínas separam-se de acordo com o seu peso molecular. No sistema "nativo" as proteínas não são desnaturadas. Desta maneira, a separação se dá pelo peso molecular e também pela carga de superfície.

O equipamento utilizado foi o minigel da série SE-200 produzido pela Hoefer Scientific Instruments. Utilizou-se gel com 10% de acrilamida nos sistemas "nativo" e 12,5% no sistema desnaturante. Na página seguinte é dada uma tabela com as soluções estoques e o respectivos volumes necessários para o preparo de 30 ml de gel.

Tabela 1. Preparo de gel utilizando sistema descontínuo de tampões

Soluções estoques	Concentração final de Acrilamida no			
	gel de separação			
	Gel de empacotamento	12,5% com SDS	10% "nativo"	5% "nativo"
Acrilamida-	2,5	12,5	10,0	5,0
bisacrilamida				
(30:0,8)*				
Tampão do gel de	5,0			
empacotamento ^b				
Tampão do gel de		3,75	3,75	3,75
separação ^c				
Persulfato de amônio	1,0	1,5	1,5	1,5
1,5%				
Água	10,0	11,95	14,75	19,75
SDS 10%		0,3		
TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015

As colunas representam os volumes em ml dos diferentes reagentes para o preparo de 30 ml

^b Tampão de empacotamento ; 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8

^c Tampão de separação; 0,375 M de Tris-HCl pH 8,3

III.6.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA COM PRATA

Após o término da corrida, quando a frente de azul de bromofenol chega ao fim do gel, retira-se o gel e, a seguir, ele é submetido à seguinte seqüência de procedimentos; conforme OACKLEY et al., (1980)

- a) deixa-se o gel em imersão 3 vezes por 20 minutos cada uma em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético;
- b) deixa-se o gel em imersão 2 vezes por 10 minutos cada uma em solução contendo 10% de metanol e 5% de ácido acético;
- c) deixa-se o gel em imersão por 10 minutos em solução contendo 3,4 mM de dicromato de potássio e 32 mM de HNO_3 ;
- d) lava-se em H_2O destilada até que o gel fique claro, usualmente três trocas da água com intervalo de 10 minutos;
- e) deixa-se o gel por 15 minutos em solução contendo 0,1% de AgNO_3 ;
- f) lava-se em H_2O destilada por 2 minutos;
- g) após a remoção da água, adiciona-se solução aguosa

degaseificada preparada com 25 g de Na_2CO_3 e 10 ml de solução de formaldeído 30% em 1 l de água;

- h) quando as bandas de proteínas tornarem-se visíveis interrompe-se a reação com solução contendo 5% de ácido acético.

III.7. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Após a identificação da proteína com atividade catalítica, passou-se a proceder purificações com o objetivo de se obter material suficiente para o esquema de inoculação dos coelhos para produção de anticorpos policlonais. Para isto, procedeu-se algumas alterações para se ter um maior rendimento durante o processo de purificação. Passou-se a utilizar uma coluna de Sephadex LH-20 de 160 ml com uma rolha, de forma que a bomba peristáltica pudesse imprimir uma pressão interna, melhorando desta maneira o fluxo. Passou-se também a utilizar um rotor da centrífuga refrigerada com capacidade de 250 ml por tubo e uma capacidade total de 1,5 l. Com estas alterações conseguiu-se uma maior eficiência nas purificações, as quais puderam ser feitas a partir de 200 g de sementes imaturas de cada vez. Para *C. juncea* a purificação final foi pelo HPEC, entretanto não se conseguiu bons resultados com *C. zanzibarica* e *C. paulina*, tendo-se utilizado a enzima eluída da

coluna de Fenil-sepharose diretamente como antígeno, somente procedendo a troca de tampão para PBS.

III.7.1. IMUNIZAÇÃO

Utilizou-se coelhos de 3 a 4 meses da raça Nova Zelândia Branco, fazendo-se uma primeira inoculação intradérmica com adjuvante completo de Freund em cerca de 15 pontos diferentes no dorso previamente raspado do animal. Antes da primeira inoculação fez-se uma sangria para se ter amostra do soro pré-imune. Após 30 dias fez-se uma segunda inoculação com adjuvante incompleto de Freund pela via intramuscular em dois pontos próximos aos gânglios popliteais. Após uma semana procedeu-se uma nova sangria com o objetivo de se avaliar a produção de anticorpos que foi feito pelo método ELISA (JOHNSTONE & THORPE, 1987). Após esta segunda aplicação, tendo dado reação positiva, aplicou-se um segundo reforço veiculado em PBS, sem adjuvante, via intramuscular.

III.8. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

III.8.1. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

Os procedimentos de purificação de imunoglobulinas são os descritos por JOHNSTONE & THORPE, (1987). Após uma semana da segunda dose, procedeu-se a uma "sangria branca", isto é, punção

cardíaca com remoção de todo o sangue possível. Deixou-se o sangue coagular por uma hora e, após, este período permaneceu a 4 °C por 12 horas para contração do coágulo. Em seguida, centrifugou-se a 5000 RPM por 20 minutos, descartando-se o precipitado. O soro foi precipitado com 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (313 mg.ml⁻¹), seguindo-se nova centrifugação a 17000 RPM por 15 minutos. O precipitado foi ressuspendido em um volume mínimo de PBS e dializado contra o mesmo tampão.

III.8.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O material dializado foi aplicado a uma coluna de sepharose-proteína-A (13x1 cm) previamente equilibrada com PBS. Desta maneira todas as imunoglobulinas se ligam à resina que sendo lavada com PBS, remove as demais proteínas do material. A eluição das imunoglobulinas é feito com tampão Glicina-HCl pH 2,5 e os eluatos monitorados pela absorbância a 280 nm para se saber em quais frações encontram-se os anticorpos. Estas frações foram reunidas e o pH elevado para 7,3 com uma solução de Tris 2 M. Feita a purificação, os anticorpos foram testados pelo método ELISA e Western Blotting para avaliação da especificidade. Fez-se o armazenamento adicionando-se glicerol até uma concentração final de 50%, e azida de sódio. Os anticorpos assim preparados foram

armazenados a uma temperatura de -20°C .

III.9. ELISA

Para o teste ELISA (JOHNSTONE & THORPE, 1987) são necessários os seguintes reagentes:

a. Tampão Carbonato:

Prepara-se uma solução estoque "A" com 0,2 M de carbonato de sódio anidro (21,2 g em 1000 ml) mais 0,2 g de NaN_3 (azida de sódio). Prepara-se uma solução estoque "B" 0,2 M bicarbonato de sódio (16,8 g em 1000 ml) mais 0,2 g de NaN_3 (azida de sódio). Adiciona-se a solução "B" à solução "A" com contínua agitação até o pH 9,6;

b. Tampão PBS/Tween:

Prepara-se o Tampão PBS dissolvendo em 1000 ml de água destilada 8,0 g de NaCl , 0,20 g de KCl , 1,15 g de Na_2HPO_4 e 0,20 g de KH_2PO_4 . Isto dará uma concentração final de 0,15 M de fosfato e pH de 7,2. Adiciona-se 50 ml de tween-20 ao PBS (0,05% v/v);

c. Solução de BSA 1% em PBS/Tween-20;

d. Substrato para a Peroxidase conjugada ao segundo anticorpo, fenilene diamina (OPD). Dissolve-se um tablete de 30 mg em 3 ml de metanol e então dilui-se para 100 ml de água destilada.

Imediatamente antes do uso adiciona-se H_2O_2 para obter-se uma concentração final de 0,03%. Para isto adiciona-se 100 μl de peróxido de hidrogênio 30% aos 100 ml da solução;

- e. Solução 2 M de H_2SO_4 para interromper a reação. Completa-se para 250 ml, com água destilada, 27,3 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Procedimento:

1. Dilui-se o antígeno, extrato de sementes imaturas de **Crotalaria**, em Tampão Carbonato para se ter uma concentração de 1 e 100 μg de proteína por ml;
2. Nas colunas 1 e 2 da placa para ELISA coloca-se nos poços somente Tampão Carbonato, nas linhas de A a D e colunas de 2 a 10 adiciona-se o antígeno na concentração mais baixa (1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e, nas demais, E a H, concentração mais elevada (100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), sempre 200 μl de solução por poço;
3. Recobre-se a placa com Magipack (filme de PVC transparente) e deixa-se a 4°C por 16 h;
4. Lava-se a placa com água de torneira, de forma vigorosa, pelo menos 10 vezes, esvaziando a placa a cada lavagem de modo a remover-se toda a proteína não ligada à superfície;
5. Os sítios de ligação de proteína remanescentes devem ser

- saturados. Para isto adiciona-se 200 μ l de solução PBS/Tween/BSA em cada poço e deixa-se incubar por 1h à temperatura ambiente;
6. Lava-se a placa como em 4;
 7. Dilui-se o primeiro anticorpo em uma relação de 1:1000 em PBS/Tween/BSA e adiciona-se 200 μ l por poço e deixa-se 1h incubando à temperatura ambiente para garantir uma completa ligação do anticorpo ao antígeno;
 8. Lava-se como em 4;
 9. Dilui-se o segundo anticorpo, anti-coelho conjugado com peroxidase (SIGMA immuno Chemicals), em PBS/Tween em uma relação 1:2000 v/v. Adiciona-se 200 μ l em cada poço e deixa-se incubar por 90 min à temperatura ambiente.
 10. Lava-se como em 4;
 11. Adiciona-se 200 μ l da solução de substrato para peroxidase, OPD/H₂O₂, em cada um dos poços e deixa-se incubar à temperatura ambiente e no escuro por um período de 20 a 30 minutos para o desenvolvimento de cor;
 12. Interrompe-se a reação com 50 μ l de solução 2 M de ácido sulfúrico;
 13. Lê-se a placa em uma leitora de placas de ELISA a 492 nm.

III.10. WESTERN BLOTTING

Por esta técnica, desenvolvida por TOWBIN et al., (1979), as proteínas fracionadas no gel durante a eletroforese são transferidas para uma folha de nitrocelulose através de uma corrente transversal. O gel de poliacrilamida com as proteínas é posto em contato com uma folha de nitrocelulose e estes são submetidos a uma corrente transversal, em ângulo reto, de sentido do gel para a membrana. Desta maneira as proteínas separadas pela eletroforese são transferidas para uma membrana mantendo-se a separação e permitindo que se processe as reações imunoquímicas necessárias para a identificação do grau de especificidade do anticorpo produzido.

Para a transferência são necessário os seguintes materiais:

a) Tampão Tris-Glicina (25 mM e 192 mM, respectivamente) pH 8,6 com 20% de metanol.

Adiciona-se 20% de metanol para evitar que o gel sofra dilatação durante o processo de transferência;

b) Tampão TBS (Tampão Tris 10 mM pH 7,5 salino, 0,9% NaCl);

c) Sistema de transferência semi-seco que inclui:

i. uma fonte de potência regulável;

ii. sistema de transferência semi-seco;

iii. papel de filtro whatman nº1;

iv. folha de nitrocelulose.

Procedimento:

1. Deixa-se o gel, PAGE ou SDS-PAGE, contendo as proteínas fracionadas no tampão Tris-Glicina com 20% de Metanol por 30 min para equilibrar. Simultaneamente coloca-se 18 (dezoito) pedaços de papel de filtro e um de nitrocelulose, do mesmo tamanho do gel, para equilibrar junto ao gel, no tampão Tris-Glicina-Metanol;
2. Monta-se o sanduíche na seguinte ordem : coloca-se 9 (nove) pedaços de papel de filtro tomando-se cuidado para que não fique bolhas entre eles. Sobre os papéis coloca-se a folha de nitrocelulose, sobre ela o gel de eletroforese e sobre este mais 9 (nove) pedaços de papel;
3. Sobre o sanduíche coloca-se a placa correspondente ao cátodo;
4. Regula-se a fonte para uma amperagem fixa de 0,8 mA.cm² de gel;
5. Após o período de 2 hs remove-se o sanduíche imergindo a folha de nitrocelulose em TBS e corando com prata o gel. É importante corar o gel para verificar se todas as proteínas foram transferidas ou será necessário um tempo maior nas próximas análises para uma total transferência. Pode ocorrer

- também o contrário, isto é, as proteínas passarem pela membrana e serem perdidas. Neste caso é necessário reduzir o tempo de transferência. A folha de nitrocelulose pode ficar de um dia para o outro imersa em TBS à 4 °C, se necessário;
6. Deixa-se a membrana imersa em TBS com 3% de leite desnatado, preparado no momento, por 1 h à temperatura ambiente;
 7. Lava-se com TBS com 0,1% de Tween-20 3 vezes por 10 min;
 8. Dilui-se o anticorpo em TBS/Tween em uma relação de 1:500 a 1:1000 e deixa-se a folha de nitrocelulose imersa nesta solução por 2 h;
 9. Lava-se como em 7;
 10. Dilui-se o segundo anticorpo, anti-coelho conjugado com fosfatase (SIGMA Immuno Chemicals), com TBS/Tween em uma relação de 1:1000 ou mais e deixe a folha de nitrocelulose imersa nesta solução por uma hora;
 11. Lava-se como em 7;
 12. Incuba-se com o substrato para fosfatase. Para isto prepara-se as seguintes soluções estoques:
 - a. NBT, 50 mg/ml em solução 70% de dimetilformamida;
 - b. BCIP, 50 mg/ml em solução 50% de dimetilformamida;
 - c. Tampão Tris 100 mM, pH 9,5 com 100 mM de NaCl e 5 mM de $MgCl_2$;

Em 25 ml do tampão adiciona-se 165 μ l da solução estoque de NBT e 82,5 μ l da solução estoque de BCIP.

