

Curso de Biotecnologia
ACH5545 Engenharia Genética
Apostila de Atividades de Laboratório



Docente:

Prof. Dr. Felipe S. Chambergo – fscha@usp.br (<https://sites.usp.br/lbbp/>)

Monitores:

Augusto Roldan Gonçalves - augusto.roldan@usp.br

Henrique dos Santos Hernandes - hernandesrique@usp.br

Servidores não-docentes:

Tec. Pedro Manoel dos Santos - pedroms@usp.br

Local, data e horário.

- Local: Laboratório de Biotecnologia, 1º andar bloco didático A2 - EACH/USP.
- Data e Horário: Quinta-feira das 14:00 – 18:00 h
- Semestre: 2024-2

INSTRUÇÕES GERAIS

A disciplina envolve atividades expositivas, práticas e de discussão, assim, utilizando as informações e a bibliografia recomendada, os alunos deverão compreender as atividades desenvolvidas na disciplina. Nas atividades práticas serão realizadas experiências que envolvem a utilização de técnicas básicas de biologia molecular e engenharia genética.

OBRIGATÓRIO USO DE JALECO DE MANGAS COMPRIDAS EM BOM ESTADO.

**A NÃO OBSERVAÇÃO DESSE ITEM IMPLICA EM FALTA DO ESTUDANTE E
IMPOSSIBILIDADE DE REALIZAÇÃO DA ATIVIDADE PRÁTICA DO
PERÍODO.**

Normas durante as atividades no laboratório:

- 1- Utilizar de forma adequada e em todo momento avental e, durante o trabalho, utilizar luvas.
- 2- Seguir as indicações dos monitores, do professor e técnicos.
- 3- Utilizar de forma adequada e com supervisão do monitor ou professor os reagentes, materiais e equipamentos de uso no laboratório.
- 4- Descartar reagentes e materiais em local específico.
- 5- Manter a ordem em todo momento, não consumir alimentos, bebidas ou fumar no laboratório.
- 6- Limpar e cuidar dos materiais utilizados e da bancada de trabalho.
- 7- Qualquer dúvida solicitar esclarecimentos ao monitor ou professor.
- 8- Todo material biológico ou contaminado, antes de ser descartado, deverá ser esterilizado por autoclavagem.

Aviso: atividades no laboratório poderão ser gravadas e/ou fotografadas. Eventuais imagens captadas poderão ser armazenadas e utilizadas para veiculação e/ou divulgação na mídia em geral, escrita, falada, televisiva ou eletrônica de difusão e transmissão por qualquer meio de comunicação, pela Coordenação do Curso de Biotecnologia, em território nacional ou internacional. Cede-se pelo(a) discente, a título gratuito, autorização que abrange todos os direitos relacionados à veiculação de imagem e som.

1. Introdução

A Engenharia Genética constitui um conjunto de conhecimentos e técnicas de análises moleculares que permitem o estudo, a caracterização, expressão e modificação de biomoléculas (DNA, RNA e proteínas), a expressão de genes e manipulação de vias metabólicas dos seres vivos e vírus.

O sequenciamento do metagenoma de amostras de diversas origens e do genoma de diversos organismos e vírus (<https://gold.jgi.doe.gov/>) tem permitido determinar a sequência de DNA de numerosos genes e, por conseguinte, a proteína traduzida, além de estabelecer as vias metabólicas presentes nos organismos, cujo estudo e caracterização funcional são necessários para determinar seu potencial biotecnológico.

2. Objetivos

a) Introduzir os estudantes nas técnicas básicas de Biologia molecular e Engenharia Genética para o estudo de biomoléculas: DNA, RNA e proteínas.

b) Introduzir técnicas de análise quantitativa e qualitativa de biomoléculas.

c) Incentivar os estudantes ao trabalho de ensino e pesquisa laboratorial.

d) Aumentar o interesse pela pesquisa desenvolvida em laboratório.

Para atender os objetivos propostos, utilizaremos microrganismos de uso comum no laboratório de pesquisa, não patogênicos ou prejudiciais a humanos, animais, plantas ou meio ambiente. Todo material/resíduo será devidamente acondicionado/descontaminado para descarte em condições de biossegurança.

Eventuais alterações/adaptações das atividades práticas poderão ser realizadas para atender os objetivos propostos.

Atividade
Biossegurança, equipamentos, materiais e procedimentos
de uso comum no laboratório

Breve descrição das normas de biossegurança e conduta no laboratório. Descrição de equipamentos de uso comum (autoclave, estufas, agitadores, termociclador, centrifuga, fotodocumentador e outros). Uso e manipulação de pipetadores diferentes volumes (10, 100, 1000 µl). Cálculos para preparação de meios e soluções. Preparação de meios de cultura e material para esterilização em autoclave.

Autoclave: é um equipamento utilizado em serviços de saúde para realizar a desinfecção e esterilização através de um método físico, utilizando uma combinação de vapor, pressão e tempo. Com alta temperatura e pressão é possível eliminar e descontaminar matérias e outros, de microrganismos, esporos e vírus. Segundo a legislação, resíduos que possam conter bactérias, vírus e outros materiais biológicos devem ser inativados antes da disposição final. Qualquer material com suspeita de contaminação biológica deve ser esterilizado antes de ser descartado no lixo branco.

Pode ser autoclavado, todo material que resista a temperatura maior de 100 °C e pressão de 15 lbs, como meios líquidos, líquidos não inflamáveis, soluções aquosas e resíduos biológicos líquidos, além de frascos de cultura de células; instrumentos cirúrgicos; vidraria de laboratório; ponteiros; meios de cultura; matérias em polipropileno; aço inoxidável, entre outros. Líquidos devem preencher até 2/3 da capacidade total do recipiente e a tampa deve permanecer frouxa, nunca totalmente fechada.

NÃO deve ser autoclavado: materiais inflamáveis, reativos, corrosivos, tóxicos ou radioativos, líquidos em recipientes selados, plásticos sensíveis a temperatura ou não acondicionados adequadamente, reagentes sensíveis a degradação pela temperatura.

Utilize jaleco, óculos de proteção, sapatos fechados e luvas resistentes ao calor para remover os materiais, especialmente vidraria quente.

Prepare o material a ser autoclavado, alguns devem ser embalados em papel craft (cor marrom) ou papel alumínio, antes do procedimento, como por exemplo, placas de Petri, caixas de pipetas, tubos, Erlenmeyer, Becker, etc.

IMPORTANTE: Conferir o nível de água, pois se estiver abaixo da resistência a autoclave pode ser danificada.

Procedimento:

- Coloque os materiais na autoclave;
- Feche e sele a tampa;
- Ligue-a no máximo e quando começar a sair vapor, feche a válvula;
- Espere a temperatura atingir 121°C;
- Uma vez nessa temperatura, mude para o médio e deixe 15 minutos;
- Após o período, desligue a autoclave e abra a válvula para o vapor sair;
- Só abra a tampa depois que o manômetro estiver no zero;
- Retire o material com luvas resistentes ao calor.

Controle: Existe uma fita adesiva indicadora sensível ao calor que muda de cor ou mostra linhas diagonais (escrito estéril ou autoclavado) quando exposta a temperatura de 121°C. Ela é colocada no exterior de algum material embalado que será autoclavado. Se a fita não mudar de cor significa que a temperatura 121°C não foi atingida e os materiais não podem ser considerados estéreis ou descontaminados.



Figura. Modelo de autoclave presente no laboratório de Biotecnologia.

Atividade

Análise de Bioinformática: ferramentas computacionais

A bioinformática utiliza-se de ferramentas computacionais para a análise de dados genéticos, genômicos e de biologia molecular para desvendar a grande quantidade de dados gerados pelo sequenciamento de DNA e outras técnicas “Ômicas”. A atividade busca familiarizar o aluno com a linguagem utilizada na bioinformática, aprender a realizar buscas em bancos de dados e utilizar ferramentas de análise disponíveis na web.

Realizar as atividades indicadas abaixo, devidamente justificadas.

1- Na sequência A (abaixo), identificar/determinar:

a - A sequência corresponde a um organismo procariótico ou eucariótico? Justifique.

b - Determinar presença de exons/introns, região reguladora, região codificadora, tamanho e localização.

c - A fase de leitura aberta (ORF, open reading frame), presente na sequência.

d - Identifica a(s) proteína(s) codificadas e determine: peso molecular, pI, sequência e composição de aminoácidos.

e - Faça uma figura mostrando (i) a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, determinada e (ii) mostrando a estrutura gênica prevista para o *locus* genômico que contém os genes identificados, de acordo ao exemplo mostrado no anexo).

f - Desenhe os oligonucleotídeos correspondentes para a clonagem do gene(s), com a finalidade de obtenção e purificação da proteína recombinante. Utilize o vetor de expressão de sua preferência.

g - Faça uma figura mostrando a construção e o plasmídeo recombinante obtido a partir do item f.

