

Introdução

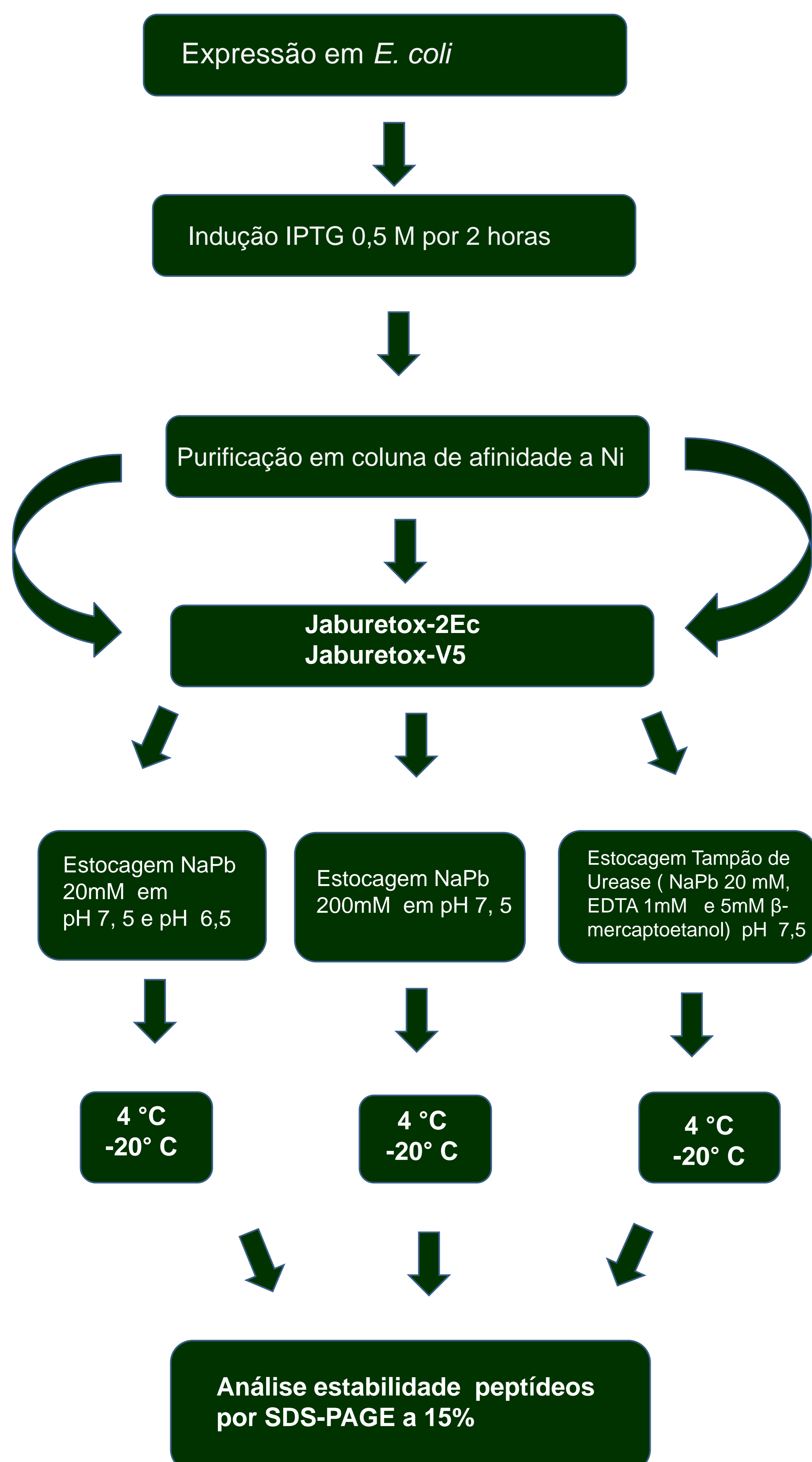
Ureasas (E.C. 3.5.1.5) são metaloenzimas dependentes de níquel, que estão envolvidas na biodisponibilidade de nitrogênio e em mecanismos de defesa contra predadores e patógenos em plantas.