Irá desenvolver-se uma coloração parda onde ocorreu a ligação do primeiro anticorpo. Pelo número de bandas formadas têm-se o grau de especificidade do anticorpo produzido.

III.11. FILTRAÇÃO EM GEL (SEPHACRYL 200).

Montou-se uma coluna (83,2x2,6 cm) de sephacryl 200 da Pharmacia para avaliação do peso molecular da enzima "in natura". Para a avaliação utilizou-se o extrato purificado até a etapa da cromatografia Fenil-sepharose. Aplicou-se 5 ml deste extrato à coluna previamente equilibrada com tampão de extração degaseificado utilizando-se um fluxo de 40 ml.hr⁻¹. Após a eluição do volume vazio, 164 ml, coletou-se frações de 3,7 ml (85 gotas). Montou-se ensaio para avaliação da atividade da enzima em todas as frações coletadas. Para o ensaio utilizou-se de algumas alterações no ensaio anteriormente descrito, que, nesta condição, tem uma importância mais pelas características qualitativas do que quantitativas. Utilizou-se 150 μ l de solução de asparagina 50 mM e 200 μ l do extrato eluído em cada uma das frações e deixou-se incubando de um dia para o outro à temperatura ambiente.

A calibração foi feita com os padrões da Pharmacia composto

pelas seguintes proteínas de peso molecular conhecido: α -amilase, 200 KDA, álcool desidrogenase, 150 KDA, BSA, 66 KDA, anidrase carbônica, 29 KDA, e citocromo c com 12,4 KDA. Além das proteínas adicionou-se também dextrano azul com peso molecular de 2000 KDA, que funciona como indicador da eluição do volume vazio. Os valores do peso molecular das enzimas foram obtidos pela inferência do volume de eluição da enzima em relação aos dos valores de eluição dos padrões. A partir da calibração obteve-se a seguinte equação de ajuste: $y = -1,7574x + 7,3680$, em que x é a relação entre o volume de eluição do azul de dextrano (164 ml, volume vazio) pelo volume de eluição da proteína e y representa o logarítmo do peso molecular na base decimal.

IV. RESULTADOS.

IV.1. ESCOLHA DO MATERIAL.

A **Tabela 2** mostra os materiais testados quanto à presença ou não de atividade enzimática e se esta é dependente ou não de potássio como co-fator. São apresentados somente os resultados positivos, isto é, os materiais que nas condições experimentais manifestaram atividade catalítica.

TABELA 2. Leguminosas que apresentaram atividade enzimática e característica quanto a co-fator e morfologia foliar. Sinal "+" indica presença de atividade e o sinal "-" ausência.

Espécie	Atividade com KCl	Atividade sem KCl	Atividade adicionando-se KCl	Característica morfológica da folha e característica enzimática
C. zanzibarica	+	+	+	trifoliolada independente
C. incana	+	+	+	trifoliolada independente
C. mucronata	+	+	+	trifoliolada independente
C. lanceolata	+	+	+	trifoliolada independente
C. anagiroides	+	+	+	trifoliolada independente
C. estipularia	+	-	+	unifoliolada dependente
C. paulina	+	-	+	unifoliolada dependente
C. juncea	+	-	+	unifoliolada dependente
Cajanus cajan tegumento	+	+	+	unifoliolada independente
Glicyne max (soja perene) tegumento	+	+	+	trifoliolada independente
Cajanus cajan cotilédone	+	-	+	unifoliolada dependente

Dentro do gênero **Crotalaria** todas as espécies testadas apresentaram atividade enzimática nas condições experimentais. Dentre as 8 espécies testadas, 5 apresentaram enzima do tipo

independente de potássio e 3 do tipo dependente. Não se verificou presença de tipos diferentes da enzima, dependente e não dependente, quando se fez a análise de atividade no tegumento ou em cotilédones de **Crotalaria**. Uma vez identificado estes materiais como potencialmente adequados como fonte de enzima para purificação, optou-se pelo gênero **Crotalaria** por ser ele tipicamente tropical e existirem espécies com enzima dependente e outras independentes de potássio. Os dados existentes na literatura recaem basicamente sobre plantas de clima temperado e somente no gênero **Lupinus** existe registro de espécies com um ou outro tipo de enzima. Dentro do gênero **Crotalaria** elegeu-se **C. juncea** e **C. paulina** como fontes de enzima dependente de potássio e a **C. zanzibarica** como fonte da enzima independente deste co-fator. Tal escolha deveu-se às características de facilidade de cultivo e no processo de purificação.

IV.2. PURIFICAÇÃO.

IV.2.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

Nas Figuras 2-4 temos os resultados da eluição dos extratos das diferentes espécies de **Crotalaria** estudadas. O eluidor foi o gradiente linear de KCl (50-350 mM) e os gráficos apresentam a atividade em cada fração com base no volume do extrato. A proteína

apresentada é o total de proteína na fração de 1,6 ml, calculado pelo método de BRADFORD, (1976). O total de proteína eluído antes do início do gradiente não é apresentado.

IV.2.5. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.

Nas **figuras 5, 6 e 7** encontram-se os perfis de eluição de asparaginase da coluna de Fenil-sepharose para as espécies estudadas. Os dados de proteína não são apresentados, nem o total eluído com a lavagem da coluna com tampão Tris 1,55 M de KCl e o total correspondente à proteína deslocado durante a eluição da enzima. Podemos observar que o padrão de eluição da atividade enzimática das diferentes espécies estudadas é bastante uniforme. A eluição se dá em um único pico, entretanto a eluição de **C. juncea** e **C. paulina**, dependentes de potássio, se dá em um volume maior quando comparado com **C. zanzibarica**. As duas primeiras tem toda a atividade eluída em 10 e 11 frações, respectivamente, enquanto que a **C. zanzibarica** tem toda a sua atividade eluída em 5 frações.

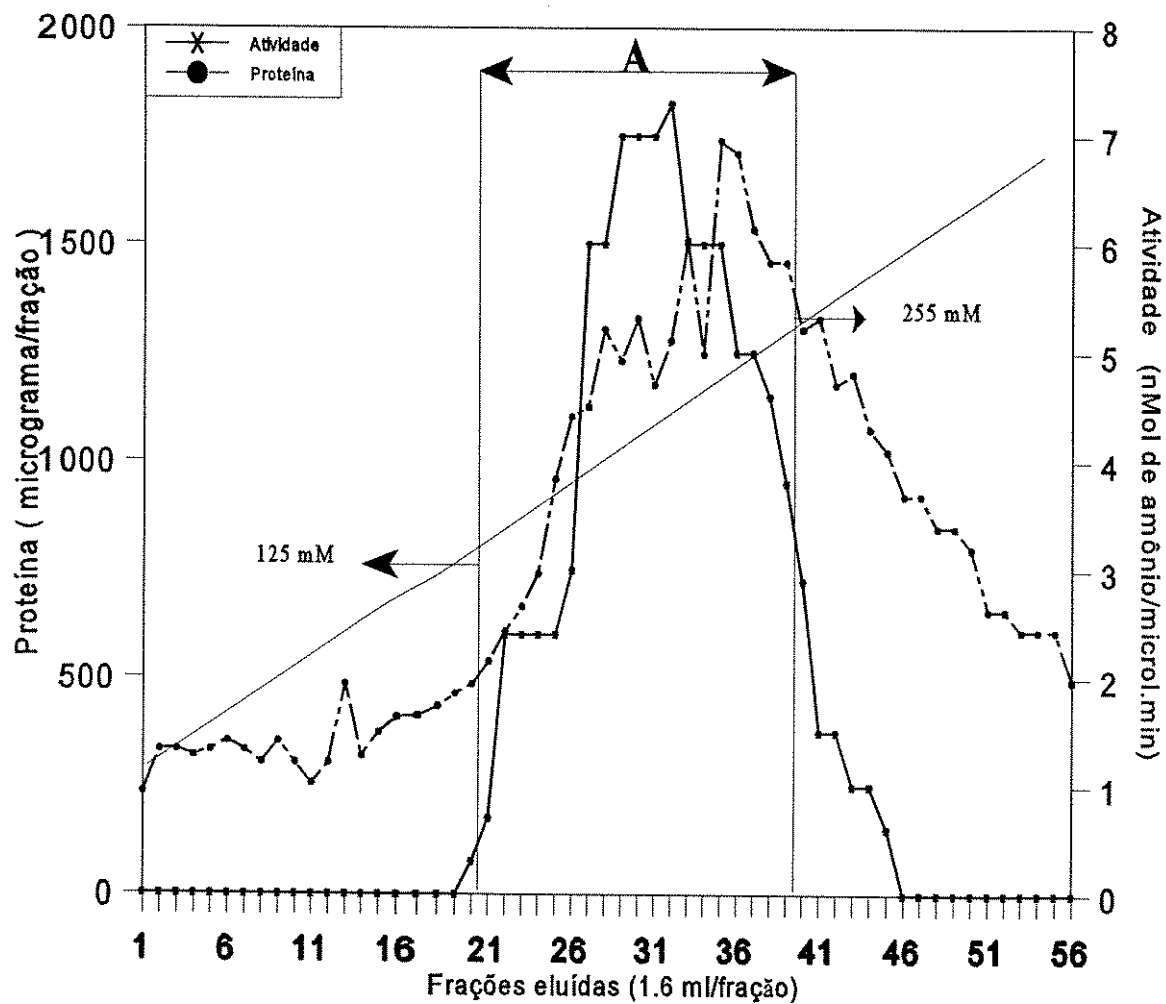


FIGURA 2. Cromatografia em DEAE-sephacel do extrato de *C. juncea*. As frações correspondentes ao segmento "A", eluídas por um gradiente iônico de 125 a 255 mM de KCl, foram reunidas e utilizadas na cromatografia de interação hidrofóbica. As demais frações foram descartadas.

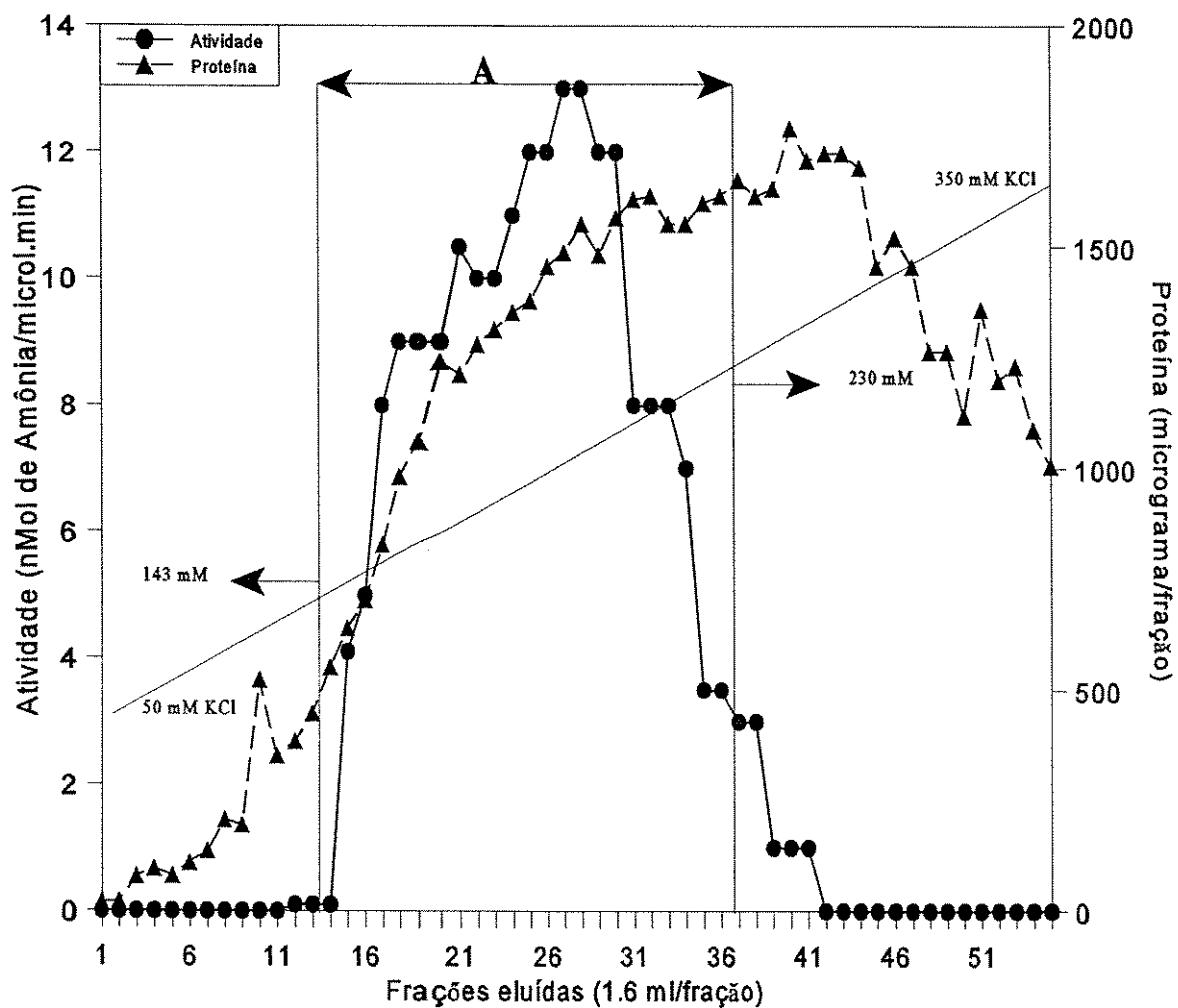


FIGURA 3. Cromatografia em DEAE-sephacel do extrato de *C. paulina*. As frações correspondentes ao segmento "A", eluídas pelo gradiente iônico de 143 a 230 mM de KCl, foram reunidas e utilizadas na cromatografia de interação hidrofóbica. As demais frações foram descartadas.