>SEQUENCIA A (4106 pb)

TCAGTCAAACCTGCCCTCCGTGTTACCATCTCCCATACTCTTGCTGCTCGAGCTGCCGCTC
TGGATAGCCCCCAGGATGCCGTCAATGTAGCTTGTCCGCTCCACTTCTGGTGCCTCAGCA
CGTCGCACCCGAGCTCCTTCTCGCGCCTCTGCACCAGCTCGACGTACGCCTTCATGCCGTC
CGTCTTGAACCTTCTTGGCCAGCTCGTTGGTGTGGTGGCCGTCGAGTGCAGGCCCGCCAGC
GACACGAGCTGCAGCGTGAAGCCCTCCTTGGCAATGTCCCAGATGAAAGACTTGAGCGTCT
CGTCCGTGAAGCCGTGCGCCATCCAGTTGAACGATGGCGACAAGTTGTACACGAGCACCTT
ACCGGGGTGGGCAGCCCCTACGGTGCAGCCAGCTTGGCGGCCACCTCGACGTTGGGGTCCG
CCCCTCTCGACCCAGAGCAGGTCCGCAAAGGGGGCAAAGGCCAGCGCGCTTGGTGGCCG
CCTCCATGCCGGCGCGGAAGTGGTAGTAGCCCTCGCGCGTGCAGGCACGTCCCAGTTAAA
GTAGACGGGCGTCTTGGTGTACTGCGCGGCGAGCGCGCGGGCGGGAGATGCCCATGTCCG
CGGTCCGCGGCCGTGGCCGACAGGTACTCGTCAATCTTGGCCTGGGCGACACCCTCCTTCT
GCATGTGCTCGACGGCAGCTTTCGTCAAACGTCACGAGCCGGCTGCTCTTACCCACTTGGC
CTCGAAGGCGTCAATCTCGGCGCCTGTGGCTCCCTTGGCCTCCATGGCCTGCAGCGTTCG
GCCAGGGGCTCGATGGAAGGGTCCGGCGATGCCCAGGATGAACTCGTGGTCCGCGACGTCGA
TGGCTGACGAGAGGAGGCGGCCGACTCGGAGTCGGTACGGGCAATGACGAGGTTCTCCGA
GCCCATGACATCCCCTGGAAGCGCGCGGCGTGTAGACGGTTAATGTGCTCGCCCGTGGGC
ACCAGCACCTTGCCCCCAGGTGGCCGCACTTCTTGCCTCCGTGAAGCTGGTCTCAAAGT
GCACCGCTGCGGCACCGTTCTCAGCAAACAGCTTGGCGAGCTTGGACACCGCCGAAAGACC
TCCGTGGCCAGTGTCCGCGTCCGCAATGATGGGTCCGAGATAGTCAATGTACGGCGTCTTG
GCCCGTTGTTCCGGCGTCATCTTGGCGCGCATGTCCCCTGCTTGGCGGTATGCATAGACT
GCGCTTTGGCCAGGCGCTGGACCTGGTTCGGGACGGTGTGTACGGGTAGTCGCCAAAGTC
AGGCGAAACCTCGTTGGTGTGTTAAGGACGGATGAGCAGGCCCAGCCGGAGATGTAGAGG
ACCTCTTGGTGGGCGCCTGCTGGGTCTCTGGACGGGGTCAATGGCGCCCACTGGTTGAG
GAAGACAGATTAGCGACTCTTACAAGAACTTGCATCAATGGTATGGACTTACTGGTATGG
AGGGGCTCGCCCTTGGCTTTCGCGCTCGCGGATCAGGTTGAACAGCTTGGTGGCCATGACAG
AGCTCGGATACTTGAAGAACTGGCTGCCGCGCTTGGAGGCGACGTCTGCGGCGCTGTACGG
GCGTCAATGCCGGCAAAGCGAGGCGATGCCCACCCTCCTCAATCTCCTTGACCTGGGCC
TCGTACAGCGCATCTTCCGGCCGGGCTGTCTTTTGGGACTCTGGCAGCAGCTGATACGCGT
CTGCCGCGGCGACCGCGCGCGGGCCGAGCTGGAGGGAGCAGCCATGCGAGCAGCAGACGT
TGCAATGGCGCGTATAGCGGCAGAGGGCGGCATCGATCGTCAAGAGCGGCCCGCCGAG
GACGAGGTCAGAGAGCAGCCCCGCTGAGAGGCGCGTGAAGCTATTCGCAT**CAT**CTTGAACC
GTGTGTAGCTTCTGGGAGACGGCGGATCGAGGTTGGAATTACCGAGGCAAACAATGTGTTT
CGTCACTCAAGAACCAGTTATGTAGCCAAGACACTCGTGCCTCCGGCCATGCGGCTCTTC
TGCTTCTCTTCCAGGGCGTCCGCTCGACTTTATGAAGTGTCCGCTTAATAATTCCATTCC
ACCTTGAATCGCCTCAGCAATGCGGAGGAGGGGCCGATAAAGGCGCGGCTGAGCCCAAATT
GACCAATGGGGCCCCGCGGGGCTACCGACGGACCGAGCGGGCGGCTTTCCTCGGCTGATTTG
AGGGCGGTGACGGATCATTCTGGGCGTGTACCTGGAGGAAGAGGGAGGAGGATATGGAGGA
ACTGCTGGGATCAATATCTCGGGGTCTTTTTTGTCAATTCTCATTCTTTTCTTGTTCCTCCT
TCTATACTTCCAATTCTGTCCCTGATTACCGCTGCTTGCAAAGGCATCCCCGCGTTCCTCT
GCCTCTTGTGCTGTGTAAGTGAATGTCACTCCTGGAGCTTATCGGCGATAGCATCATCAT
GCAGCTCCCATAGCTAACCGCTTCTTCTGCCCGCCATTTCAGGAGCAGCTCGCCTTGTTC
TTTATCCTCACCTTTGCCACACCAAATC**ATG**GCTCTCAACCTCACCTCGTCGGCTCGAGC
CCTGCGCTCCTTCAAGGTCAGTCGAGTCTCCTCTTATAGCCTTCTATCGAGACCCATTTGA
CATAGACTGACACTCCTCCCGTCTACAGCCCTACACCCGCGCCGCCCTCCTCGCCAACGCC
GCGCGATGCTACTCAACCGCTGAGCCCGACCTCAAGACGACGCTCAAGAGCGTCATCCCTG
AGAAGCGCGAGCTGCTGAAGAAGGTCAAGGCCACGGCAGCAAGGTCATTGGCGAGGTC

GGTTGAGAACACCATTGGCGGCATGCGCGGGCTCAAGGCCATGGTCTGGGAGGGCTCCGTG
CTCGACCCCAACGAGGGCATCCGCTTCCACGGCCGCACCATCAAGGACTGCCAGAAGGAGC
TGCCCAAGGGCAAGACGGGCACCGAGATGCTGCCCGAGGCCATGTTTTGGCTGCTGTTGAC
CGGCCAGGTGCCCTCCGTCAACCAGGTCCGCCAGTTCTCCCGCGAGCTGGCCTCCCAGACC
CAGATCCCCGCCTTCGTCAACAGGATGCTCGACGATTTCCCAAGGATCTGCACCCCATGA
CCCAGTTTGCCATTGCCGTCTCGGCCCTCAACTACGAGTCCAAGTTTGCAAAGGCCTACGA
GAAGGGCCTCGCCAAGGCCGACTACTGGGAGCCCACCTTTGACGACAGCATCTCGCTGCTC
GCCAAGCTGCCACCATTGCCGCCAAGATCTACCAGAACTCTTACCGCGGGCGGGCGGCC
TCCCTGCCGAGGTCGACCTTGAGCAGGATTGGTCATACTTTGCTGCCATGCTCGGCAA
GGCGGCAAGGAGAACGAGGACTTCCAGGACCTCCTCCGTCTCTACCTTGCCCTCCACGGC
GACCACGAGGGTGGCAATGTGTCTGCCACGCCACTCACCTTGTTGGTAGTGCCCTGAGTG
ACCCCTTCCTGTCTTACAGCGCTGGTCTCCAGGGTCTGGCCGGTCTCTTACGGGTAAGC
TGTCCTACTTATACTTACAATCAATCTTCTTATACAAACGTTGATTGCTAATCGTTCGCGCT
TATGACGATAGACTTGCCGCCAGGAAGTTCTCCGCTGGATCCTGCAGATGAAGGAGGCCA
TCCCCGCCAACTACACCGAGCAGGATGTCCACGACTACCTCTGGTCCACCCTCAACTCGGG
CCGCGTCGTGCCGGCTACGGACACGCCGTTCTGCGCAAGCCCACCCTCGATTTCGAGGCT
CTCATGGACTATGCCGCTTCCCGCCCCGCGATTGCCAAGGACCCCGTCTTCCAGCTGGTTG
AGAAGAACAGCCGCATCGCCCCGAGGTGCTCAAGAAGCACGGCAAGACCAAGAACCCTA
CCCCAACGTGACAGCAGCTCCGGCGTCTCTTCCACCACTACGGCTTCCACGAGACGCTC
TACTACACGGCCACCTTTGGTGTTCGCGTGGTCTCGGTCTCTGGCTCAGCTCATCTGGG
ACCGCGCCCTGGGTCTGCCCATTGAGCGCCCCAAGAGCATCAACCTCGAGGGTATTCTGAA
GCAGGTGGAGAGCAGCTAA

Exemplo para item 1.