Nosso grupo descreveu a atividade inseticida da Canatoxina, uma isoforma da urease de *Canavalia ensiformes*. Essa toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox) liberado pela hidrólise da proteína por enzimas digestivas do tipo-catepsinas encontradas no sistema digestivo de insetos suscetíveis. Baseado na sequência N-terminal do pepcanatox um fragmento de 270 pb correspondente ao pepcanatox (Jaburetox-2Ec) foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. A fim de retirar o epitopo V5 da sequência do peptídeo, sequência de DNA do jaburetox-2Ec foi reamplificado por PCR, clonado em plasmídeo pET23a, obtendo a expressão do jaburetox, contendo apenas cauda de histidina (Jaburetox-V5). Nosso grupo descreveu propriedades biológicas que são independentes da atividade ureolítica, como agregação plaquetária e atividade entomotóxica, sendo que muitas dessas propriedades são modificadas durante a estocagem dos peptídeos. Sendo muito importante estudos para analisar o comportamento desses peptídeos quando armazenados em solução durante um período prolongado.

Objetivo

Estudar e comparar a estabilidade dos peptídeos recombinates Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 sob condições diferentes de armazenamento, tampões e pHs.

Materiais e métodos



Resultados

SDS-PAGE 15% Jaburetox-2EC e Jaburetox-V5

Análise em SDS-PAGE 15% do Jaburetox-2Ec uma semana após a diálise

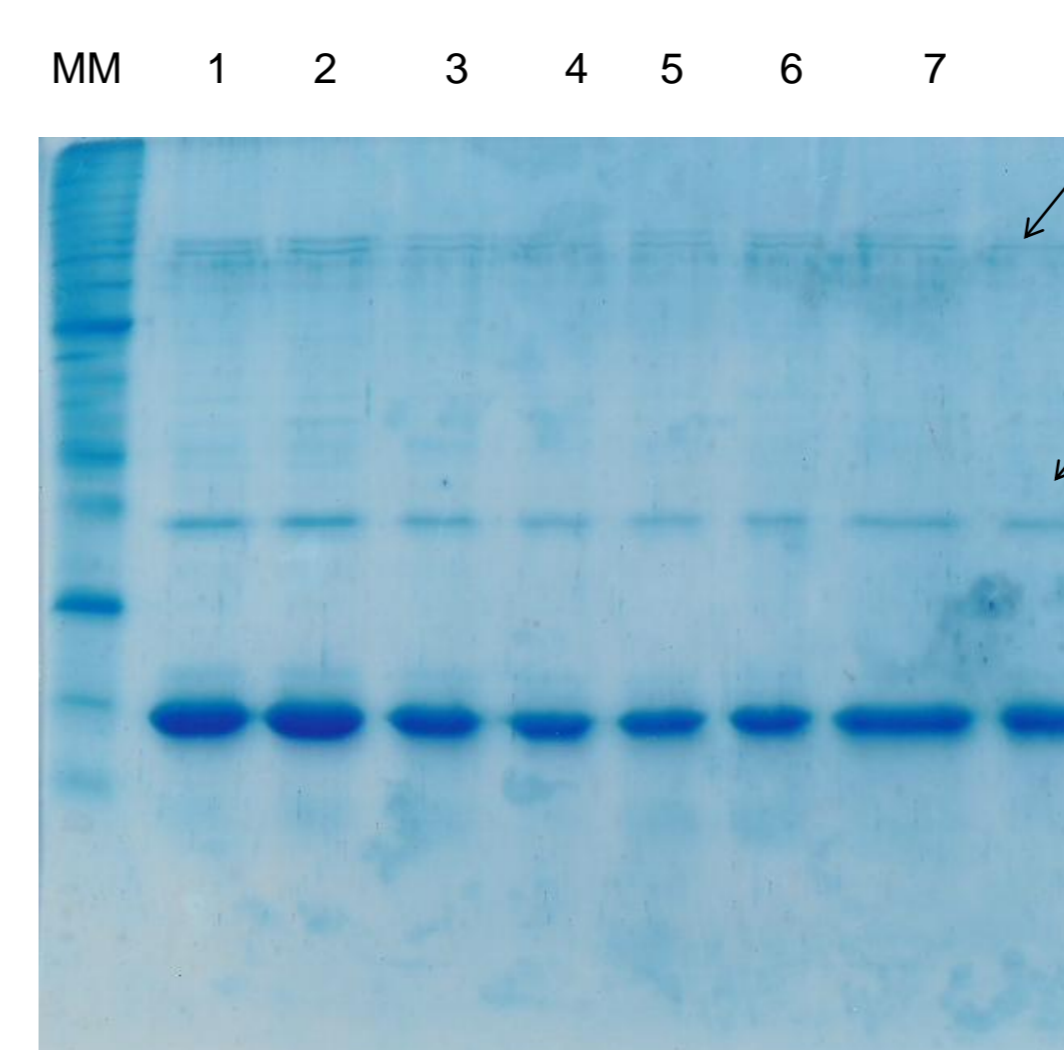


Fig. 1 MM. Marcador de peso molecular
1. Armazenamento à 4°C em Tampão de Urease pH 7,5. 2. Armazenamento à -20 °C em Tampão de Urease pH 7,5. 3. Armazenamento à 4°C em NaPb pH 7,5. 4. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20 mM pH 7,5. 5. Armazenamento à 4°C em NaPb 20mM pH 7,5. 6. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20mM pH 6,5. 7. Armazenamento à 4°C em NaPb 200 mM pH 7,5. 8. Armazenamento à -20 °C em NaPb 200 mM pH 7,5