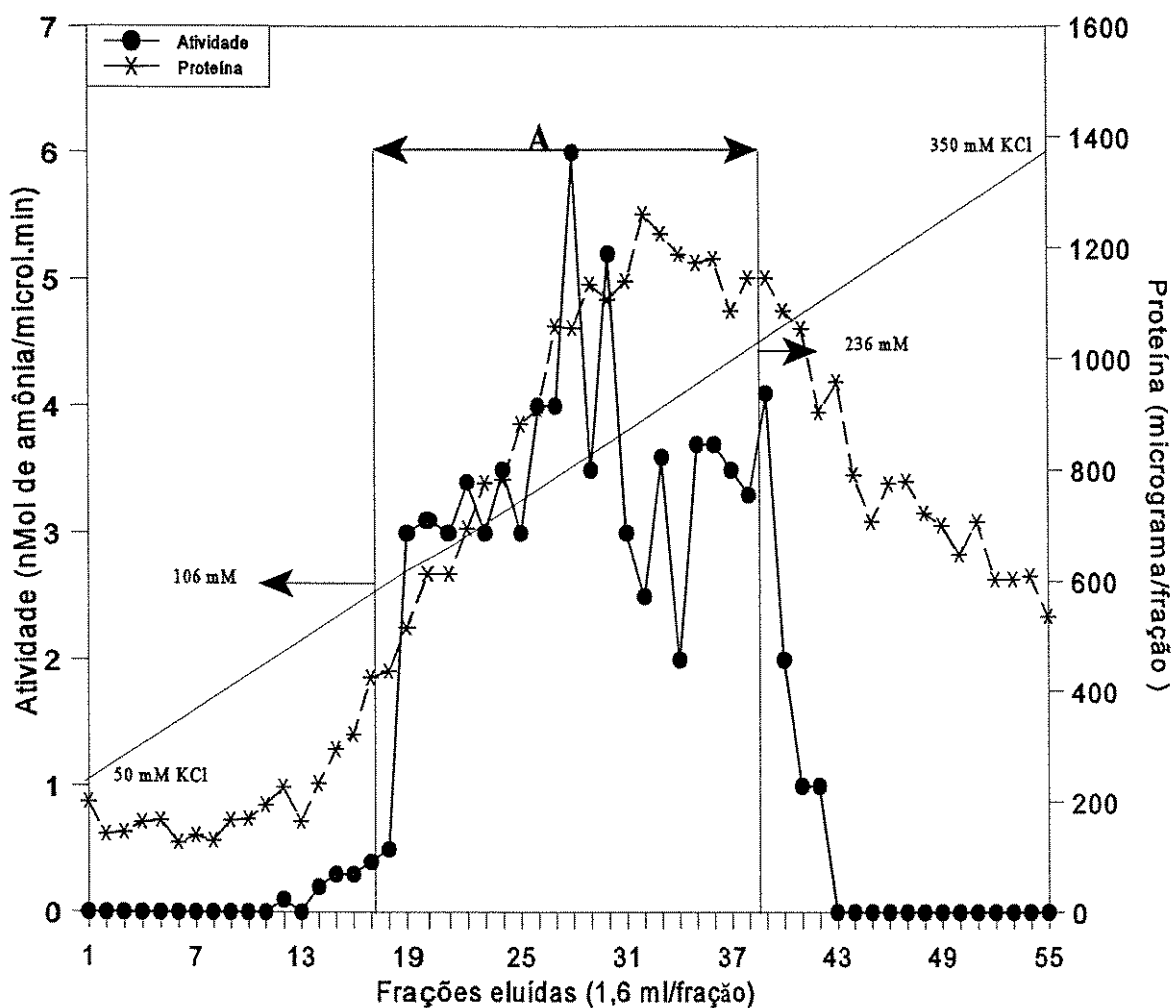


FIGURA 4. Cromatografia em DEAE-sephacel do extrato de *C. zanzibarica*. As frações correspondentes ao segmento "A", eluídas pelo gradiente iônico de 106 a 236 mM de KCl, foram reunidas e utilizados na cromatografia de interação hidrofóbica. As demais frações foram descartadas.

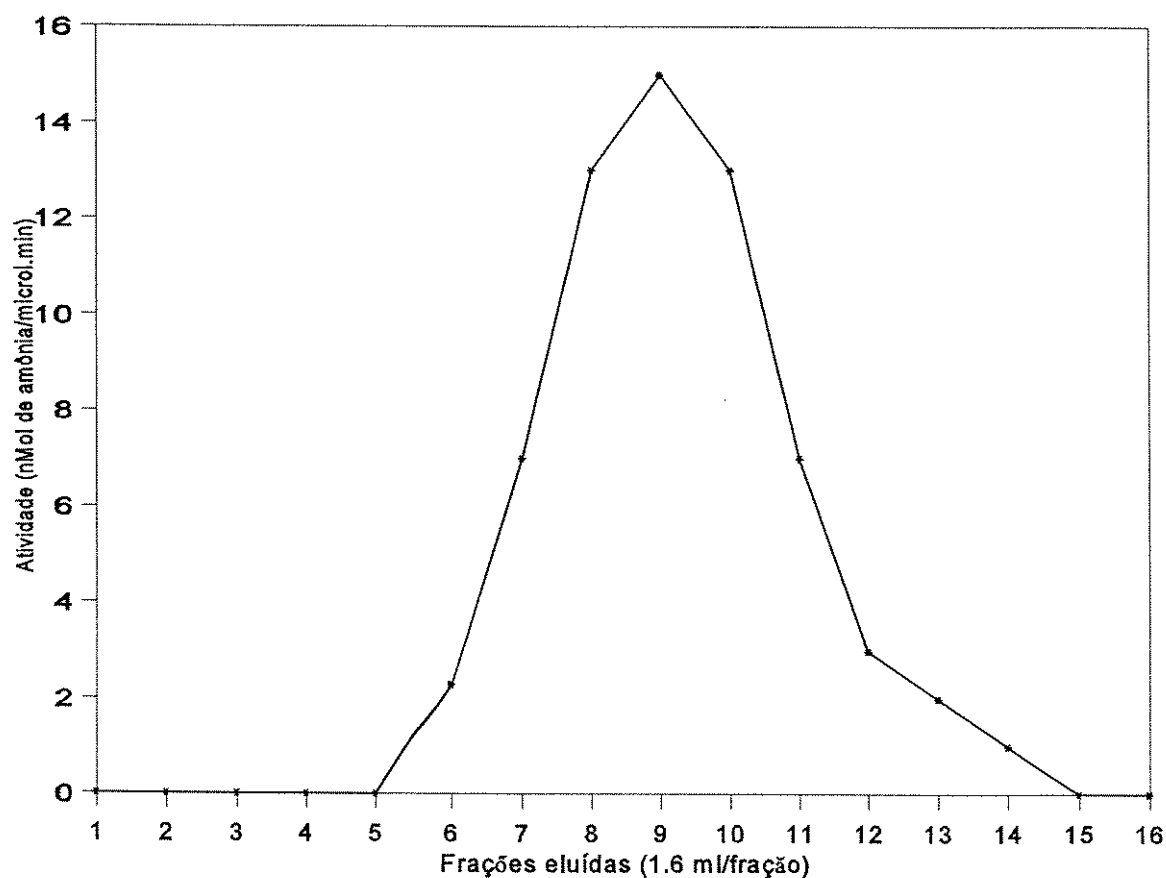


FIGURA 5. Cromatografia em Fenil-sepharose das frações de *C. juncea*. As frações com atividade de asparaginase na cromatografia de troca iônica foram reunidas, a concentração de KCl foi elevada para 1,55 M e aplicada à coluna. Após lavagem com 10 ml de tampão de extração com 1,55 M de KCl, as proteínas foram eluídas em passo único com tampão de extração com 50 mM.

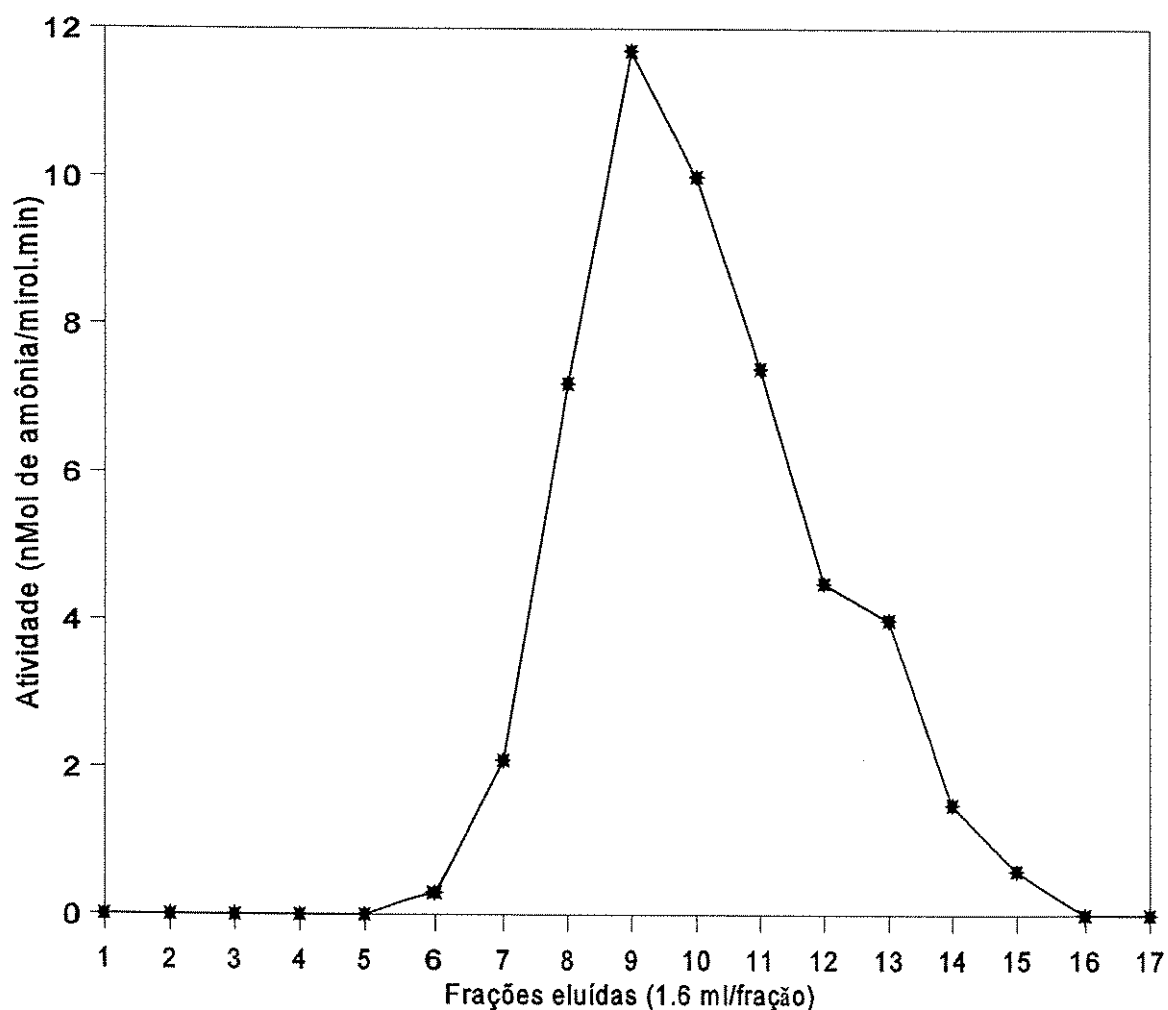


FIGURA 6. Cromatografia em Fenil-sepharose de frações de *C. paulina*. As frações com atividade de asparaginase eluídas da cromatografia de troca iônica foram reunidas, elevada a concentração de KCl foi elevada para 1,55 M, e aplicadas à coluna. Após a lavagem com 10 ml de tampão de extração 1,55M, as proteínas foram eluídas em passo único com tampão de extração 50 mM.