A

```

-11  CACACCAAATCATGGCTCTCAACCTCACCTCGTCGGCTCGAGCCCTGGCTCCTTCAAAGgtcagtcgagtcctcctttatagccttctat
      GTGTGGTTTAG M A L N L T S S A R A L R S F K 16
80    cgagaccatttgacatagactgacactcctcccgctctacagCCCTACACCGCGCCGCTCCTCGCCAACGCCGCGATGCTACTCA
      I N T R O N I P Y T R A A L L A N A A R C Y S 32
170   ACCGCTGAGCCCGACCTCAAGACGACGCTCAAGAGCGTTCATCCCTGAGAAGCGCGAGCTGCTGAAGAAGSTCAAGGCCACGGCAGCAAG
      T A E P D L K T T L K S V I P E K R E L L K K V K A H G S K 62
260   GTCATTGGCGAGTCAAGGTTGAGAACCATTGGCGGCGATGCGCGGGCTCAAGGCCATGGTCTGGGAGGGCTCCGTGCTCGACCCCAAC
      V I G E V K V E N T I G G M R G L K A M V W E G S V L D P N 92
350   GAGGCRATCCGCTTCCACGGCCGACCATCAAGGACTGCCAGAAGGAGCTGCCAAGGGCAAGACGGGACCCGAGATGCTGCCCGAGGCC
      E G I R F H G R T I K D C Q K E L P K G K T G T E M L P E A 122
440   ATGTTTTGGCTGCTGTTGACCGGCCAGGTGCCCTCCGTCAACCAGGTCCGCCAGTTCTCCCGCGAGCTGGGCTCCAGACCCAGATCCCC
      M F W L L L T G Q V P S V N Q V R Q F S R E L A S Q T Q I P 152
530   GCCTTCGTCAACAGGATGCTCGACGATTTCCCAAGGATGTCACCCCATGACCCAGTTTGCCATTGCGCTCGGCCCTCAACTACGAG
      A F V N R M L D D F P K D L H P M T Q F A I A V S A L N Y E 182
620   TCCAAGTTTGCAAAGCCCTACGAGAAGGGCCCTCGCCAAAGCCGACTACTGGGAGCCACCTTTGACGACAGCATCTCGTGTCTGCCAAG
      S K F A K A Y E K G L A K A D Y W E P T F D D S I S L L A K 212
710   CTGCCACCATTGCCCAAGATCTACCAAGACTTTACCAGCGGGCGCGCCCTCCCTGCGGAGGTCGACCCATTGAGCAGGATTGGTCA
      L P T I A A K I Y Q N S Y R G G A L P A E V D L E Q D W S 242
800   TACAACITTTGCTGCCATGCTCGGCAAGGGCGGCAAGGAGAAGGAGACTTCCAGGACCTCCTCCGTCTCTACCTTGCCTCCACGGCGAC
      Y N F A A M L G K G G K E N E D F Q D L L R L Y L A L H G D 272
890   CACGAGGGTGGCAATGTGTCTGCCACGCCACTCACCTTGTGGTAGTCCCTGAGTGACCCCTTCTGCTTTACAGCGCTGGTCTCCAG
      H E G G N V S A H A T H L V G S A L S D P F L S Y S A G L Q 302
980   GGTCTGGCCGGTCTCTTCCAGGtaagctgtccactatactacaatcaatcttctatacaaacgttgattgctaactcgttcgcgct
      G L A G P L H G I N T R O N II 310
1070  tatgacgatagACTTGCAGCCAGGAAGTTCTCGCTGGATCCTGCAGATGAAGGAGGCCATCCCGCCAACCTACACCGAGCAGGATGTC
      L A A Q E V L R W I L Q M K E A I P A N Y T E Q D V 336
1160  CACGACTACCTCTGGTCCACCTCAACTCGGGCGCGCTGCGCCGGCTACGGACACGCCGTTCTGCGCAAGCCCGACCTCGATTCCGAG
      H D Y L W S T L N S G R V V P G Y G H A V L R K P D P R F E 366
1250  GCTCTCATGGACTATGCGCTTCCCGCCCGCGATTGCCAAGGACCCCGTCTTCCAGCTGTTGAGAAGAACAGCCGATCGCCCCCGAG
      A L M D Y A A S R P A I A K D P V F Q L V E K N S R I A P E 396
1340  GTGCTCAGAAGCACGGCAAGACCAAGAACCCCTACCCCAAGCTCGACAGCAGCTCCGGCGTCTCTTCCACCACTACGGCTTCCACGAG
      V L K K H G K T K N P Y P N V D S S S G V L F H H Y G F H E 426
1430  ACGCTCTACTACAGCCACCTTTGGTGTTCGCGTGGTCTCGGTCTCTGGCTCAGCTCATCTGGGACCGCGCCCTGGGTCTGCCATT
      T L Y Y T A T F G V S R G L G P L A Q L I W D R A L G L P I 456
1520  GAGCGCCCAAGAGCATCAACCTCGAGGGTATTCTGAAGCAGGTGGAGAGCAGCTAA
      E R P K S I N L E G I L K Q V E S S * 474

```

B

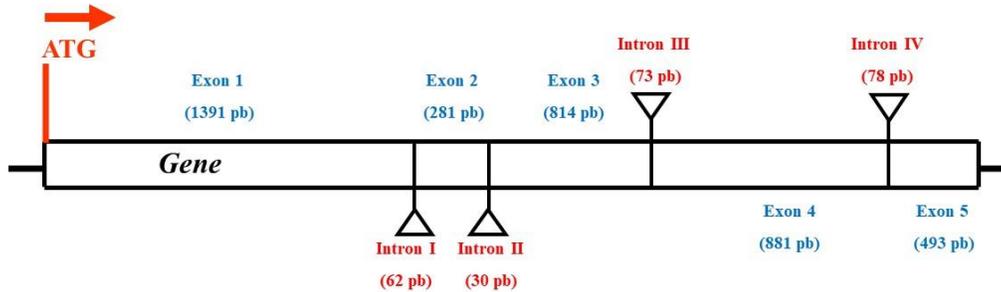


Figura. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos (A) e estrutura gênica (B) prevista para o *locus* que contém os genes identificados. A numeração à esquerda corresponde à posição dos nucleotídeos em relação à adenina do códon de iniciação da proteína citrato sintase; os aminoácidos estão numerados à direita.

Atividade

Desenho de Oligonucleotídeos: Proteína S de SARS-CoV-2

1. Desenhe os oligonucleotídeos/primers para clonagem e expressão de:

1- Proteína S de SARS-CoV-2

2- RBD da proteína S de SARS-CoV-2 (em vermelho)

>Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína S de SARS-CoV-2

```
atg ttt gtt ttt ctt gtt tta ttg cca cta gtc tct agt cag tgt gtt aat ctt aca acc
M F V F L V L L P L V S S Q C V N L T T
aga act caa tta ccc cct gca tac act aat tct ttc aca cgt ggt gtt tat tac cct gac
R T Q L P P A Y T N S F T R G V Y Y P D
aaa gtt ttc aga tcc tca gtt tta cat tca act cag gac ttg ttc tta cct ttc ttt tcc
K V F R S S V L H S T Q D L F L P F F S
aat gtt act ttg ttc cat gct ata cat gtc tct ggg acc aat ggt act aag agg ttt gat
N V T W F H A I H V S G T N G T K R F D
aac cct gtc cta cca ttt aat gat ggt gtt tat ttt gct tcc act gag aag tct aac ata
N P V L P F N D G V Y F A S T E K S N I
ata aga ggc tgg att ttt ggt act act tta gat tcg aag acc cag tcc cta ctt att gtt
I R G W I F G T T L D S K T Q S L L I V
aat aac gct aat aat gtt gtt att aaa gtc tgt gaa ttt caa ttt tgt aat gat cca ttt
N N A T N V V I K V C E F Q F C N D P F
ttg ggt gtt tat tac cac aaa aac aac aaa agt tgg atg gaa agt gag ttc aga gtt tat
L G V Y Y H K N N K S W M E S E F R V Y
tct agt gcg aat aat tgc act ttt gaa tat gtc tct cag cct ttt ctt atg gac ctt gaa
S S A N N C T F E Y V S Q P F L M D L E
gga aaa cag ggt aat ttc aaa aat ctt agg gaa ttt gtg ttt aag aat att gat ggt tat
G K Q G N F K N L R E F V F K N I D G Y
ttt aaa ata tat tct aag cac acg cct att aat tta gtg cgt gat ctc cct cag ggt ttt
F K I Y S K H T P I N L V R D L P Q G F
tcg gct tta gaa cca ttg gta gat ttg cca ata ggt att aac atc act agg ttt caa act
S A L E P L V D L P I G I N I T R F Q T
tta ctt gct tta cat aga agt tat ttg act cct ggt gat tct tct tca ggt tgg aca gct
L L A L H R S Y L T P G D S S S G W T A
ggt gct gca gct tat tat gtg ggt tat ctt caa cct agg act ttt cta tta aaa tat aat
G A A A Y Y V G Y L Q P R T F L L K Y N
gaa att gga acc att aca gat gct gta gac ttg gca ctt gac cct ctc tca gaa aca aag
E N G T I T D A V D C A L D P L S E T K
tgt acg ttg aaa tcc ttc act gta gaa aaa gga atc tat caa act tct aac ttt aga gtc
C T L A K S F T V E K G I Y Q T S N F R V
caa cca cca gaa tct att gtt aga ttt cct aat att aca aac ttg tgc cct ttt ggt gaa
Q P T E S I V R F P N I T N L C P F G E
ggt ttt aac gcc acc aga ttt gca tct gtt tat gct tgg aac agg aag aga atc agc aac
V F N A T R F A S V Y A W N R K R I S N
tgt gtt gct gat tat tct gtc cta tat aat tcc gca tca ttt tcc act ttt aag tgt tat
C V A D Y S V L Y N S A S F S T F K C Y
gga gtg tct cct act aaa tta aat gat ctc tgc ttt act aat gtc tat gca gat tca ttt
G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F
gta att aga ggt gat gaa gtc aga caa atc gct cca ggg caa act gga aag att gct gat
V I R G D E V R Q I A P G Q T G K I A D
tat aat tat aaa tta cca gat gat ttt aca ggc tgc gtt ata gct tgg aat tct aac aat
Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N
ctt gat tct aag gtt ggt ggt aat tat aat tac ctg tat aga ttg ttt agg aag tct aat
L D S K V G G N Y N Y L Y R L F R K S N
ctc aaa cct ttt gag aga gat att tca act gaa atc tat cag gcc ggt agc aca cct tgt
L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C
aat ggt gtt gaa ggt ttt aat tgt tac ttt cct tta caa tca tat ggt ttc caa ccc act
N G V E G F N C Y F P L Q S Y G F Q P T
aat ggt gtt ggt tac caa cca tac aga gta gta gta ctt tct ttt gaa ctt cta cat gca
N G V G Y Q P Y R V V L S F E L L H A
cca gca act gtt tgt gga cct aaa aag tct act aat ttg gtt aaa aac aaa tgt gtc aat
P A T V C G P K K S T N L V K N K C V N
ttc aac ttc aat ggt tta aca ggc aca ggt gtt ctt act gag tct aac aaa aag ttt ctg
F N F N G L T G T G V L T E S N K K F L
cct ttc caa caa ttt ggc aga gac att gct gac act act gat gct gtc cgt gat cca cag
```