Análise em SDS-PAGE 15% do Jaburetox-V5 uma semana após a diálise

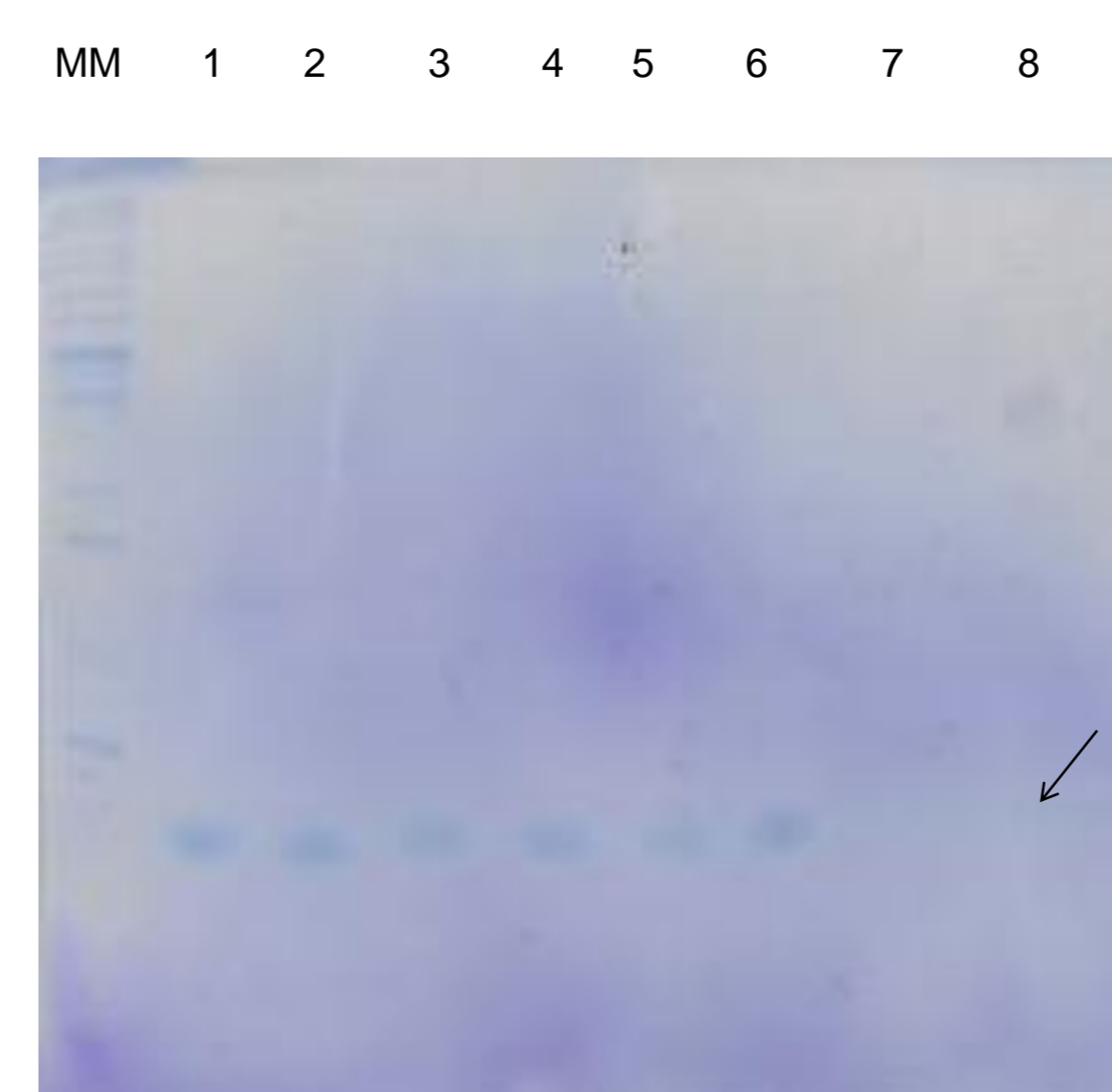


Fig. 2 MM. Marcador de peso molecular
1. Armazenamento à 4°C em Tampão de Urease pH 7,5. 2. Armazenamento à -20 °C em Tampão de Urease pH 7,5. 3. Armazenamento à 4°C em NaPb pH 7,5. 4. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20 mM pH 7,5. 5. Armazenamento à 4°C em NaPb 20mM pH 6,5. 6. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20mM pH 6,5. 7. Armazenamento à 4°C em NaPb 200 mM pH 7,5. 8. Armazenamento à -20 °C em NaPb 200 mM pH 7,5