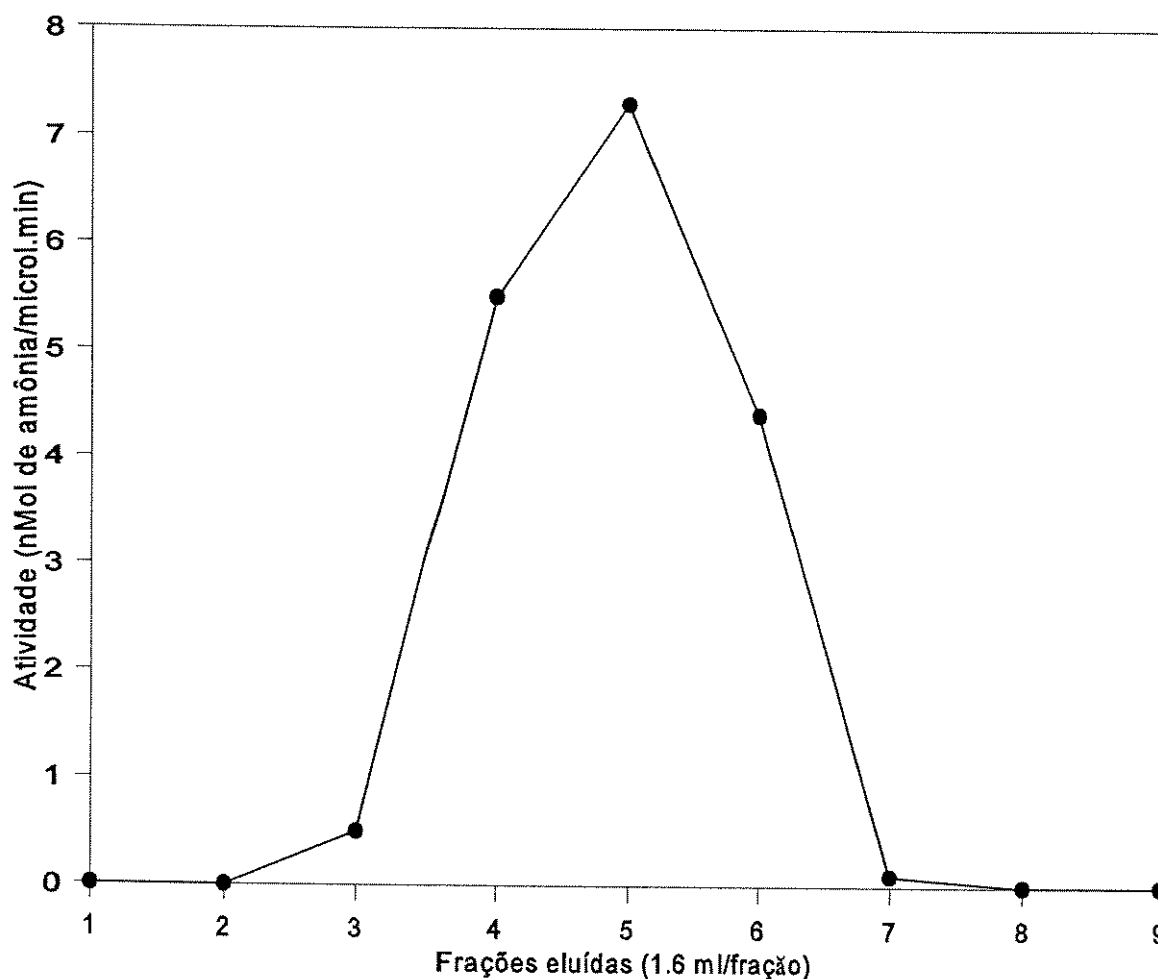


FIGURA 7. Cromatografia em Fenil-sepharose de frações de *C. zanzibarica*. As frações com atividade de asparaginase na cromatografia de troca iônica foram reunidas, a concentração de KCl foi elevada para 1,55 M e, em seguida, elas foram aplicadas à coluna. Após lavagem com 10 ml de tampão de extração com 1,55 M de KCl, as proteínas foram eluídas em passo único com tampão de extração 50 mM.

IV.2.6. CROMATOGRAFIA DE ELETROFORESE DE ALTA EFICIÊNCIA.

O princípio de separação de proteínas pelo HPEC é o mesmo do gel de poliacrilamida. Aliás, trata-se de um sistema onde as bandas protéicas são eluídas de um gel de poliacrilamida montado em uma coluna de vidro. Após a eluição, as proteínas são recolhidas, passam por um sensor de UV e vão para o coletor de frações.

Utilizando-se extrato eluído da coluna de Fenil-sepharose, após dessalinização, procedeu-se a duas separações. Na primeira, as frações eluídas foram imediatamente incubadas com o substrato, solução de asparagina, ficando de um dia para o outro. Na segunda separação com o mesmo gel, as frações foram utilizadas em PAGE. Para *C. juncea* este procedimento de purificação proporcionou resultados bastante satisfatórios. Obteve-se dois picos de atividade de asparaginase com as correspondentes bandas em PAGE. Na **Figura 8 e 9** é mostrado o perfil de atividade das frações eluídas do HPEC de *C. juncea* e *C. paulina*. Na **Figura 10** temos o registro da absorbância em 280 nm das proteínas eluídas do gel (eletroferograma) de *C. juncea*, na **Figura 11** a separação das proteínas em PAGE e na **Figura 12** em SDS-PAGE. Por estes dados pode-se dizer que existem duas isoenzimas de asparaginase em sementes imaturas de *C. juncea*. A primeira, designada E_1 migra no gel

NATIVO próximo à frente de azul de bromofenol, e em SDS-PAGE apresenta duas subunidades (20 e 37 kDa). A segunda E_2 , migra entre o monômero e o dímero de BSA e apresenta-se em gel Nativo como várias proteínas, até seis bandas, bem próximas, e que SDS-PAGE mostra serem agregações de uma mesma subunidade de peso 25 kDa.

Para **C. paulina** obteve-se um padrão de eluição de atividade catalítica de asparaginase semelhante a **C. juncea**. Em HPEC entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação com bandas protéicas. O resultado da eluição de atividade é mostrado na **Figura 9**. Na **Figura 13** temos o PAGE do material purificado de **C. juncea**. Realizou-se várias separações no HPEC e as frações com atividade catalítica foram reunidas e liofilizadas para concentração. Este material foi utilizado para imunização e caracterização.

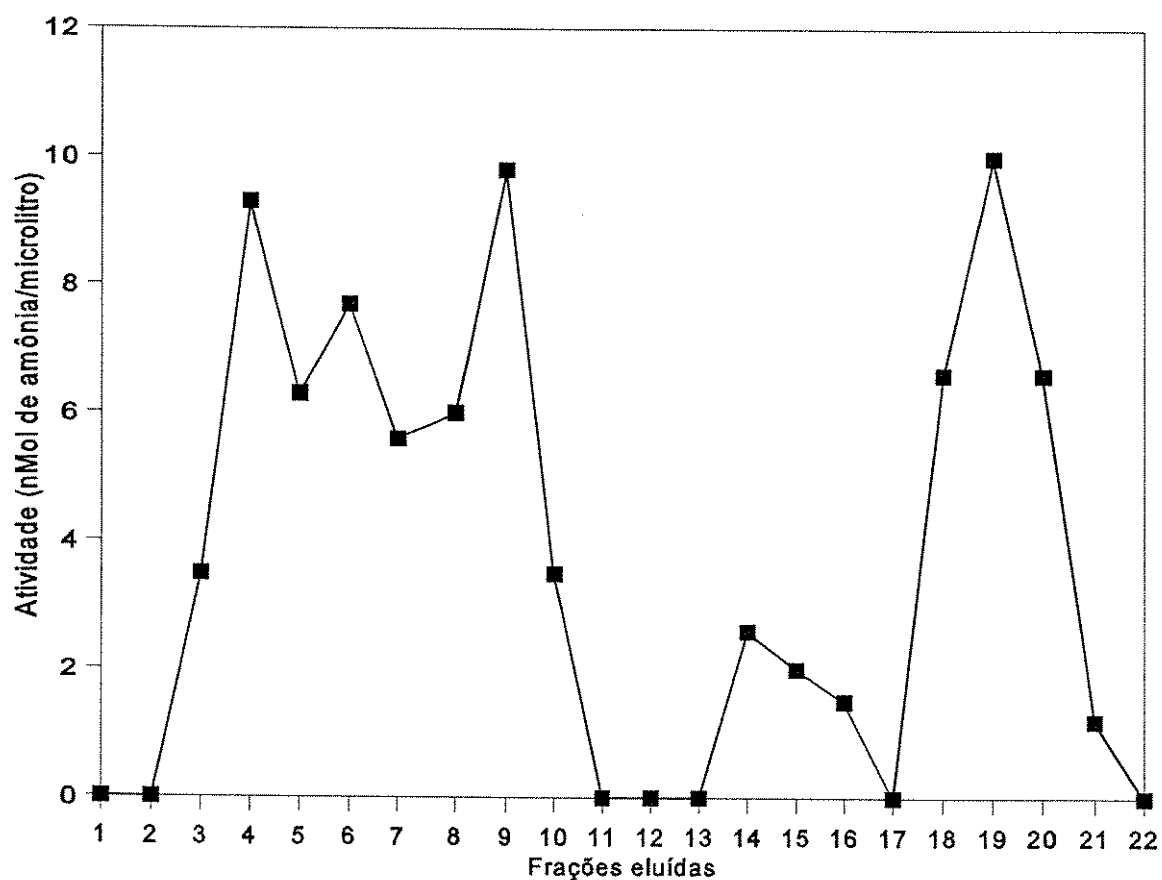


FIGURA 8. Cromatografia de alta eficiência de frações de *C. juncea*. O extrato obtido da cromatografia de interação hidrofóbica foi dessalinizado em coluna de sephadex G-25 antes de ser usado no HPEC. Cada fração tem volume igual a 60 μ l, correspondente a 4 min de eluição. Estas frações foram incubadas com asparagina de um dia para o outro, à temperatura ambiente, para determinação de atividade enzimática.

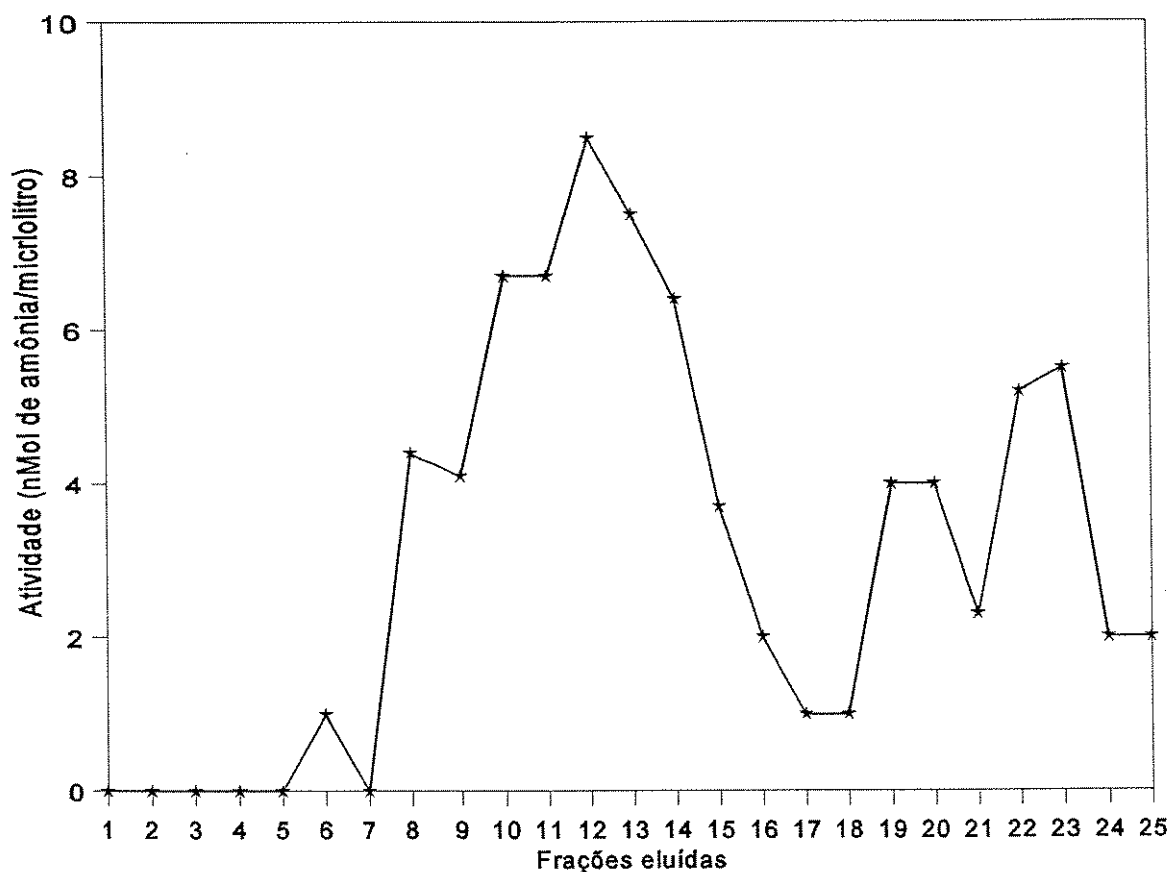


FIGURA 9. Cromatografia de eletroforese de alta eficiência de frações de *C. paulina*. O extrato obtido da cromatografia de interação hidrofóbica foi dessalinilizado em coluna de sephadex G-25. Cada fração tem volume igual a 60 μ l, correspondente a 4 min de eluição. Estas frações foram incubadas com asparagina de um dia para o outro, à temperatura ambiente, para determinação da atividade enzimática.