P F Q Q F G R D I A D T T D A V R D P Q
aca ctt gag att ctt gac att aca tga tct tct ggt ggt gtc agt gtt ata aca cca
T L E I L D I T P C S F G G V S V I T P
gga aca aat act tct aac cag gtt gct gtt ctt tat cag gat gtt aac tgc aca gaa gtc
G T N T S N Q V A V L Y Q D V N C T E V
cct gtt gct att cat gca gat caa ctt act cct act tgg cgt gtt tat tct aca ggt tct
P V A I H A D Q L T P T W R V Y S T G S
aat gtt ttt caa aca cgt gca ggc tgt tta ata ggg gct gaa cat gtc aac aac tca tat
N V F Q T R A G C L I G A E H V N N S Y
gag tgt gac ata ccc att ggt gca ggt ata tgc gct agt tat cag act cag act aat tct
E C D I P I G A G I C A S Y Q T Q T N S
cct cgg cgg gca cgt agt gta gct agt caa tcc atc att gcc tac act atg tca ctt ggt
P R R A R S V A S Q S I I A Y T M S L G
gca gaa aat tca gtt gct tac tct aat aac tct att gcc ata ccc aca aat ttt act att
A E N S V I Y S N N S I A I P T N F T I
agt gtt acc aca gaa att cta cca gtg tct atg acc aag aca tca gta gat tgt aca atg
S V T T E I L P V S M T K T S V D C T M
tac att tgt ggt gat tca act gaa tgc agc aat ctt ttg ttg caa tat ggc agt ttt tgt
I C D I P I G A G I C S N L L L Q Y G S F C
aca caa tta aac cgt gct tta act gga ata gct gtt gaa caa gac aaa aac acc caa gaa
T Q L N R A L T G I A V E Q D K N T Q E
ggt ttt gca caa gtc aaa caa att tac aaa aca cca cca att aaa gat ttt ggt ggt ttt
V F A Q V K Q I Y K T P P I K D F G G F
aat ttt tca caa ata tta cca gat cca tca aaa cca agc aag agg tca ttt att gaa gat
N F S Q I L P D P S K P S K R S F I E D
cta ctt ttc aac aaa gtg aca ctt gca gat gct ggc ttc atc aaa caa tat ggt gat tgc
L L F N K V T L A D A G F I K Q Y G D C
ctt ggt gat att gct gct aga gac ctc att tgt gca caa aag ttt aac ggc ctt att gtt
L G D I A A R D L I C A Q K F N G L T V
ttg cca cct ttg ctc aca gat gaa atg att gct caa tac act tct gca ctg tta gcg ggt
L P P L L T D E M I A Q Y T S A L L A G
aca atc act tct ggt tgg acc ttt ggt gca ggt gct gca tta caa ata cca ttt gct atg
T I T S G W T F G A G A A L Q I P F A M
caa atg gct tat agg ttt aat ggt att gga gtt aca cag aat gtt ctc tat gag aac caa
Q M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q
aaa ttg att gcc aac caa ttt aat agt gct att ggc aaa att caa gac tca ctt tct tcc
K L I A N Q F N S A I G K I Q D S L S S
aca gca agt gca ctt gga aaa ctt caa gat gtg gtc aac caa aat gca caa gct tta aac
T A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N
acg ctt gtt aaa caa ctt agc tcc aat ttt ggt gca att tca agt gtt tta aat gat atc
T L V K Q L S S N F G A I S S V L N D I
ctt tca cgt ctt gac aaa gtt gag gct gaa gtg caa att gat agg ttg atc aca ggc aga
L S R L D K V E A E V Q I D R L I T G R
ctt caa agt ttg cag aca tat gtg act caa caa tta att aga gct gca gaa atc aga gct
L Q S L Q T Y V T Q Q L I R A A E I R A
tct gct aat ctt gct gct act aaa atg tca gag tgt gta ctt gga caa tca aaa aga gtt
S A N L A A T K M S E C V L G Q S K R V
gat ttt tgt gga aag ggc tat cat ctt atg tcc ttc cct cag tca gca cct cat ggt gta
D F C G K G Y H L M S F P Q S A P H G V
gtc ttc ttg cat gtg act tat gtc cct gca caa gaa aag aac ttc aca act gct cct gcc
V F L H V T Y V P A Q E K N F T T A P A
att tgt cat gat gga aaa gca cac ttt cct cgt gaa ggt gtc ttt gtt tca aat ggc aca
I C H D G K A H F P R E G V F V S N G T
cac tgg ttt gta aca caa agg aat ttt tat gaa cca caa atc att act aca gac aac aca
H W F V T Q R N F Y E P Q I I T T D N T
ttt gtg tct ggt aac tgt gat gtt gta ata gga att gtc aac aac aca gtt tat gat cct
F V S G N C D V V I G I V N N T V Y D P
ttg caa cct gaa tta gac tca ttc aag gag gag tta gat aaa tat ttt aag aat cat aca
L Q P E L D S F K E E L D K Y F K N H T
tca cca gat gtt gat tta ggt gac atc tct ggc att aat gct tca gtt gta aac att caa
S P D V D L G D I S G I N A S V V N I Q
aaa gaa att gac cgc ctc aat gag gtt gcc aag aat tta aat gaa tct ctc atc gat ctc
K E I D R L N E V A K N L N E S L I D L
caa gaa ctt gga aag tat gag cag tat ata aaa tgg cca tgg tac att tgg cta ggt ttt
Q E L G K Y E Q Y I K W P W Y I W L G F
ata gct ggc ttg att gcc ata gta atg gtg aca att atg ctt tgc tgt atg acc agt tgc
I A G L I A I V M V T I M L C C M T S C
tgt agt tgt ctc aag ggc tgt tgt tct ggt gca tcc tgc tgc aaa ttt gat gaa gac gac
C S C L K G C C S C G S C C K F D E D D
tct gag cca gtg ctc aaa gga gtc aaa tta cat tac aca taa
S E P V L K G V K L H Y T -

Enzimas que não clivam: AatII, AbsI, BcgI, BciVI, BglI, BpII, Bpu10I, BsePI, BseYI, BsrBI, BtgZI, BtsI, DraII, DrdI, Esp3I, FseI, FspAI, HaeII, HaeIV, HgaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NaeI, NarI, NheI, NotI, NruI, PacI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, SapI, PI-SceI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SphI, SrfI, StuI, TaqII, Taul, XbaI, XhoI

*Em vermelho a região que corresponde ao Domínio de ligação ao receptor (RBD)

Sítios de Clonagem no vetor de Expressão:

BamHI EcoRI StuI Sall XbaI XhoI KpnI HindIII
ATGGATCCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGACGAGCTCAACTAGTGC GGCCGCTTTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGGCATGCGGTACCAAGCTTGGCTGTTTGG
M D P E F K G L R R R A Q L V R P L S N L E P A V S R H A V P S L A V L

BamHI: G↓GATCC

EcoRI: G↓AATTC

StuI: AGG↓CCT

Sall: G↓TCGAC

XbaI: T↓CTAGA

XhoI: C↓TCGAG

KpnI: GGTAC↓C

HindIII: A↓AGCTT

Atividade

Extração de DNA genômico (células procarióticas), plasmidial e Proteínas

O DNA é uma molécula orgânica, contida no interior da célula. Células procarióticas e eucarióticas apresentam DNA genômico. Vários procedimentos podem ser utilizados para extrair e isolar o DNA genômico, que incluem duas etapas principais (i) a lise das células presentes na amostra (por exemplo, através de ultrassom ou Proteinase K na presença de EDTA – para sequestrar cátions divalentes e inibir atividade de DNase), e (ii) purificação do DNA por solubilização da membrana celular/nuclear e desnaturação de proteínas com um detergente (por exemplo SDS) e precipitação dos restos celulares, proteínas e outros componentes celulares. Finalmente o DNA será suspenso em água ou tampão.

Os seres vivos são constituídos por macromoléculas responsáveis por diversas funções vitais: ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas. As proteínas são moléculas orgânicas, formadas por subunidades denominadas α -aminoácidos (20 aminoácidos naturais) que se ligam através de ligações peptídicas, entre o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro. As proteínas podem apresentar propriedades e atividades totalmente diferentes devido às diversas combinações e sequências dos aminoácidos presentes nas moléculas. Três etapas são importantes na obtenção de proteínas: rompimento celular, inativação ou remoção de interferentes e solubilização das proteínas.

1- Extração de DNA genômico de Bactéria

(EasyPure Genomic DNA kit, Trans LifeSciences)

O procedimento é utilizado para extração de DNA genômico (gDNA) de diversas fontes biológicas.

Procedimento

Preparar banho maria ou banho seco a 55°C

1. Realizar uma cultura de bactéria, por exemplo *Escherichia coli* (*E. coli*) em 10 mL de meio LB líquido (10 g Peptona/ 5 g extrato levedura /5 g NaCl, por litro), incubar 18 h sob agitação 37°C.
2. Centrifugar a cultura (3-5mL; 10000 rpm/8 min, temperatura ambiente) e obtenha uma quantidade adequada de massa celular ~100 µl.
3. Suspenda a massa de bactéria em 100 µl de tampão LB2 + 20 uL de Proteinase K, misture por pipetagem até dissolver a massa de bactéria.
4. Incubar a 55°C/15 min.
5. Adicionar 500 uL de tampão BB2, misturar por inversão 5 segs, incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 min.
6. Transferir o lisado a coluna, com seu correspondente tubo reservatório e centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
7. Adicionar 500 uL de tampão CB2, centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
8. Repetir a etapa anterior
9. Adicionar 500 uL de tampão WB2, centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
10. Repetir a etapa anterior
11. Centrifugar a coluna, 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o tubo reservatório e transferir a coluna a um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.
12. Adicionar no cetro da coluna 50 uL de tampão de eluição ou água estéril (aquecidos a 65°C). Incubar a TA por 2 minuto. Centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, para eluição do DNA genômico, coletado no microtubo de centrifuga.
13. Conservar o gDNA isolado ~20°C.
14. Realizar a Eletroforeses e quantificar.