Análise em SDS-PAGE 15% do Jaburetox-2Ec três semanas após a diálise

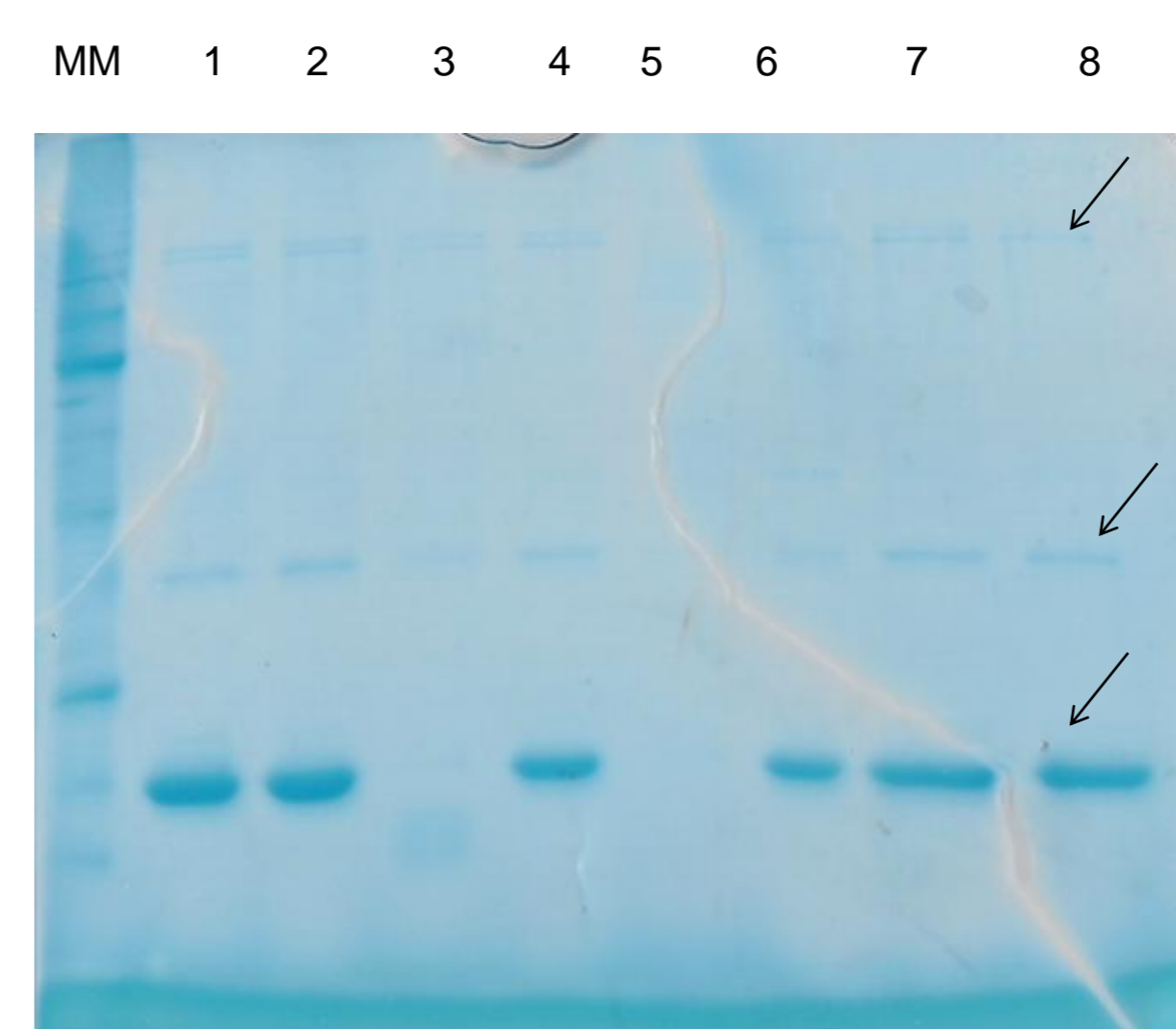


Fig. 3 MM. Marcador de peso molecular
1. Armazenamento à 4°C em Tampão de Urease pH 7,5. 2. Armazenamento à -20 °C em Tampão de Urease pH 7,5. 3. Armazenamento à 4°C em NaPb 20 mM pH 7,5. 4. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20 mM pH 7,5. 5. Armazenamento à 4°C em NaPb 20mM pH 6,5. 6. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20mM pH 6,5. 7. Armazenamento à 4°C em NaPb 200 mM pH 7,5. 8. Armazenamento à -20 °C em NaPb 200 mM pH 7,5