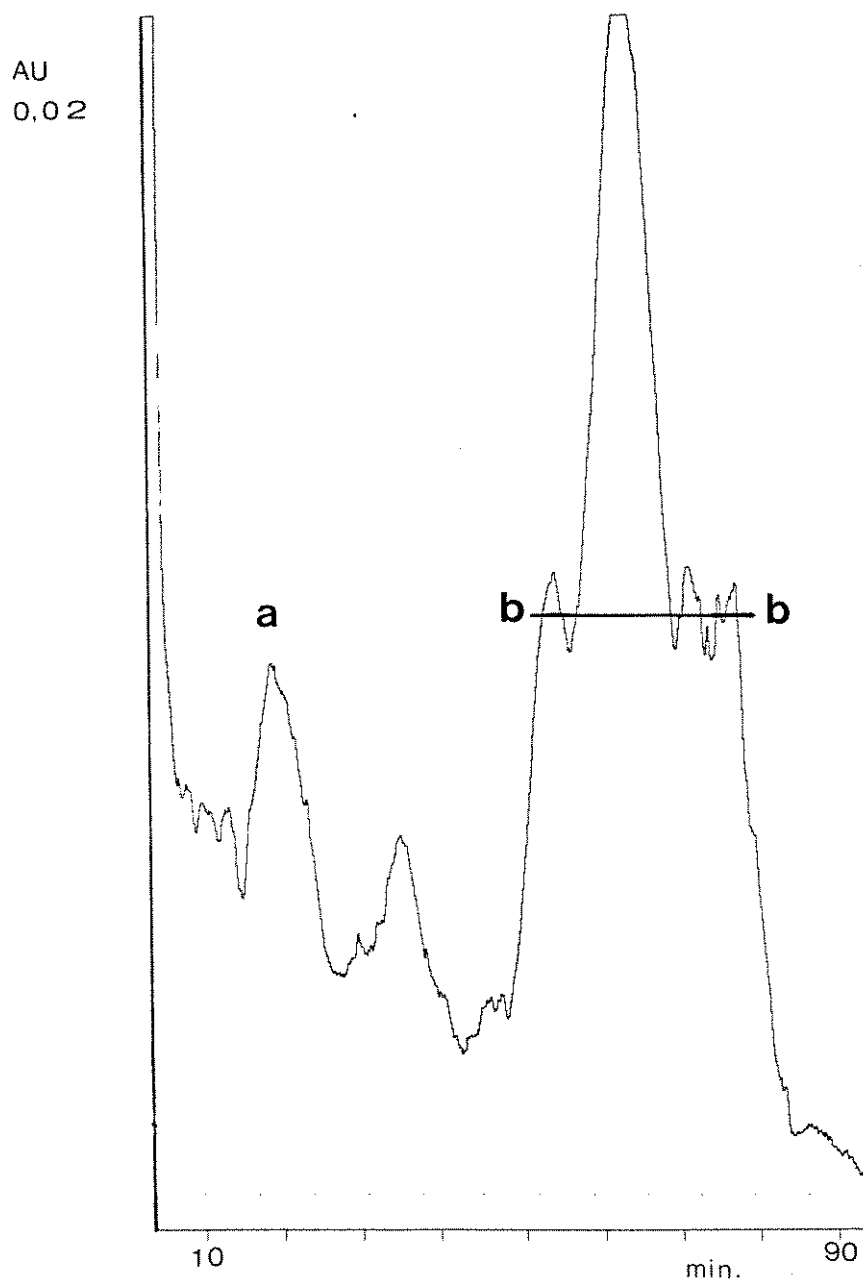


Figura 10 : Eletroferograma de extrato de *C. juncea*. O extrato de *C. juncea* após purificação em Fenil-sepharose, concentrado por liofilização, após ser dessalinizado foi aplicado ao HPEC. O pico "a" corresponde a E_1 enquanto os últimos, segmento "b", correspondem a E_2 .

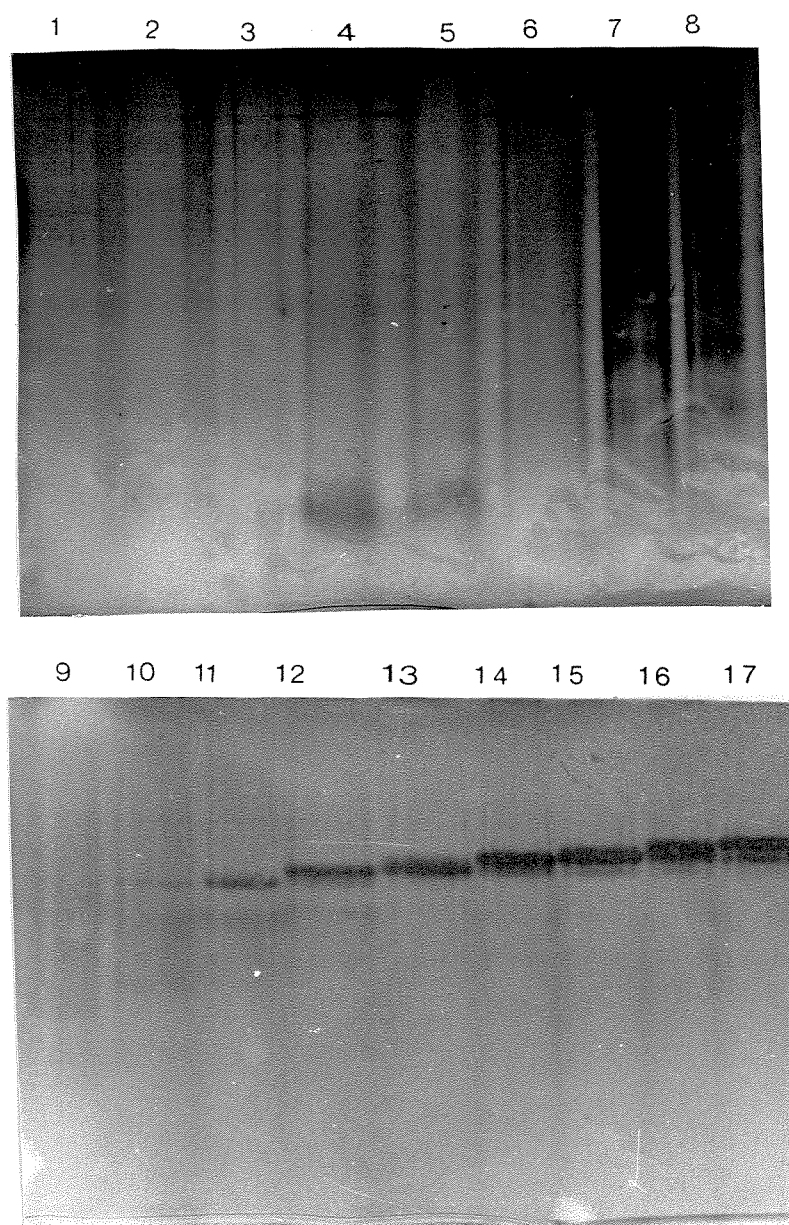


Figura 11. PAGE das frações de *C. juncea* eluídas do gel de poliacrilamida do HPEC. Observa-se E_1 e E_2 , a primeira na fração 4 e 5 e a segunda nas frações 10 a 17.

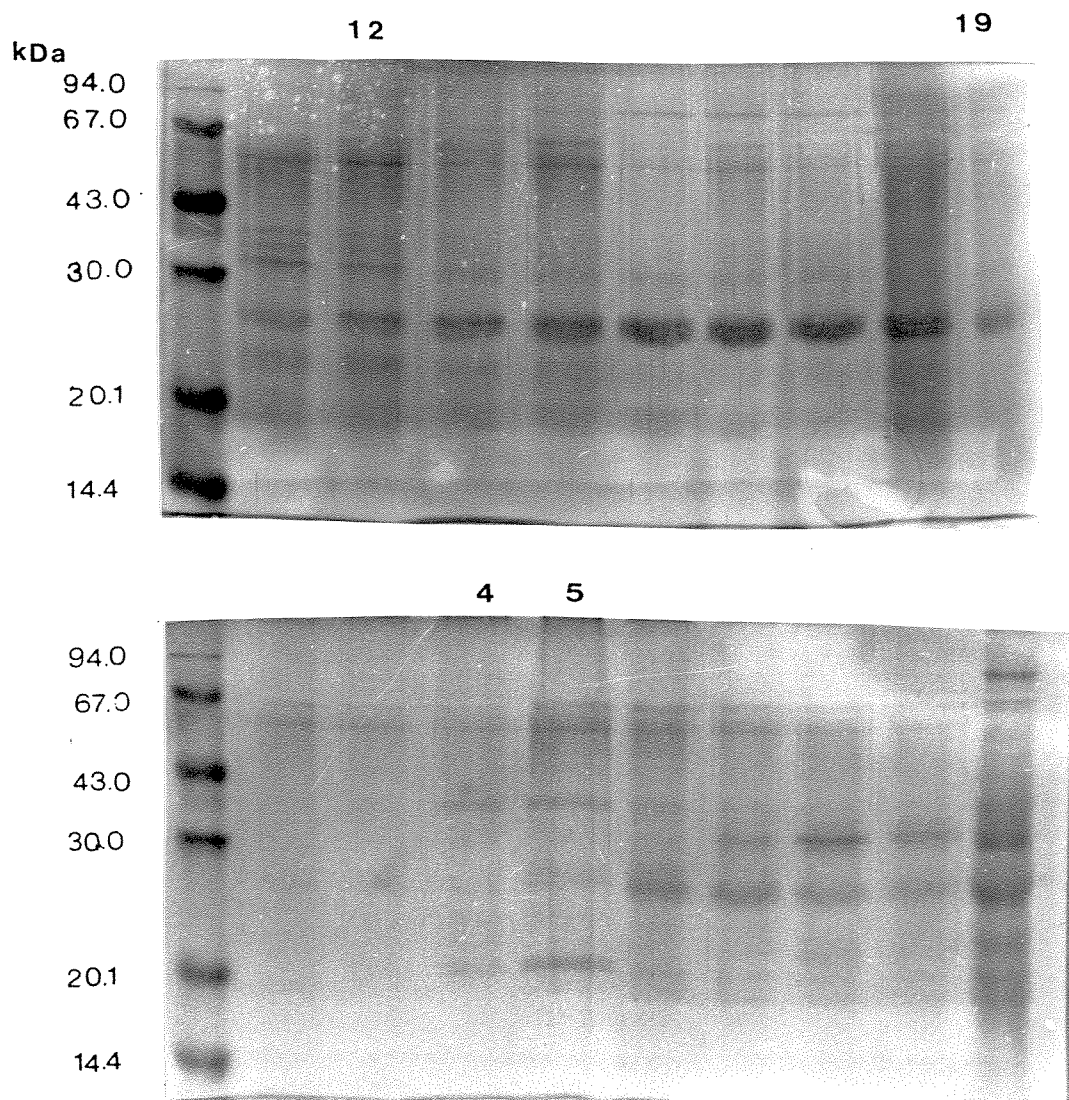


Figura 12. SDS-PAGE, das frações de *C. juncea* eluídas do gel do HPEC. Observa-se que E_1 dissocia-se em duas subunidades nas frações 4 e 5. E_2 , frações 12 a 19, dissocia-se em uma única subunidade. À esquerda encontram-se padrões de peso molecular da Pharmacia, através dos quais estimou-se os valores das subunidades, para E_1 de 37 e 20 kDa e para E_2 de 25 kDa.

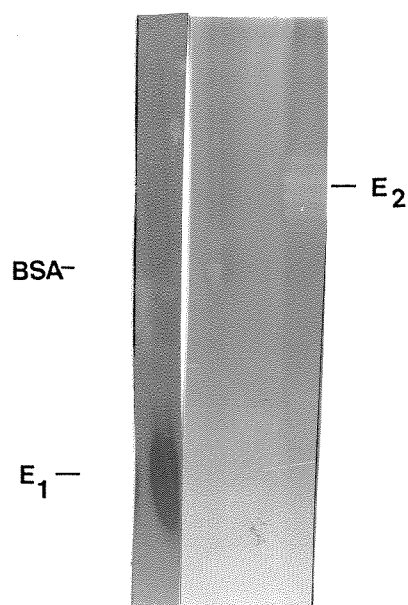


Figura 13. PAGE da E_1 , à esquerda, e E_2 , à direita, de *C. juncea*, purificadas pelo HPEC. Ao centro encontra-se BSA como proteína de referência.