2- Extração de DNA plasmidial de bactérias em

pequena escala: “Miniprep”

(Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit, www.qiagen.com)

Procedimento:

1. Realizar uma cultura de *E.coli*, contendo o plasmídeo, em 5 mL de meio LB com antibiótico, incubar por 12-18 h sob agitação à 37°C.
2. Posteriormente, colocar 1,5 mL da cultura em microtubo de 1,5 mL.
3. Centrifugar à 10.000 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos e remover o sobrenadante.
4. Acrescentar mais 1,5 mL da cultura nos respectivos tubos e repetir os passos 2 e 3.
5. Suspender o sedimento bacteriano em 250 µL da Solução P1.
6. Acrescentar 250 µL da Solução P2. Misturar por inversão, **NÃO VORTEXAR OS TUBOS**. Uma solução viscosa deverá ser formada imediatamente devido à lise das células.
7. Acrescentar 350 µL da Solução N3. Misturar por inversão, **NÃO VORTEXAR OS TUBOS**. Um precipitado branco deverá ser formado imediatamente. Este precipitado contém DNA genômico e restos celulares. O DNA plasmidial permanecerá em solução.
8. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 10 minutos.
9. Remover 750 µL do sobrenadante cuidadosamente e transferi-lo para coluna QIAprep Spin, com tubo reservatório.
10. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, descartar o líquido do tubo reservatório.
11. Lavar a coluna QIAprep Spin, adicionando 0.75 mL de solução PE
12. Em seguida, centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto.
13. Descartar o líquido do tubo reservatório, centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto.
14. Transferir a coluna QIAprep Spin a tubo limpo, eluir o DNA por adição de 50 µL de solução EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) ou água.
15. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, descartar a coluna QIAprep Spin, o DNA está em solução.
16. Realizar a Eletroforeses e quantificar.

3- Extração de proteínas de Levedura

Procedimento:

1. Realizar uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* em 5mL de meio YPD por 3 – 5 dias sob agitação à 30°C. Colocar 1,5 mL da cultura em microtubos de 1,5 mL;
2. Centrifugar a cultura (10000 rpm/8 min, temperatura ambiente) e obtenha uma quantidade adequada de massa celular ~200 µl.
3. Suspender o precipitado em 250 µl de tampão de extração;
4. Adicionar um volume equivalente a 100 µl de microesferas/perolas de vidro (tamanho de 450 a 600 µm);
5. Agitar em vortex por 20 min, em intervalos de 5 min, mantendo no gelo, velocidade máxima;
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min, temperatura ambiente;
7. Separar o sobrenadante do material sedimentado.
8. Realizar eletroforese em gel de SDS-PAGE, utilizando 20 µL do sobrenadante obtido.

Tampão de Extração

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

50 mM NaCl

0,2% Triton X-100

Atividade

Quantificação de Biomoléculas e Amplificação de DNA

1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A espectrofotometria é uma técnica quantitativa que consiste na medição da absorção da luz, por uma amostra, tanto na longitude de onda visível como no ultravioleta. As biomoléculas são quantificadas a 280 nm (proteínas) e 260 nm (ácidos nucleicos), sendo a leitura o resultado da absorbância das moléculas aromáticas.

DNA, RNA e oligonucleotídeos podem ser quantificados em solução aquosa de forma diluída ou não diluída. A concentração da amostra é determinada pela medição a 260 nm contra o controle ou branco. A absorção de 1 OD é equivalente a ~50 µg/mL de dsDNA, ~33 µg/mL de ssDNA, ~40 µg/mL de RNA ou ~30 µg/mL de oligonucleotídeos. A pureza do DNA pode ser determinada calculando a razão A_{260}/A_{280} . DNA puro deve ter uma razão de ~1.8 e RNA puro de ~ 2.0. Absorção a 230 nm pode indicar contaminação da amostra por substâncias como carboidratos, peptídeos, fenol ou compostos aromáticos. Para amostras puras a razão A_{260}/A_{230} é ~2.2.

Absorbância a 280 nm é um método pouco sensível que requer alta concentração de proteína, devido a isso a quantificação de proteína é realizada preferencialmente pelo método colorimétrico.

O fato central que faz a PCR tão útil é que todo organismo vivo possui sequências de nucleotídeos de DNA que são únicas e específicas para cada espécie. A técnica explora a função natural da enzima denominada Taq-polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. Através da PCR é possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a sequência alvo do estudo. Às vezes referidas como “fotocópia molecular”, o PCR pode amplificar qualquer sequência específica de DNA, a partir de amostras de diferentes materiais biológicos como sangue, urina e outros fluidos corporais, cabelo e cortes de tecidos (biópsias frescas ou em blocos de parafina). Amostras de microrganismos, células animais ou vegetais, alguns deles com milhares, possivelmente até milhões, de anos de idade podem, também, ser detectadas.

Procedimento:

1. Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit Taq DNA polimerase com 2 ul da amostra de DNA, completar com água estéril a um volume final de 25 uL. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume (uL)
EasyTaq Buffer 10x + MgCl ₂	2,5
2.5 mM dNTPs	4
Primer F	1
Primer R	1
EasyTaq DNA polimerase	0,5
DNA molde (amostra, 0.01 pg-1 ug)	2
H ₂ O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

a) Desnaturação inicial	95°C - 3 min.
b) Desnaturação Anelamento	95°C - 3 min.
Extensão	48°C - 30 seg.
(Repetir todos os itens b - 35x)	72 °C - 1 min.
c) Extensão final	72°C - 10 min.
d) Manter a reação	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.

2- Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é um método laboratorial que utiliza a enzima transcriptase reversa, para a partir de RNA obter moléculas de do vírus em DNA complementar (cDNA).

Procedimento: RT-PCR, em simple etapa:

1. Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit de RT-PCR com 1 uL da amostra de RNA, completar com água estéril a um volume final de 25ul. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume (μL)
Tampão de Reação 2x	12,5
RNA (amostra, 0.01 pg - 1 μg)	1,0
Primer F (10 μM)	1,0
Primer R (10 μM)	1,0
Mix de enzimas transcriptase reversa/DNA polimerase	2,0
H ₂ O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

a) Síntese de cDNA e Desnaturação inicial - 1 ciclo	50°C - 45 min.
b) Desnaturação Anelamento	95°C - 1 min.
Extensão	48°C – 45 seg.
(Repetir todos os itens b – 35 ciclos)	72 °C - 1 min.
c) Extensão final - 1 ciclo	72°C - 10 min.
d) Manter a reação - 1 ciclo	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.

Quantificação espectrofotométrica de biomoléculas

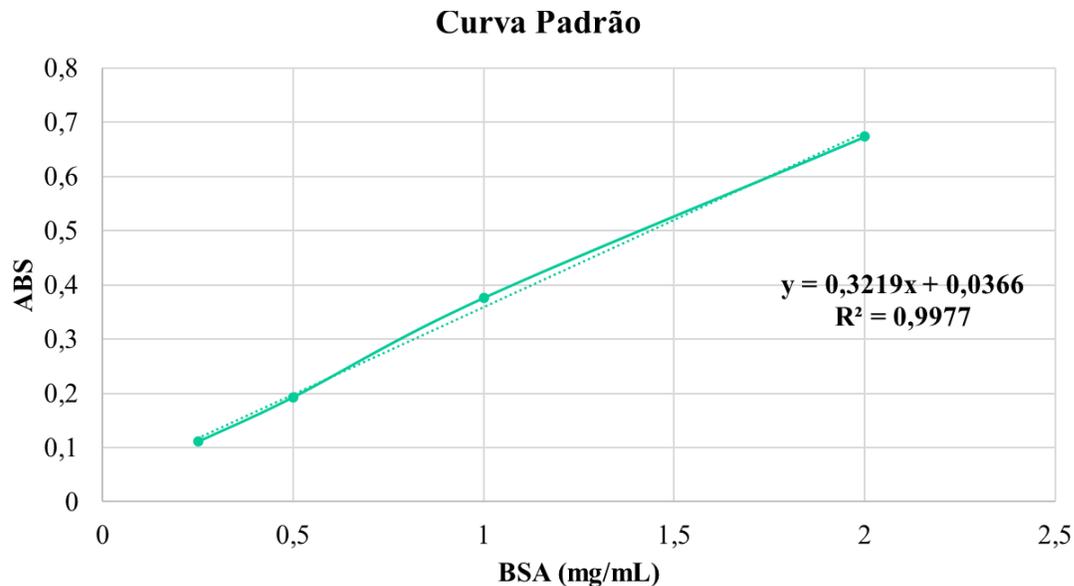
3- Quantificação de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford

Procedimentos:

1. Preparar o reagente de Bradford, na razão Bradford: água - 1:4;
2. Preparar 5 diluições da proteína *standard* (0.2, 0.4, 0.6, 0.8.e 1.0 mg/mL);
3. Transferir 50 μ L da amostra *standard* e da sua amostra a um tubo limpo.

REALIZAR EM DUPLICATA OU TRIPLICATA;

4. Adicionar 950 μ L de reagente de Bradford a cada tubo e vortexar.
5. Incubar durante 5 minutos em temperatura ambiente;
6. Medir a absorbância a 595 nm.
7. Construir a curva padrão utilizando papel milimetrado.
8. Determinar a concentração de proteína na amostra utilizada, utilizando a curva padrão abaixo.