Análise em SDS-PAGE 15% do Jaburetox-V5 quatro semanas após a diálise

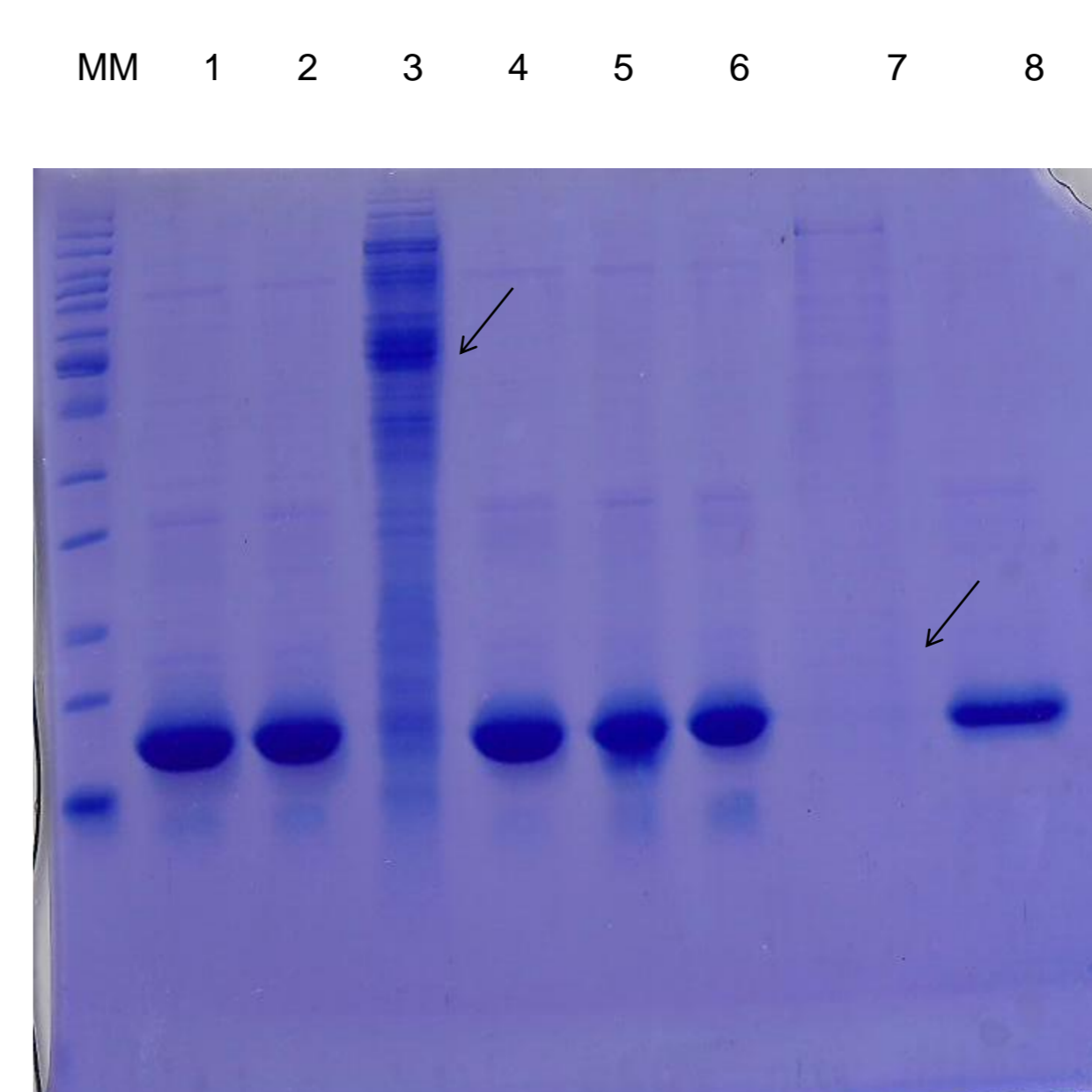


Fig. 4 MM. Marcador de peso molecular
1. Armazenamento à 4°C em Tampão de Urease pH 7,5. 2. Armazenamento à -20 °C em Tampão de Urease pH 7,5. 3. Armazenamento à 4°C em NaPb 20 mM pH 7,5. 4. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20 mM pH 7,5. 5. Armazenamento à 4°C em NaPb 20mM pH 6,5. 6. Armazenamento à -20 °C em NaPb 20mM pH 6,5. 7. Armazenamento à 4°C em NaPb 200 mM pH 7,5. 8. Armazenamento à -20 °C em NaPb 200 mM pH 7,5

Conclusões

➔ Através desse trabalho foi possível analisar a estabilidade dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 frente Tampão de urease, NaPb 20mM pH 7,5 e 6,5 e NaPb 200mM pH 7,5.

➔ Os diferentes tipos de tampões e pHs influenciaram na agregação dos peptídeos, sendo que aparentemente a -20°C em menor concentração de sal há diminuição na agregação dos peptídeos.