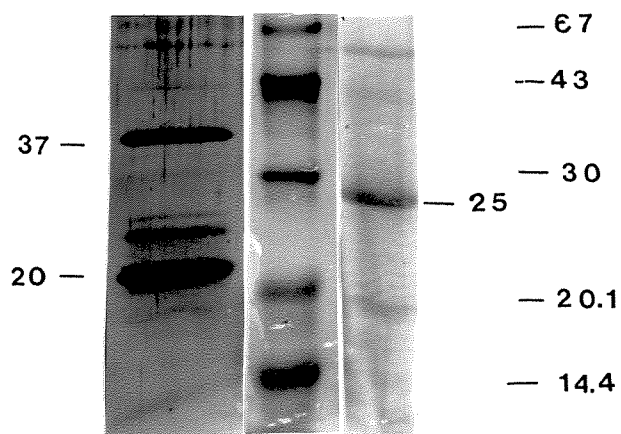


FIGURA 14. SDS-PAGE da E_1 , à esquerda, e E_2 , à direita, de *C. juncea*, purificadas pelo HPEC. Ao centro encontram-se proteínas de referência da Pharmacia. Valores indicados em kDa.

IV.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

IV.3.1. PESO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES.

Após obter-se material purificado, este foi desnaturado e analisado por SDS-PAGE, utilizando-se como referência padrões de peso molecular da Pharmacia para a estimativa do peso das subunidades da enzima. Na **Figura 14** são mostrados os resultados em SDS-PAGE, observando-se que E_1 é formada por duas subunidades de peso molecular de 20 e 37 kDa, enquanto E_2 é constituída de uma única subunidade de peso molecular estimado de 25 kDa.

IV.3.2. PESO MOLECULAR DA ENZIMA NATIVA.

As atividades das frações eluídas da coluna de Sephacril-S-200 das espécies *C. juncea*, *C. paulina* e *C. zanzibarica* são mostradas nas **Figuras 15, 16 e 17**. Para a estimativa do peso molecular os volumes de eluição foram comparados com aqueles obtidos na calibração com proteínas de peso molecular conhecido. Pelos dados obtidos identificou-se a presença de duas isoenzimas para as espécies *C. juncea* e *C. paulina*, uma possuindo peso molecular de 100 kDa e outra de 600 kDa. Estando a estimativa do peso molecular de 600 kDa no limite da coluna, assume-se que esta é uma estimativa menos precisa.

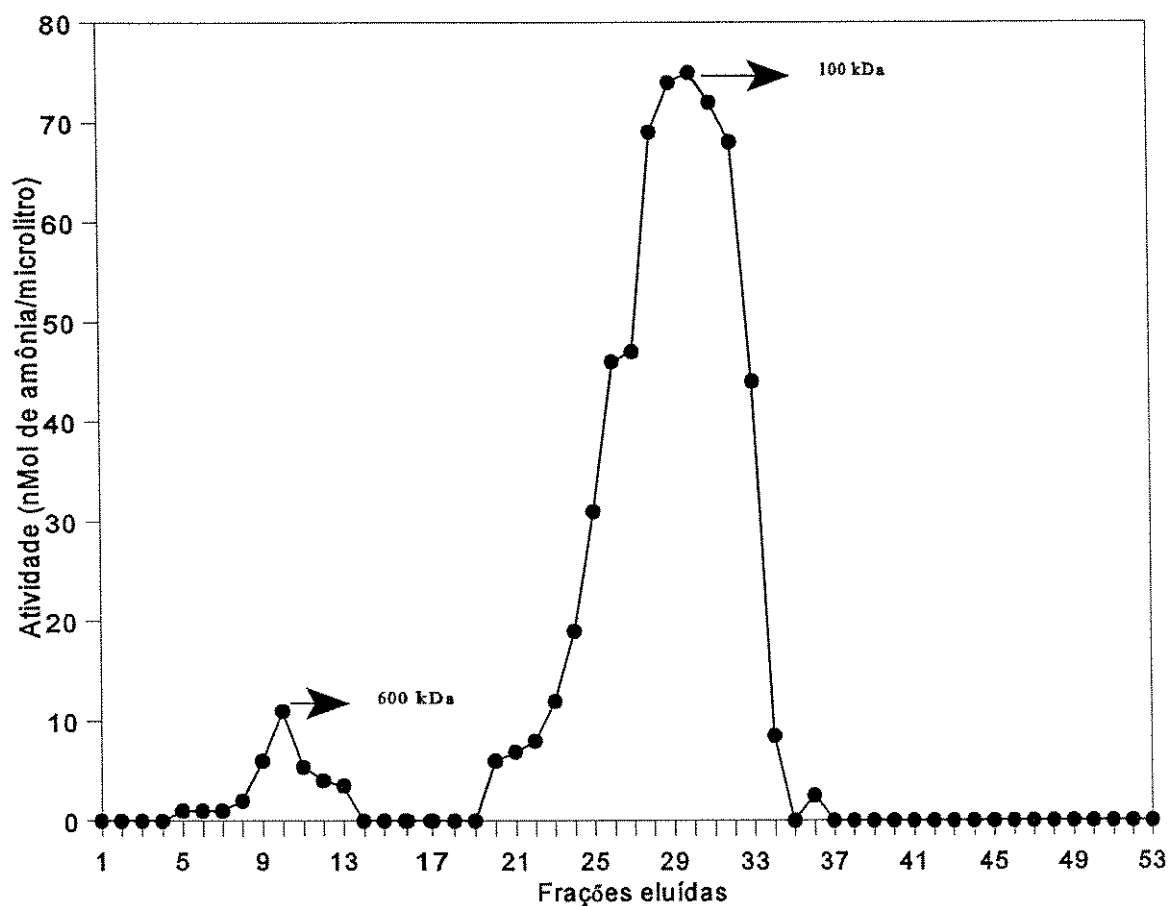


FIGURA 15. Cromatografia em Sephacryl S 200 de extrato de *C. juncea*. Cada fração tem o volume igual a 3,7 ml. O valor do peso molecular da enzima nativa foi obtido a partir da curva de calibração da coluna, $y = -1,7574x + 7,3680$, em que x é a relação entre o volume vazio (164 ml) pelo volume de eluição da proteína e y representa o logarítmo do peso molecular, em kDa, na base decimal.

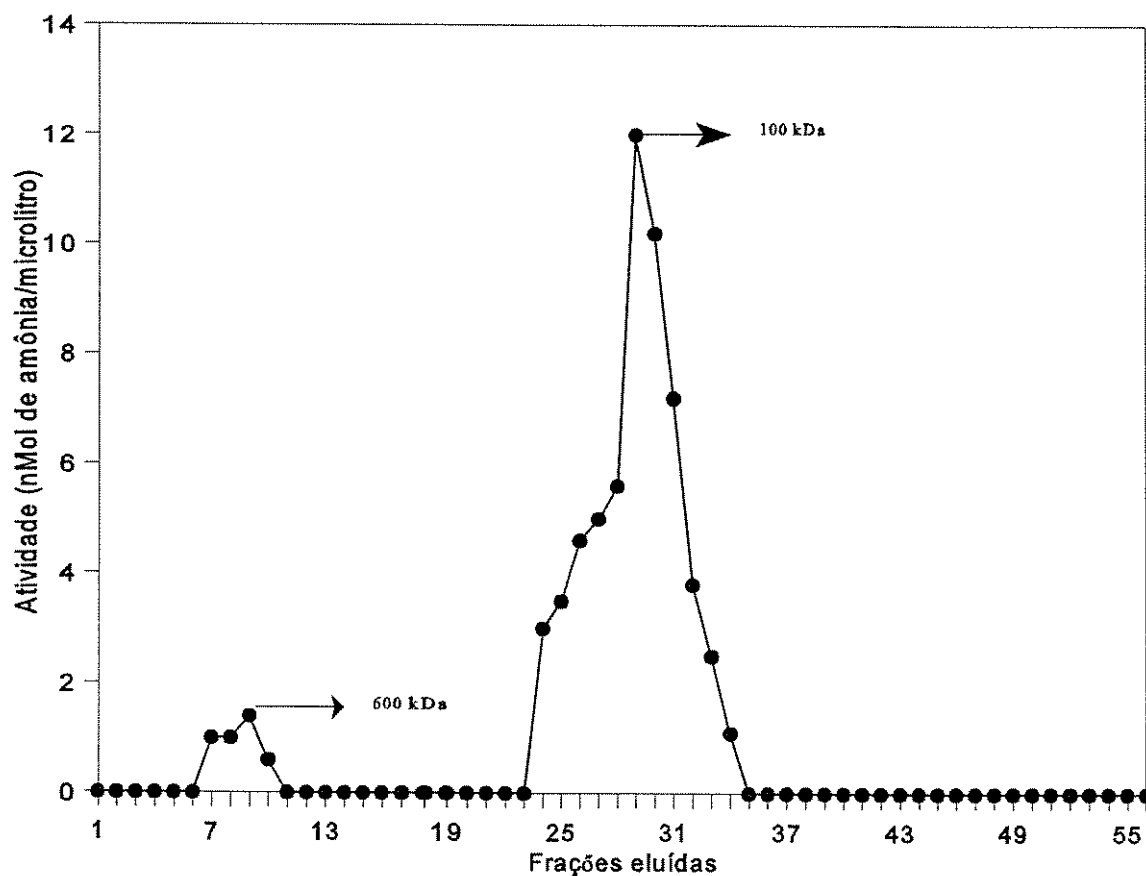


FIGURA 16. Cromatografia em Sephacryl S 200 de extrato de *C. paulina*. Cada fração tem o volume igual a 3,7 ml. O valor do peso molecular da enzima nativa foi obtido a partir da curva de calibração da coluna, $y = -1,7574x + 7,3680$, em que x é a relação entre o volume vazio (164 ml) pelo volume de eluição da proteína e y representa o logarítmo do peso molecular, em kDa, na base decimal.

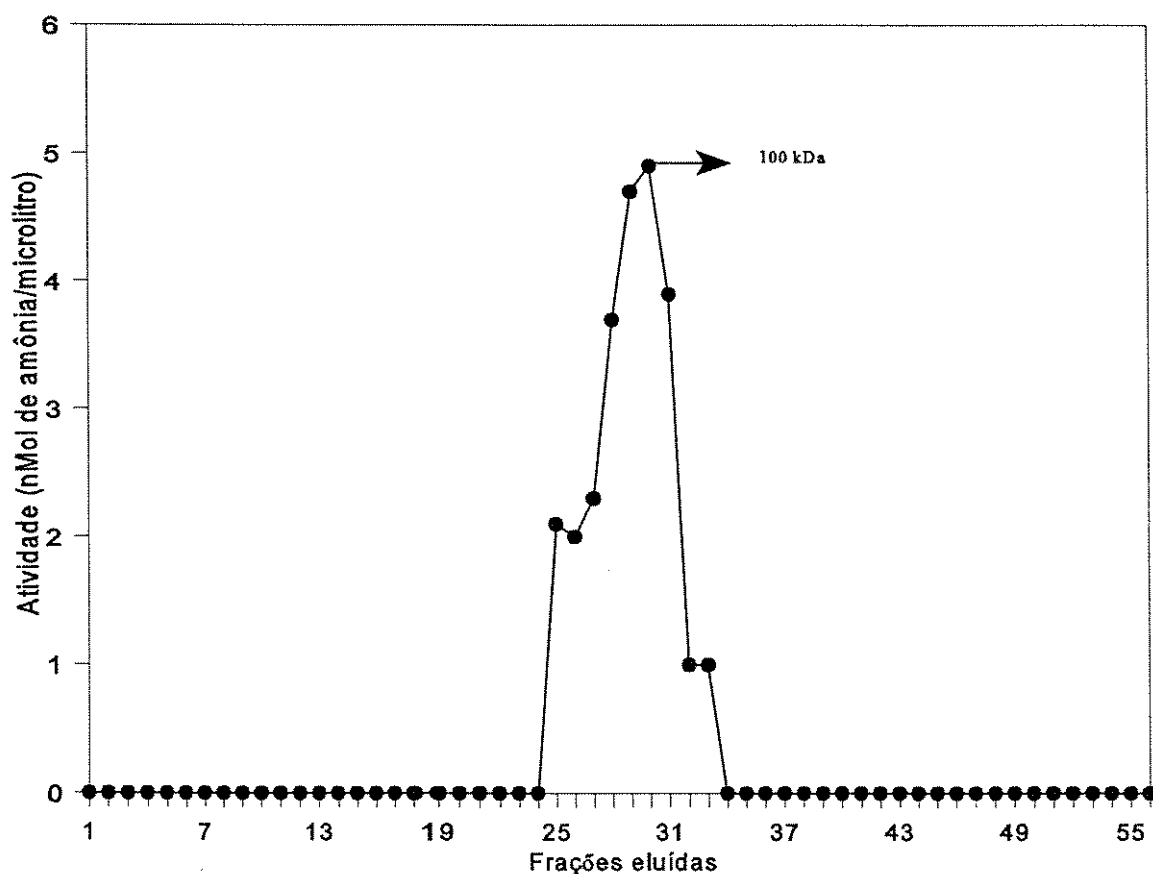


FIGURA 17. Cromatografia em Sephacryl S 200 de extrato de *C. zanzibarica*. Cada fração tem o volume igual a 3,7 ml. O valor do peso molecular da enzima nativa foi obtido a partir da curva de calibração da coluna, $y = -1,7574x + 7,3680$, em que x é a relação entre o volume vazio (164 ml) pelo volume de eluição da proteína e y representa o logarítmo do peso molecular, em kDa, na base decimal.