4. Quantificação de DNA

Procedimento:

1. Ligar o espectrofotômetro e selecionar o comprimento de onda de 260 nm, seguindo o procedimento indicado pelo fabricante;
2. Inserir no espectrofotômetro a cubeta de quartzo contendo água (branco ou controle) e fazer a leitura para zerar o aparelho;
3. Preparar uma diluição de DNA:água = 1:499, transferir para a cubeta de quartzo.
4. Fazer a leitura e determinar a concentração da amostra.

$DO_{260} = 1$ equivale a 50 ug/mL de dsDNA

Atividade
Separação de biomoléculas por eletroforese
1- Eletroforeses de DNA

A eletroforese foi introduzida em 1939 por A.Tiselius e A.E. Kabat com o objetivo de separar moléculas orgânicas, sendo uma técnica que se fundamenta na migração de moléculas com carga elétrica em uma solução, dependendo da aplicação de um campo elétrico. Uma vez que as moléculas se movem com uma velocidade dependente da sua carga, tamanho e forma, a eletroforese permite a separação de biomoléculas simples (açúcares, aminoácidos, péptidos, nucleótídeos) ou mais complexas (proteínas e ácidos nucleicos).

A eletroforese em gel é largamente utilizada para o fracionamento de macromoléculas. As amostras são aplicadas em um gel, comumente de poliacrilamida ou agarose, cujo diâmetro dos poros pode ser determinado. A separação das amostras, sob ação de um campo elétrico, é feita de acordo com o seu tamanho, forma e carga elétrica.

Géis de agarose são utilizados para a separação de macromoléculas com massa molar superior a 200 kD. Fragmentos de DNA de até 50.000 pb são facilmente separados em um gel de agarose (0,6-0,8%). O gel de agarose é preparado pela dissolução da agarose em um tampão de corrida apropriado (Tris-Base/Bórico/EDTA – TBE ou Tris-base/Acético/EDTA – TAE, são utilizados rotineiramente). Após a pesagem, a agarose é dissolvida, por aquecimento (em geral, em um forno micro-ondas) no tampão de corrida. Adiciona-se, então, corante de DNA, e a solução é transferida para a cuba de eletroforese.

O corante *SYBR safe* (LifeTechnologies, USA) é utilizado para a visualização do DNA. Esse corante intercala-se entre os pares de bases da dupla hélice de DNA. O complexo entre o corante e o DNA é observado sob luz azul.

IMPORTANTE: O manuseio dos géis de agarose deve sempre ser feito com luvas, e todo o material descartado em recipientes apropriados.

Procedimento:

1. O preparo do gel depende das dimensões da cuba a ser utilizada. Partiremos do pressuposto que vamos utilizar uma cuba de 15 cm x 20 cm, a qual acomoda 100 mL de agarose;
2. Pesar 1 g de agarose ultra pura;
3. Adicionar 100 mL de tampão TAE 1X;
4. Aquecer em micro-ondas, até a ebulição (cerca de 1 min.);
5. Deixar esfriar até ~50°C, e adicionar 5 µL de corante *SYBR Safe* (Life Technologies);
6. Despejar imediatamente a solução de agarose na “caminha” montada com o respectivo pente;
7. Aguardar até que ocorra a gelificação do gel;
8. Remover o pente **cuidadosamente**;
9. Completar o volume da cuba com TAE 1X;
10. Preparar as amostras a serem quantificadas misturando 10 µL de DNA, 4 µL de água milli-Q autoclavada, e 4 µL de tampão 6x de aplicação da amostra;
11. Aplicar uma amostra de DNA em cada poço do gel;
12. Ligar os cabos a fonte e ao aparato de eletroforese e ligar a força, ajustando para 80 V;

Obs: A “caminha” deve ser posicionada do polo negativo para o positivo.

13. Após 30 minutos observar o gel sob luz azul, fotografando-o se necessário.

Concentração de agarose e separação de DNA

Concentração de Agarose % no gel (w/v)	Intervalo de separação linear de moléculas de DNA (kpb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

Tampão de corrida Eletroforeses DNA

Tampão	Solução de trabalho	Solução Stock concentrada (por Litro)
Tris-Acetato-EDTA (TAE)	1 x: 0.04 M Tris-acetato 0.001 M EDTA	50 x: 242 g Tris base 57.1 mL ácido acético glacial 100 mL 0,5 M EDTA-Na ₂ pH 8,0
Tris-Bórico-EDTA (TBE)	0.5 x: 0.045 M Tris-borato 0.001 M EDTA	5 x: 54 g Tris base 27.5 g ácido bórico 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Tampão de aplicação de amostra de DNA 6x

*Glicerol em água 40%

*Azul de bromofenol 0.25%

*Xileno cianol 0.25%

- Azul de bromofenol migra em géis de agarose (independentemente de sua concentração), utilizando tampão 0.5x TBE (Tris-base/Bórico/EDTA), na altura da banda de 300 pb de dsDNA, enquanto que xileno cianol migra na altura da banda de 4 kb de dsDNA.

2- Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE

Na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a matriz do gel é constituída pela ligação entrecruzada do polímero de acrilamida com N, N'-bis-acrilamida de metilo, formando poros, cujo tamanho pode ser previamente determinado, de acordo com a concentração de acrilamida e bis-acrilamida utilizada na preparação do gel, o que também influencia a elasticidade e resistência do gel. O processo de polimerização é acelerado na presença do catalisador N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio (APS). A técnica pode ser PAGE desnaturante (SDS-PAGE, na qual é acrescido sódio dodecil sulfato, SDS) ou PAGE nativa (não-desnaturante). Na PAGE nativa, a proteína retém sua atividade e estrutura tridimensional (por exemplo, para realização do ensaio de atividade enzimática em gel - zimograma).

A eletroforese de proteínas é comumente realizada no sentido vertical, na qual o gel é preparado entre duas placas de vidro. Assim, uma câmara é montada separando as duas placas de vidro com tiras espaçadoras selando as bordas laterais das placas e depois é selada a parte inferior, formando uma caixa à prova de líquidos ou “sanduíche”, na qual será vertido inicialmente o gel de separação, que deve polimerizar, e depois o gel de entrada, momento no qual é colocado o pente a ser utilizado para formação dos poços para aplicação das amostras (Figura 1).

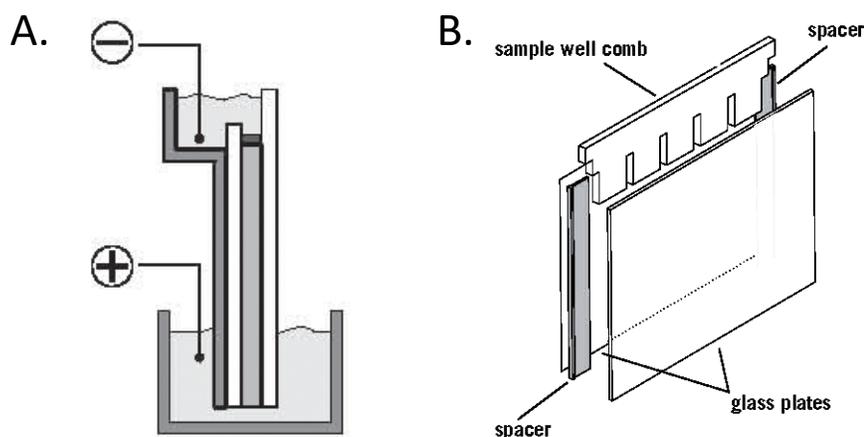


Figura 1. Diagrama do sistema vertical de eletroforese (A) e sua montagem (B) (sanduíche) as laterais e a parte inferior devem ser seladas, antes da solução do gel ser aplicada.

O sistema descontínuo de Laemmli é o sistema mais amplamente utilizado para a eletroforese de proteínas. A resolução num gel de Laemmli é excelente porque as proteínas são concentradas numa zona de empilhamento (gel de entrada), antes de entrar no gel de separação ou corrida.

Procedimento:

1. Montar o suporte para preparação do gel de poliacrilamida;
2. Preparar a mistura do gel de separação 10%, como indicado na tabela;
3. Aplicar a mistura do gel de separação e aguardar até polimerizar;
4. Preparar a mistura do gel de entrada 5%, como indicado na tabela;
5. Aplicar a mistura do gel de entrada, colocar os pentes com o número e tamanho de poços a serem utilizados e aguardar até polimerizar;

6. Preparar as amostras, misturando com tampão de aplicação de amostras. Ferver por 5 minutos, deixar esfriar;

7. Utilizando agulha, depositar as amostras em cada poço;

8. Conectar os fios, seguindo o código de cores, na fonte de eletroforeses. Ligar a 80 V e deixar correr até 2 cm antes do fim do gel;

9. Mergulhar o gel na solução corante de proteínas por 30 minutos. Visualizar e registrar fotograficamente.

Mistura para preparação de Gel de Separação 10%

Componentes	Quantidade
Solução de acrilamida 30%	2 mL
Tampão 4x de gel de separação	1,5 mL
Persulfato de amônio 20%	50 uL
TEMED	25 uL
H ₂ O (suficiente para volume final)	6 mL

Mistura para preparação de Gel de Entrada 5%

Componentes	Quantidade
Solução de acrilamida 30%	0,67 mL
Tampão 4x para o gel de entrada	1 mL
Persulfato de amônio 20%	25 uL
TEMED	10 uL
H ₂ O (suficiente para volume final)	4 mL

Faixa de separação de géis PAGE-SDS

Concentração de acrilamida (%)*	Faixa lineal de separação (kD)
15	12 – 43
10	16 – 68
7.5	36 – 94

5	57 – 512
---	----------

***Relação acrilamida:bis-acrilamida - 29:1**

Solução de Acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1)

Reagente	Quantidade
Acrilamida	29 g
N,N'-Methylene bisacrylamide	1 g
H ₂ O (suficiente para volume final)	100 mL
Conservar em local fresco e em frasco obscuro	

Tampão 4x para o gel de separação (Gel de resolução)

Componentes	Concentração Final	Quantidade
1.5 M Tris-Cl/0,4% SDS pH 8.8		
Tris Base (MW 121.1)	1.5 M	18,2 g
SDS		0,4 g
H ₂ O qsp		50 mL
Adiciona HCl	até pH 8.8	
H ₂ O (suficiente para volume final)		100 mL

Tampão 4x para o gel de Entrada (Gel de empilhamento)

Componentes	Concentração Final	Quantidade
0.5 M Tris-Cl/0,4% SDS pH 6.8		
Tris (MW 121.1)	0.5 M	3 g
SDS 10%		0,2 g
H ₂ O qsp		40 mL
Adiciona HCl	até pH 6.8	
H ₂ O (suficiente para volume final)		50 mL

2x SDS Tampão de aplicação de amostra

Componentes	Quantidade
Tampão 4x para o gel de entrada pH 6,8	2,5 mL
SDS	0,4 g
Glicerol 87%	2 mL
Azul de bromofenol	0,1 mg
H ₂ O (suficiente para volume final)	10 mL
Conservar em alíquotas de 1 mL e antes do uso adicionar 20 uL de solução stock de β -Mercaptoetanol (β -MeOH).	

