

TESTE DE ELISA COM DERIVADOS DO LEITE PARA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA BETA-CASEÍNA A1¹

Sarha Xavier², Maria de Loures Borba Magalhães, Bruna Andersen Pereira de Jesus⁴

¹ Vinculado ao projeto “Identificação de proteínas A1 e A2 no leite de vacas para rastreamento de produtoras A2A2 e qualidade do leite no Estado de Santa Catarina.”

² Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIBITI/CNPq.

³ Orientador, Departamento de Produção de alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.br.

⁴ Acadêmico do Curso de Engenharia Florestal – CAV.

As proteínas beta-caseína A1 e A2 são as principais encontradas no leite bovino. A proteólise parcial da versão A1 gera o peptídeo bioativo beta casomorfina-7 (BCM7), que de acordo com novos estudos é desencadeador de distúrbios graves do sistema gastrointestinal de humanos. Visto isso, através desse projeto pesquisa buscou-se desenvolver um método imunodiagnóstico fundamentado em anticorpos capazes de diferenciar o tipo de beta-caseína, A1 ou A2, em uma amostra de leite. Assim, com o objetivo de complementar esse estudo, realizou-se o teste com amostras de produtos derivados do leite. Indo além do leite puro, confirmando se o produto vendido no mercado é realmente específico A2A2, quando sinalizado, e ampliando a aplicação do método pesquisado.

Os produtos escolhidos foram: leite fermentado, iogurte e, como controle, o leite puro já genotipado. De cada um havia uma variação específica para A2A2 e outra inespecífica. E como complemento, as amostras continham dois tipos de alíquotas, centrifugada e não centrifugada, para identificar possíveis interferências nos resultados. O estudo foi realizado através do teste de ELISA, utilizando o modelo sanduíche otimizado em placa de alta afinidade. Da mesma forma como um teste de ELISA convencional, o otimizado apresenta os resultados, só que em um período menor que 24 horas. A seguir enumerou-se o procedimento:

1. Primeira diluição com 900 µl de NaOH 0,1M + 100 µl da amostra.
2. Do primeiro passo retirou-se 6 µl para a segunda diluição em 144 µl de solução de bicarbonato pH 9,0.
3. Em uma placa de ELISA com alta afinidade adicionou-se 50 µl /poço em duplicata para cada amostra, permanecendo na estufa em 37 ° C por uma hora.
4. Lavou-se a placa três vezes com PBST 137 mM com 150 µl/poço. Para então, bloquear com a solução de PBS 137 mM + BSA 1%, 100 µl /poço, e deixar na estufa 30 minutos.
5. Lavou-se a placa três vezes com PBST 137 mM com 150 µl/poço. Dessa maneira, podendo aplicar o anticorpo primário reconhecedor da proteína A1 diluído em PBST 137 mM + BSA 1%, 50 µl/poço, e manter na estufa por 30 minutos.
6. Lavou-se a placa três vezes com PBST 137 mM com 150 µl/poço. Preparando para a aplicação do anticorpo secundário, também diluído em PBST 137Mm + BSA 1%, 50µl/poço, e permaneceu mais 30 minutos na estufa.
7. Lavou-se a placa cinco vezes com PBST 137 mM com 150 µl/poço. E então, adicionou 50 µl/poço de TMB, reagindo 20 minutos sem contato com a luz.
8. Parou-se a reação com 50 µl/poço através da solução de ácido sulfúrico (H2SO4) 0,2M, visível na primeira imagem a seguir.

Esse método baseou-se no anticorpo comercial primário reconhecedor da proteína A1, que ao se ligar nessa variação de beta-caseína e ser identificado pelo anticorpo secundário, sinaliza

a presença através da cor amarela em diferentes intensidades (Figura 1) que será quantificada no espectrofotômetro. A leitura da reação confirmou a presença da beta-caseína A1 nos produtos genéricos e nos específicos A2A2 a ausência da mesma, devido ao número irrisório apresentado. Dessa maneira, criou-se uma tabela (Tabela 1) para o melhor entendimento. Assim, certificando a eficácia do método em diferentes amostras, contendo indiferença nos resultados ao correlacionar a mesma alíquota quando centrifugada ou a não processada.

Tabela 1. Resultados no espectrofotômetro.

	Leite	Leite	logurte	logurte	Leite fermentado	Leite fermentado
A1 centrifugado	0,395	0,415	0,233	0,170	0,148	0,153
A2A2 centrifugado	0,068	0,052	0,058	0,048	0,052	0,049
A1	0,305	0,316	0,314	0,342	0,459	0,408
A2A2	0,056	0,066	0,050	0,056	0,064	0,057

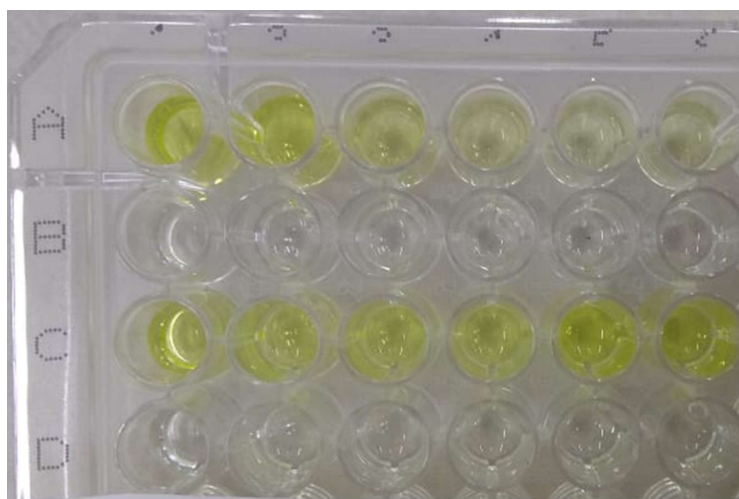


Figura 1. Reação na placa de ELISA.

Palavras-chave: Beta-caseína A1. Teste de ELISA. Derivados do leite.