IV.3.3.TABELAS DE PURIFICAÇÃO.

TABELA 3. Tabela de purificação para *C. juncea*.

Fase da purificação	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade enzimática total (nMol/min.µl)	Atividade específica (nMol/min.mg)	Purificação (vezes)
Extrato bruto	250	2960	6,9	0,0023	1
Precipitação alcoólica	40	5	0,56	0,112	48
DEAE-sephacel	288	15	0,38	2,6	113
Fenil-sepharose	164	1	0,3	3	1304

TABELA 4. Tabela de purificação de *C. zanzibarica*

Fase da purificação	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade enzimática total (nMol/min.µl)	Atividade específica (nMol/min.mg)	Purificação (vezes)
Extrato bruto	244	2300	6,76	0,003	1
Precipitação alcoólica	62	9	0,68	0,076	25
DEAE-sephacel	35,2	0,520	0,55	1,06	352
Fenil-sepharose	9,6	0,08	0,21	2,66	886

TABELA 5. Tabela de purificação de *C. paulina*.

Fase da purificação	Volume total (ml)	Proteína total (mg)	Atividade enzimática total (nMol/min.µl)	Atividade específica (nMol/min.mg)	Purificação (vezes)
Extrato bruto	1085	6398	24,1	0,0038	1
Precipitação alcoólica	140	41,4	2,33	0,056	18
DEAE-sephacel	38,4	8,1	1,32	0,16	53
Pheyl-sepharose	17,6	0,23	0,66	2,87	956

Pelos dados das tabelas podemos observar que houve uma significativa purificação até o nível da precipitação etanólica. Como trabalhou-se com sementes imaturas em um estágio em que o endosperma ainda está líquido e não foi separado do tegumento, este alto nível até esta fase deve estar relacionado a proteínas e peptídeos solúveis no endosperma. Obteve-se uma purificação da ordem de mil vezes até o nível de Fenil-sepharose. Não foi possível obter os dados de purificação após HPEC devido às quantidades muito pequenas de proteínas obtidas após esta fase.

No processo de purificação a precipitação com sulfato de amônio teve uma importância relevante por reduzir o volume do extrato, ao passo que a precipitação etanólica produziu uma substancial purificação. A maior dificuldade encontrada foi a remoção do etanol

do extrato de *C. zanzibarica* após a precipitação etanólica por possuir muitos pigmentos lipossolúveis que reduzem o fluxo, tornando demorada esta etapa. No caso de *C. juncea* e *C. paulina* esta fase não apresentou os mesmos problemas.

Os testes quanto à metodologia restringiram-se ao aumento da capacidade de purificação. Conseguiu-se aumentar a capacidade utilizando-se uma coluna de sephadex LH 20 maior, e uma rolha de forma que a bomba peristáltica imprimisse uma pressão interna à coluna. Os procedimentos utilizados foram os descritos na literatura.

A coluna de sephacryl S 200 proporcionou uma boa separação. Porém não foi mais usada por estar disponível somente no final do trabalho. Com isso a sua utilização se deu para a obtenção do peso molecular, mas não para a purificação.

IV.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.

Pelo teste de ELISA obteve-se a confirmação de que o sistema imunológico dos animais estava produzindo anticorpos contra proteínas do extrato bruto de sementes imaturas. Testou-se também o soro pré-imune, produzindo reação negativa. Após este teste procedeu-se à análise da especificidade pelo Western Blot. Nas páginas seguintes, **Figuras 18 e 19**, tem-se as fotografias do

resultado deste teste para as imunoglobulinas produzidas contra a E_2 da *C. juncea* e para a enzima de *C. zanzibarica*, utilizando os respectivos antígenos. Observa-se que os anticorpos produzidos apresentaram uma alta especificidade para o antígeno. O anticorpo para a E_2 de *C. juncea* identifica todos os níveis de agregação que ela apresenta em PAGE, Fig. 18 "A" e "B", e o anticorpo de *C. zanzibarica* identifica uma banda em posição igual à banda central de *C. juncea*, Fig. 18 "C", e que sempre mostra-se mais intensa. Isto mostra que a enzima de *C. zanzibarica* apresenta a mesma mobilidade eletroforética em PAGE que a enzima de *C. juncea*, além do fato de os anticorpos apresentarem uma alta especificidade ao antígeno, isto é, à enzima.

Quando estes anticorpos foram testados contra *C. paulina*, o anticorpo de *C. juncea* não reagiu, ao passo que o de *C. zanzibarica* produziu reação positiva (dados não apresentados). Estes resultados não eram esperados, uma vez que *C. juncea* e *C. paulina* são dependentes de potássio, enquanto *C. zanzibarica* é independente deste co-fator. *C. paulina* apresentou a banda em posição diferente, equivalente à posição do monômero de BSA, ao passo que *C. juncea* e *C. zanzibarica* apresentaram reação em posição intermediária entre o monômero e o dímero de BSA (Fig. 13 "C" e Fig. 18 "C").

Testando-se o anticorpo de *C. zanzibarica* e *C. juncea*

utilizando-se o antígeno de uma contra a outra para verificar se existe reação cruzada, obteve-se resultado equivalente àquele obtido com o anticorpo com o seu próprio antígeno, **Figura 18**.

Quando testado o anticorpo de **C. juncea** contra o extrato desnaturado de **C.zanzibarica** obteve-se, uma banda em posição equivalente da subunidade de 25 kDa de **E₂** de **C.juncea** (**Fig. 19**). No caso de **C. juncea**, além da banda equivalente a 25 kDa, apareceu uma banda larga em posição muito próxima à frente de azul de bromofenol, provavelmente fragmentos da degradação da enzima.

Testou-se também os dois anticorpos produzidos contra várias espécies de **Crotalaria** que estão sumarizados na **Tabela 6**. Nesta tabela observa-se que o anticorpo de **C.zanzibarica** só não reagiu com **C. mucronata** e **C. incana**, ambas as espécies independentes de co-fator potássio. O anticorpo para **E₂** de **C. juncea** não reagiu com **C. paulina**. Testou-se também os dois anticorpos contra o antígeno de **Lupinus albus** (dependente) e **Lupinus polyphyllus** (independente), produzindo reação positiva dos dois anticorpos com as duas espécies.

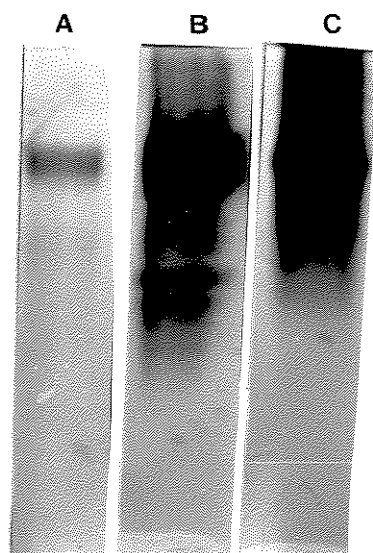


Figura 18. Western Blot utilizando anticorpos policlonais contra E_2 de *C. juncea*. "A" extrato purificado até Fenil-sepharose e "B" extrato inicial de *C. juncea*. "C" extrato inicial de *C. zanzibarica*. O material utilizado foi separado em PAGE nativa.



Figura 19. Western Blot utilizando anticorpos policlonais contra E_2 de *C. juncea*. A esquerda, "A", extrato inicial de *C. zanzibarica*, a direita, "B", extrato inicial de *C. juncea*. O material utilizado foi separado em SDS-PAGE.

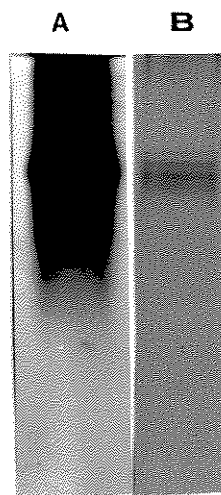


Figura 20. Western Blot com anticorpo de *C. zanzibarica* e *C. juncea* para verificação de reação cruzada. "A", extrato inicial de *C. zanzibarica* contra anticorpo de *C. juncea*. "B" extrato inicial de *C. juncea* com anticorpo de *C. zanzibarica*.

TABELA 6. Resultado positivo (+) ou negativo (-) de Western Blot utilizando-se os anticorpos produzidos, contra diferentes espécies de *Crotalaria* e de *Lupinus*.

Espécie	Anticorpo contra E ₂ de <i>C.juncea</i>	Anticorpo contra enzima de <i>C.zanzibarica</i>
<i>C.anagiroides</i>	+	+
<i>C.lanceolata</i>		+
<i>C.incana</i>	+	-
<i>C.usaramoensis</i>	+	+
<i>C.mucronata</i>		-
<i>C.grantiana</i>		+
<i>C.zanzibarica</i>	+	+
<i>C.mitosa</i>		+
<i>C.spectabilis</i>		+
<i>C.paulina</i>	-	+
<i>C.retusa</i>		+
<i>C.striata</i>		+
<i>C.juncea</i>	+	+
<i>Lupinus albus</i>	+	+
<i>Lupinus polyphylus</i>	+	+

V. DISCUSSÃO.

Entre as leguminosas tropicais estudadas conseguiu-se detectar atividade de asparaginase em oito espécies do gênero *Crotalaria*, em *C. cajans* (feijão guandu) e em *G. max* (soja perene). Em *Crotalaria* houve uma ampla distribuição das duas formas da enzima; cinco espécies apresentaram enzima independente de potássio como co-fator e três apresentaram enzima dependente. Segundo a literatura, somente o gênero *Lupinus* apresenta espécies com os dois tipos de enzima, com duas espécies dependentes de potássio, *L. angustifolius* e *L. albus* e duas independentes, *L. polyphylus* e *L. arboreus* (SODEK et al., 1980; CHANG & FARNDEN 1981). Em *Crotalaria* um fato interessante foi a correlação entre a morfologia foliar e a atividade enzimática. Todas as espécies unifolioladas apresentam enzima dependente de potássio, enquanto aquelas trifolioladas apresentam enzima do tipo independente deste co-fator. Esta correlação não existe em *Lupinus*, e, talvez, seja uma característica adquirida no processo evolutivo do gênero por uma inversão gênica, o que levaria a uma segregação conjunta, e não mais aleatória, destas duas características, funcionando como um super-gene. É difícil imaginar que uma característica morfológica

deste tipo tenha alguma correlação funcional com as características de regulação enzimática. Em *C. cajans* observou-se que as características enzimáticas da asparaginase presente no tegumento da semente imatura são diferentes daquelas presente no cotilédone (Tabela 2). No tegumento a enzima é independente de potássio enquanto aquela presente no cotilédone é dependente. CHANG & FARNDEN, (1981) encontraram que a enzima presente em raízes, nódulos e folhas jovens de espécies do gênero *Lupinus* é dependente de potássio, enquanto em sementes imaturas a asparaginase é independente desse co-fator. Não se encontra na literatura nenhuma referência como o observado em *C. cajans*, ou seja, ao fato de em um mesmo órgão serem encontradas as duas formas da enzima. No entanto, tais dados recebem suporte no trabalho de CHANG & FARNDEN (1981), que mostra que no genoma de um mesmo indivíduo existem os dois tipos de genes codificando para os dois tipos de enzima. Na fase inicial, quando o endosperma é líquido, a atividade concentra-se no tegumento e é independente de potássio. Com o desenvolvimento do cotilédone, a atividade concentra-se neste órgão e é dependente de potássio. Em *G. max* não se encontrou nenhuma característica especial, uma vez que foi testada somente uma espécie deste gênero e as características da enzima presente na testa e nos cotilédones não apresentam diferenças.

No gênero *Crotalaria* encontrou-se a maior dispersão da presença da asparaginase, e em suas duas formas. Sendo este um gênero tipicamente tropical, optou-se por aprofundar o trabalho dentro de seus limites. Em decorrência destas características, da facilidade de cultivo e das características do extrato protéico, trabalhou-se com duas espécies com enzima dependente de potássio, *C. juncea* e *C. paulina*, e uma independente deste co-fator, *C. zanzibarica*. Por cromatografia de filtração em gel, com Sephacryl-200, e por Eletroforese de Alta Eficiência, identificou-se a presença de duas isoenzimas em cada uma das espécies dependentes de potássio. O perfil de eluição das duas isoenzimas é o mesmo nas duas espécies, uma correspondendo a um peso molecular de 600 kDa e outra a 100 kDa. Em *C. zanzibarica* encontrou-se somente uma forma da enzima, com peso molecular de 100 kDa.