Tampão de corrida de Eletroforeses: Tris-Glicina SDS, pH 8.3

- Tris base 25 mM / glicina 250 mM / SDS 0.1%
- Preparar uma solução 1x: dissolver 3 g de tris base, 1 g de SDS e 18,8 g de glicina em 900 mL de água deionizada, completar a um volume final de 1000 mL com água.

Solução corante de proteínas: Azul Brilhante de Coomassie-R250 (Coomassie Brilliant Blue R-250)

Dissolver 0,05 g de Azul Brilhante de Coomassie-R250 em 50 mL de metanol e adicionar 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água. Conservar em frasco obscuro a temperatura ambiente. Após a eletroforese SDS-PAGE, cobrir o gel com o corante, deixar por 2 h ou até visualizar as bandas de proteína e lavar com água.

Atividade
DNA recombinante
Sistemas Procarióticos: Vetores de Clonagem e Expressão

Plasmídeos são moléculas de DNA extra cromossomal capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico, carregam consigo informações genéticas e até mesmo genes responsáveis por inúmeros casos de resistência a antibióticos. São encontrados em procariotos e eucariotos, podendo ser removidos das células e transferidos de uma cepa bacteriana para outra.

Transformação é a variação hereditária de uma célula bacteriana susceptível, devida à captação de DNA exógeno livre no meio, com a posterior replicação deste DNA no interior celular. A célula que recebe o DNA é denominada transformante. O descobrimento da transformação bacteriana permitiu estabelecer que o DNA é o portador da informação genética nos seres vivos. A transformação natural é pouco comum, por isso sistemas artificiais para produzir “células competentes” de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e outras bactérias têm sido desenvolvidos. O tratamento permite a permeabilidade da membrana às moléculas de DNA, sendo os transformantes selecionados pela marca de resistência a algum antibiótico presente no DNA plasmidial (DNA exógeno). Na técnica de eletroporação, na qual as células competentes estão suspensas em glicerol 10%, as células são submetidas a pulsos de corrente elétrica de alta voltagem, o qual altera a permeabilidade da membrana e permite o ingresso do DNA plasmidial ao interior celular da bactéria.

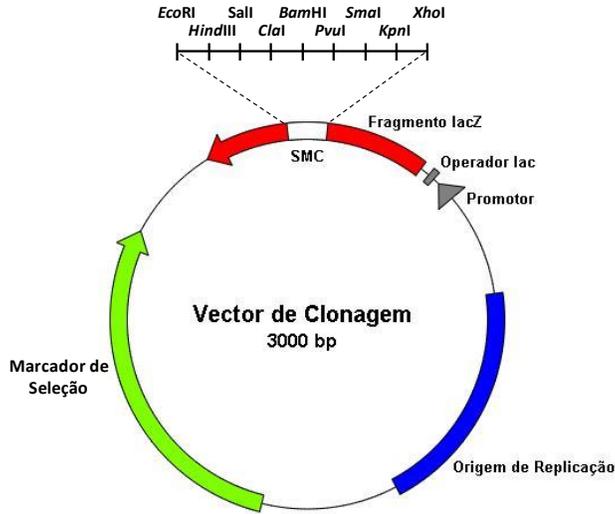


Figura 1. Esquema de um vector/plasmideo de clonagem. Um vector de clonagem é uma molécula de DNA que inserida na célula hospedeira permite a replicação e obtenção de numerosas copias do DNA alvo. A figura mostra os principais componentes presentes em um vector de clonagem. SMC= sítio de múltipla clonagem.

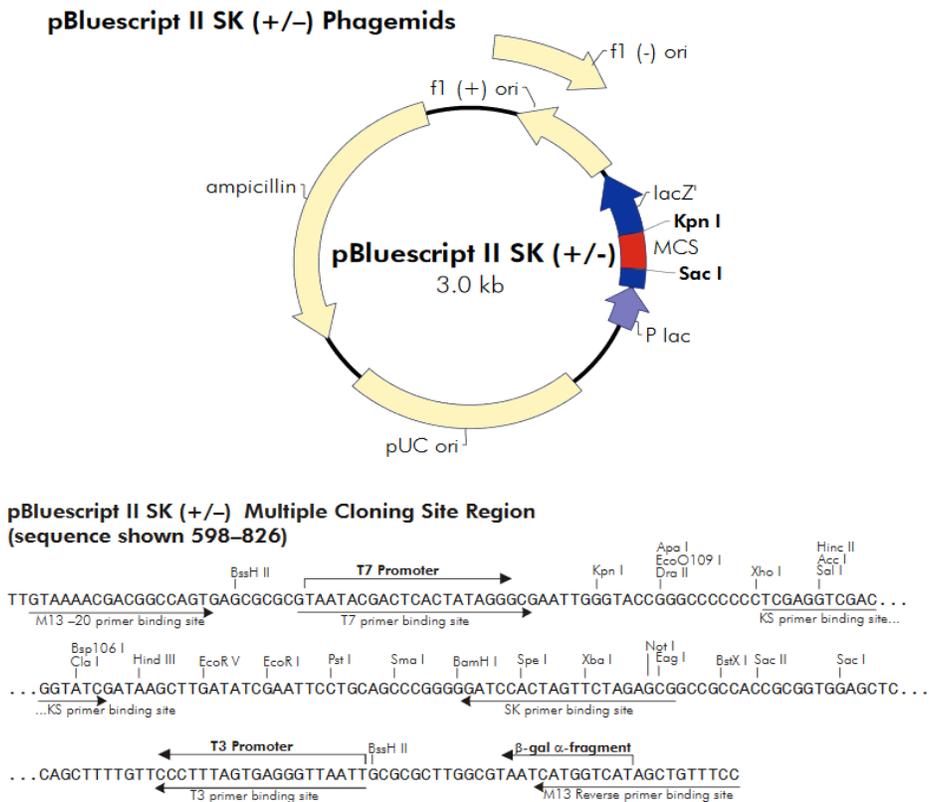


Figura 2. Exemplo de um vector/plasmideo de clonagem.

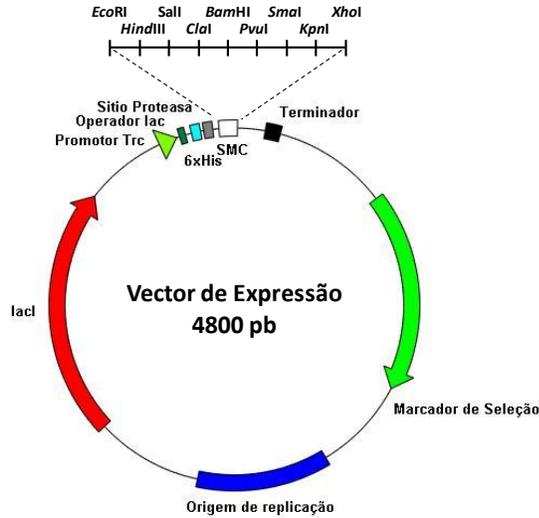


Figura 3. Esquema de um vetor/plasmídeo de expressão. Um vetor de expressão é uma molécula de DNA que inserida na célula hospedeira permite a expressão de um gene e produção da proteína de interesse. A figura mostra os principais componentes presentes em um vetor de expressão. SMC= sítio de múltipla clonagem.

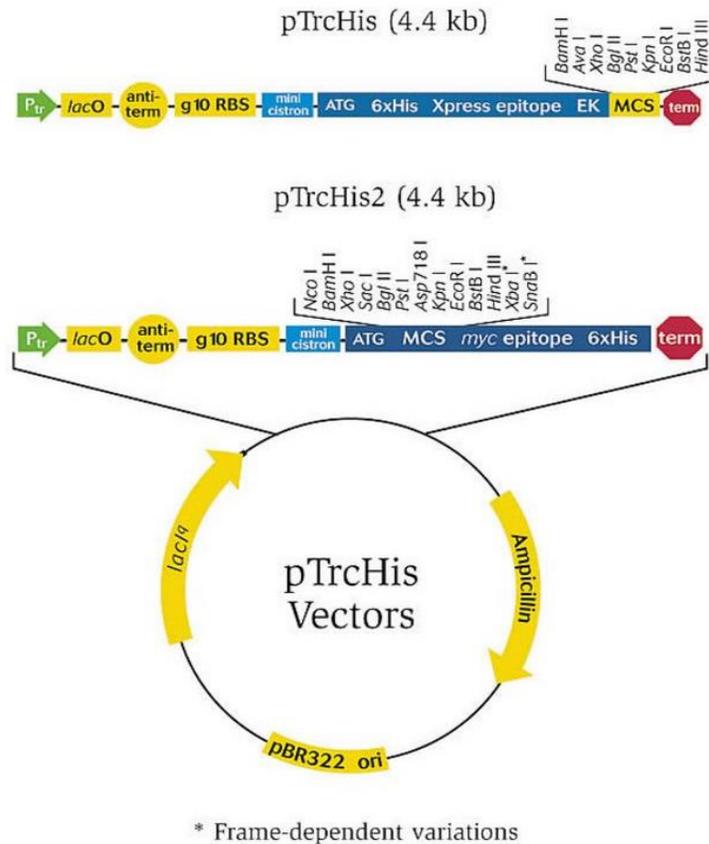


Figura 4. Exemplo de um vetor/plasmídeo para expressão de proteína recombinante.