Em *C. juncea* conseguiu-se separar as duas enzimas. A primeira (E_1), com 600 kDa, em SDS-PAGE apresentaram duas subunidades com pesos moleculares de 20 e 37 kDa, enquanto a de 100 kDa (E_2), em SDS-PAGE mostra uma única subunidade de peso molecular de 25 kDa, que agrega-se em até 6 níveis diferentes, como pode-se ver na Fig.13 "C". Dependendo da purificação, apareceram diferentes níveis de agregação, inclusive uma única em posição equivalente à banda central que mostra-se sempre mais intensa. Esta banda deve

corresponder à agregação de 4 (quatro) subunidades de 25 kDa, formando uma enzima de 100 kDa. Para *C. paulina* e *C. zanzibarica* embora utilizando-se os mesmos métodos, não foi possível obter a purificação obtida para *C. juncea* em HPEC. Em estudos mais recentes, LOUGH et al., (1992), trabalhando com *L. arboreus*, identificaram três isoenzimas constituídas de polipeptídeos que vão de 14 a 19 kDa. SODEK & LEA (1993) obtiveram para *L. polyphyllus* peso molecular de 71 kDa para a enzima nativa e duas subunidades de 35 e 36 kDa.

Produziu-se anticorpo policlonal para uma das duas isoenzimas de *C. juncea* (E_2) utilizando-se material purificado até o HPEC e para *C. zanzibarica* material obtido até a purificação com coluna de interação hidrofóbica. Os anticorpos para *C. juncea* reagiram em posição equivalente à E_2 da mesma espécie para a qual foi produzido anticorpo, mostrando linhas equivalentes aos níveis de agregação. Estes níveis não são percebidos na fotografia ficando com uma mancha larga Fig. 18 "B". Este anticorpo para *C. juncea*, quando testado através de Western Blot contra extrato bruto de *C. paulina* e *C. zanzibarica* reagiu somente com a segunda, em posição equivalente à enzima de mesmo peso molecular da *C. juncea*; o blot apresentou uma mancha contínua com alargamento lateral nesta posição sem apresentar indícios de que existia agregação em vários

níveis Fig. 18 "C". Repetindo-se o teste com SDS-PAGE e anticorpo contra E₂ de *C. juncea*, o extrato de *C. zanzibarica* apresentou reação na mesma posição que *C. juncea*, mostrando ser constituída de uma única subunidade de peso molecular 25 kDa Fig. 19 "A". Estas duas enzimas apresentam bastante similaridade, apesar de uma ser dependente e a outra independente de potássio, indicando que ambas são formadas pela agregação de quatro subunidades de 25 kDa. *C. zanzibarica* apresenta características que não possibilitaram a identificação através dos métodos utilizados para *C. juncea*. Com *C. zanzibarica*, em PAGE, as bandas apareceram sempre difusas e em posições diferentes segundo o lote de purificação. A impressão é de que o material se liga à matrix do gel de poliacrilamida de forma diferente segundo o lote de purificação, não se tendo êxito com esta espécie quando da utilização do HPEC. Merece observação o fato de que as sementes imaturas desta espécie apresentam grande quantidade de pigmentos e, pelo escurecimento posterior ao início dos procedimentos de purificação, parecem estar relacionadas com as substâncias fenólicas. Para *C. juncea* em sistema desnaturante, com anticorpo produzido contra ela mesma, o teste apresentou reação em posição não esperada; além da mancha que corresponde à subunidade de 25 kDa, foi observada uma mancha larga próxima à frente de azul de bromofenol, correspondendo a peso molecular igual ou inferior a

14 kDa. Acredita-se que tais fragmentos sejam produto da degradação da subunidade ou peptídeos envolvidos na síntese da enzima.

O anticorpo produzido contra a enzima de *C. zanzibarica* foi testado contra as outras duas espécies. Reagiu com as duas, sendo que com *C. paulina* reagiu em posição equivalente ao monômero de BSA enquanto que para E₂ de *C. juncea* ocorreu reação com os vários níveis de agregação de uma mesma subunidade de 25 kDa. Testou-se, também contra extrato bruto de *L. poliphyllus*, produzindo reação positiva na mesma posição da *C. paulina*, coerente com os dados de literatura (SODEK & LEA 1993). *C. zanzibarica* parece apresentar características intermediárias no que se refere a determinantes antigênicos, pois os anticorpos reconhecem tanto *C. juncea* como *C. paulina*. Além disto, analisando-se do ponto de vista de sequência de aminoácidos que definem a dependência ao potássio, esta parece não apresentar uma função essencial na antigenicidade, ou talvez exista mais de uma conformação que defina as características de dependência ao co-fator potássio, o que explicaria o não reconhecimento de *C. paulina* pelo anticorpo de *C. juncea*.

Os dados obtidos indicam a existência de uma variabilidade muito grande no sistema de asparaginase. SODEK & LEA (1993) obtiveram dados de imunoquímica com *L. polyphyllus* e ervilha (*Pisum sativum*) que indicam ser a característica de dependência ao potássio

essencial na antigenicidade desta proteína, fato não observado pelos dados obtidos com *Crotalaria*.

Não foi possível realizar alguns experimentos que poderiam gerar dados complementares que elucidariam algumas hipóteses:

1. fazer a cinética e testar possíveis co-fatores,
2. em *C. paulina* purificar quantidades maiores utilizando sephacryl S 200 ao invés do HPEC, caracterizando a enzima em PAGE e SDS-PAGE e com o anticorpo de *C. zanzibarica*,
3. testar as diferentes espécies através de Western Blot em sistema Nativo e desnaturante definindo a mobilidade relativa em relação a padrões,
4. fazer seqüenciamento do N-terminal.

VI. CONCLUSÕES

No gênero *Crotalaria* existe uma ampla distribuição da enzima asparaginase, tanto em sua forma dependente de potássio como independente deste co-fator. As espécies estudadas com enzima do tipo dependente apresentam morfologia foliar unifoliolada, enquanto as independentes são trifolioladas.

As espécies estudadas com enzima dependente de potássio como co-fator, *C. juncea* e *C. paulina*, apresentam duas isoenzimas, uma com 100 kDa e outra com 600 kDa, enquanto a independente de potássio, *C. zanzibarica*, apresenta somente uma enzima com 100 kDa. As isoenzimas de *C. juncea* foram caracterizadas a nível de subunidades. A isoenzima de 600 kDa em SDS-PAGE apresenta duas subunidades, uma de 20 e outra de 37 kDa, enquanto a de 100 kDa, que em sistema nativo apresenta-se em vários níveis de agregação, apresenta uma única subunidade de 25 kDa.

Os anticorpos produzidos contra a isoenzima de 100 kDa de *C. juncea* não reconhecem a enzima de *C. paulina*, mas reconhece a de *C. zanzibarica*. Os anticorpos produzidos contra *C. zanzibarica* reconhecem ambas.

Por Western Blots, utilizando sistemas nativo e desnaturante caracterizou-se a enzima de *C. zanzibarica* como tendo mobilidade

eletroforética igual à E₂ de *C. juncea* e subunidade de 25 kDa, agregando-se em um único nível.

Pelo mesmo método, utilizando anticorpo contra *C. zanzibarica*, constatou-se que a enzima nativa de *C. paulina* possui mobilidade eletroforética equivalente ao monômero de BSA, e igual a de *L. poliphyllus*.

VII. LITERATURA CITADA.

- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; SHARKEY, P.J. 1975. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. **Plant Physiol.** 56:807-12.
- ATKINS, A.T.; PATE, J.S.; PEOPLES, B.M. & JOY, K.W. 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiol.** 71:841-48.
- BERGERSEN, F.J. 1965. Ammonia an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. **Aust. J. Biol. Sci.** 18:1-9
- BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L. 1967. Nitrogen fixation by the bacterioid fraction of breis of soybean root nodules. **Biochem. Biophys. Acta** 141:507-15
- BOLLARD, E.G. 1960. Transport in the xylem. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 11:141-46.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- CHANG, K.S.; FARNDEN, K.J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus arboreus* and *Lupinus angustifolius*. *Arch. of Biochem. Biophys.* 208, 1:49-58.
- DATE, R.A. 1973. Nitrogen a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. *Soil Biol. Biochem.*, 5:5-18.
- DIE, J.van; WILLENSE, P.C.M. 1975. Mineral and organic nutrients in sieve tube exudate and xylem vessel sap of *Quercus rubra* L. *Acta Bot. Neerl.*, 24:237-39.
- GIVAN, C.V. 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* 18:375-82
- HALL, S.M.; BAKER, D.A. 1972. The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta.*, 106:131-40.
- HARDY, R.W.F.; HAVELKA, V.P.; 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food. *Science.*, 188:633-43.

IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1981. Two routes for asparagine metabolism in *Pisum sativum* L. *Planta* 151:289-92.

IRELAND, R.J. & JOY, K.W. 1983. Subcellular localization of asparaginase and asparagine aminotransferase in *Pisum sativum* leaves. *Plant Physiol.* 72:1127-29.

JOHNSTON, A. & THORPE, R. 1987. Immunochemistry in practice Blackwell Science Publications, 2nd ed. Oxford, England 306 pp.

JOY, K.W. 1988. Ammonia, glutamine, and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Can. J. Botany.* 66:2103-9.

LEA, P.J.; FOWDEN, L. 1975. Asparagine metabolism in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 168:3-14.

LEA, P.J.; FOWDEN, L.; MIFLIN, B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry* 17:217-22.

LEA, P.J.; FESTENSTEIN, N.J.; HUGHES, S. J. & MIFLIN, B. J. 1984. An immunological and enzymological survey of asparaginase in

seeds of *Lupinus*. *Phytochemistry* 3:511-14.

LOUGH, T.J.; CHANG, K.S.; CARNE, A.; MONK, C.B.; REYNOLDS, P.H.;
FARNDEN, K.J.F. 1992. L-asparaginase from developing seeds of
Lupinus arborius. *Phytochemistry* 31, 5:1519-27.

McCLURE, P.; ISRAEL, W.D. & VOLK, R.J. 1980-Evaluation of the
relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂
fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-25.

McLLOUGH, H. 1967. The determination of ammonium in whole blood by
a direct colorimetric method. *Clin. Chem. Acta.* 17:297-304.

MURRAY, D.R.; KENNEDY, I.R. 1980. Changes in activities of enzymes
of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo
development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66: 782-86

OACKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R. & MORRIS, N. R. 1980. A siplified
ultrasensitive silver stain for detecting protein in
polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105(2):361-63.

PATE, J.S.; SHARKEY, P.J.; LEWIS, O.A.M. 1974. Phloem bleeding

from legume fruits- a technique for study of fruit nutrition.
Planta 120:229-43.

PATE, J.S.; SHARKEY, P.J.; LEWIS, O.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. **Planta** 122:11-26.

PEOPLES, B.M.; ATKINS C.A.; PATE, J.S.; MURRAY, D.R. 1985. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. **Plant Physiol.** 77:382-8.

RATAJCZAK, W. 1986. Asparagine metabolism in developing seeds of *Lupinus luteus* L. **Biochem. Physiol. Pflanzen** 181:17-22.

RAINBIRD, M.R.; THORNE, J.H. & HARDY, F.W.R. 1984. Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. **Plant Physiol.** 74:329-34.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. 1992. **Plant Physiology**. 4th ed. Wasworth Publishing Company, Belmont, California USA.

SCHUBERT, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in

higher plants: synthesis, transport and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 37:539-74.

SERVAITES, J.C.; SCHRADER, L.E. & JUNG, D.M. 1979. Energy-dependent loading of amino acid and sucrose loading in the phloem. **Plant Physiol.** 64:546-50.

SIECIECHOWICZ, K.A.; JOY, K.W.; IRELAND, R.J. 1988. The metabolism of asparagine in plants. **Phytochemistry** 37:663-71.

SIECIECHOWICZ, K.; IRELAND, R.J.; JOY, K.W. 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. **Plant Physiol.** 77:506-8.

SIECIECHOWICZ, K.A.; IRELAND, R.J. 1989. Isolation and properties of an asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. **Phytochemistry** 28, 9:2275-9.

SODEK, L.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. **Plant Physiol.** 77:506-8.

- SODEK, L. ; LEA P.J. 1993. Asparaginase from testa of developing lupin and pea seeds. **Phytochemistry** 34:51-6.
- TA, T.C. ; JOY, K.W. ; IRELAND, R.J. 1984. Amino acid metabolism in pea leaves: utilization of nitrogen from amide and amino groups of [^{15}N] asparagine. **Plant Physiol.** 74:822-6.
- THORNE, H. J. 1981. Morphology and ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. **Plant Physiol.** 67:1016-25.
- TOWBIN, H. ; STAEBLIN, T. & GORDON, J. 1979. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and sample application. **Proc. Nat.Acad. Sci.USA.** 76:4350-4.
- TROMP, J. ; OVAA, J.C. 1976. Effect of time of nitrogen application on amino nitrogen composition of roots and xylem sap of apple. **Physiol. Plant.**, 37:29-34.
- TROMP, J. ; OVAA, J.C. 1979. Uptake and distribution of nitrogen in young apple trees after application of nitrate or ammonium, with

special reference to asparagine and arginine. *Physiol. Plant.*
45:23-8.

URQUHART, A. A. & JOY, W.K. 1982. Transport, metabolism, and
redistribution of xylem-borne amino acids in developing pea
shoots. *Plant Physiol.* 69:1226-32.

ZIEGLER, H. 1975. Nature of transported substances. In: M.H.
Zimmermann & J.A. Milburn (eds). *Encyclopedia of Plant Physiol.*
I. Transport I. Phloem Transport. Springer, Berlin, pp.59-100.