Informações sobre sistemas de clonagem e/ou expressão:

- Sistema pET:

http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf

- **Repositório de plasmídeos:**

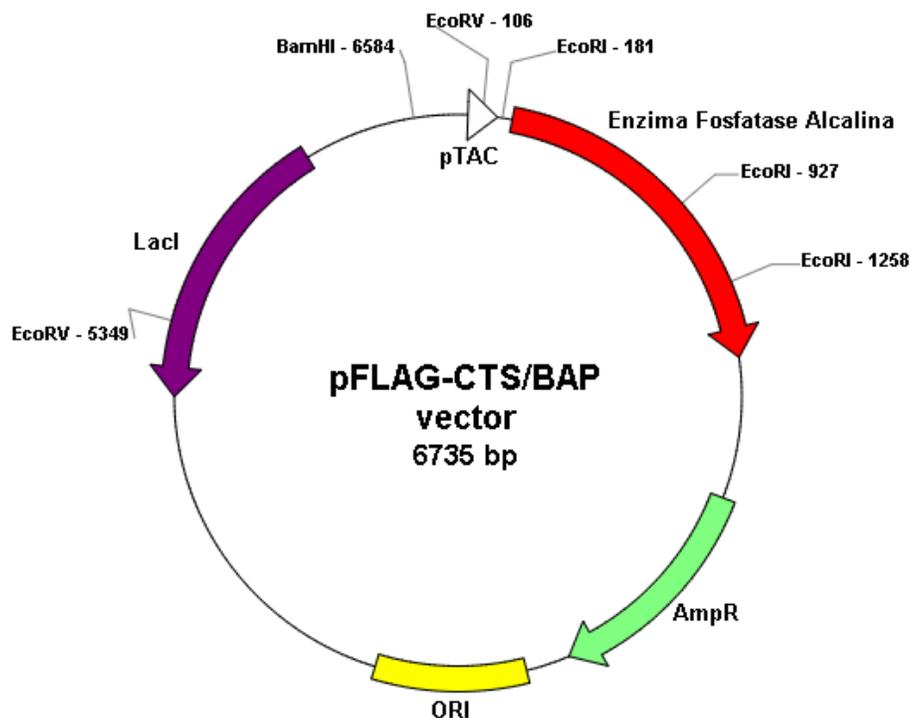
<https://dnasu.org/DNASU/Home.do>

Enzimas utilizadas em Clonagem molecular

Na clonagem molecular ou clonagem de genes é necessário realizar um conjunto de métodos experimentais de biologia molecular para construção de moléculas de DNA recombinante (rDNA) e direcionar sua replicação num organismo hospedeiro. A clonagem molecular utiliza sequências de DNA de dois organismos diferentes: DNA da espécie que será clonado e DNA da espécie que servirá de hospedeiro vivo para a replicação do DNA recombinante. Para tanto, diversas ferramentas moleculares, como por exemplo, enzimas, são utilizadas na construção das moléculas de rDNA.

Maiores detalhes em: Laure Rittié & Bernard Perbal. J. Cell Commun. Signal. (2008) 2:25–45. DOI 10.1007/s12079-008-0026-2

1. Procedimento de Digestão DNA plasmidial:



Preparar a clivagem do vetor separadamente, com as enzimas de restrição selecionadas, conforme o esquema:

Componentes da mistura	Volume (μL)
DNA plasmidial	26
Tampão da enzima (10x)	3
Mix Enzima Restrição (<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI/ <i>Eco</i> RV)	1,0
H ₂ O (suficiente para volume final)	30

- Incubar por, no mínimo, 30 minutos na temperatura ótima de atividade da enzima.
- Analisar as amostras por eletroforese em gel de agarose 1%.

2- Procedimento de Ligação:

Preparar a ligação do vetor com o fragmento de interesse de acordo com as instruções do fabricante do kit de ligação, conforme o esquema:

Componentes da mistura	Volume (μL)
Fragmento DNA plasmidial	9
DNA vetor plasmidial	1
Tampão da enzima (10x)	2
Enzima T4 DNA ligase	1
H ₂ O (suficiente para volume final)	20

- Incubar por, no mínimo, 1h, na temperatura ótima da enzima.

3- Procedimento de Eletroporação:

1. Adicionar, às células competentes de bactéria, 1 μL da reação de ligação. Misturar com o auxílio da micropipeta;

2. A mistura será mantida em gelo e transferida para a cubeta de eletroporação de 0,2 cm. A eletroporação será realizada utilizando o aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf, USA), 2250V, seguindo os parâmetros recomendados pelo fabricante;

3. Após eletroporação, 1 mL de meio LB líquido será adicionado e a cultura será incubada por 1 h, a 37°C,

4. Semear em placas de LB ágar contendo o antibiótico Ampicilina (100 ug/ml) e incubar por 18 h em estufa à 37°C.

4- Exercícios Mapas de restrição

Atividade

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de Bactéria:

1. Em um microtubo de 200 uL, fazer uma mistura dos componentes do Kit Taq DNA polimerase com 1 ul da amostra de Bactéria, completar com água estéril a um volume de 25 ul. (Trabalhar sob um recipiente de isopor com gelo).

Componentes da mistura	Volume (µL)
10x PCR Buffer sem Mg	2,5
10 mM mix de dNTPs	0,5
50mM MgCl ₂	1,5
Primer R	1,25
Primer F	1,25
Taq DNA polimerase 5 U/µL	1
Bactéria (amostra)	2
H ₂ O (suficiente para volume final)	25

2. Centrifugar e misturar brevemente. Incubar o tubo, em termociclador com o seguinte programa:

a) Desnaturação inicial	95°C - 5 min.
b) Desnaturação	95°C - 3 min.
Anelamento	48°C - 30 seg.
Extensão	72 °C - 1 min.
(Repetir todos os itens b - 35x)	
c) Extensão final	72°C - 10 min.
d) Manter a reação	4°C

Realizar Eletroforeses de DNA e documentar os resultados.

Atividade

Proteína Recombinante

Após o fracionamento do DNA num gel de eletroforese, pode-se usar uma técnica denominada *Southern blot*, para identificar um fragmento específico de DNA na mistura. O gel é coberto com uma membrana de nitrocelulose absorvente e encontra-se em contato com uma solução tampão. Ao cobrir a membrana, colocam-se tiras de papel de filtro que irão absorver o tampão. Por ação capilar, os fragmentos de DNA (bandas) são transferidas para a membrana. A membrana é então marcada radioativamente ou com um fluoróforo (químico fluorescente) ligado a uma sonda específica de DNA, complementar com a sequência do DNA alvo. A sonda hibrida com a sequência alvo.

O *Northern blot* detecta uma molécula específica de RNA de uma população contendo RNAs separados num gel de eletroforese. O RNA é transferido para a membrana e hibridizado do modo similar a técnica *Southern*.

O *Western blot* foi desenvolvido para transferir proteínas separados num gel de eletroforese a uma membrana e identificar proteínas específicas através da reação com anticorpos.

1- Crescimento bacteriano e indução para expressão de proteína recombinante

Crescimento bacteriano é o aumento do número de células. A maioria das bactérias cresce melhor dentro de variações pequenas de pH, sempre perto da neutralidade, entre pH 6,5 e 7,5. O período da divisão celular depende do tempo de geração de cada bactéria. Os organismos são colocados para crescer em meio de cultura preparado em laboratório o qual fornece os nutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos organismos (como bactérias e fungos) fora do seu habitat natural. O meio de cultura a ser utilizado é o LB-caldo (Peptona 10g/Extrato de levedura 5g/NaCl 5 g, por litro) ou LB agar (LB-caldo + 15 g agar-agar bacteriológico, por litro). Esterilizado em autoclave.

Procedimento:

1. Com a ansa bacteriológica coletar uma colônia da placa de LB-agar
2. Transferir a colônia de bactéria a tubo contendo meio de cultura LB-caldo, contendo o antibiótico de seleção.

3. Incubar 37°C/18 h/150 rpm.
4. Fazer inóculo com 1 ml da cultura, adicionado a 9 ml de meio de cultura fresco, contendo o antibiótico de seleção. Incubar 37°C/150 rpm.
5. Acompanhar a densidade óptica (DO) 600 nm até 0,4-0,6.
6. Remover uma parte da cultura para novo frasco e identificar como NÃO INDUZIDO e determinar a DO₆₀₀ (tempo zero) ao restante da cultura adicionar indutor IPTG a uma concentração final de 0,5 mM, identificar como INDUZIDO.
7. Incubar os 2 frascos 37°C/150 rpm.
8. Fazer leitura da DO₆₀₀ às 4, 6 e 8 h após indução, de cada frasco.
9. Construir o gráfico de crescimento bacteriano.
10. Coletar a massa bacteriana (1 ml) por centrifugação 10.000 rpm/5 min, após cada leitura de DO₆₀₀ e realizar eletroforeses SDS-PAGE.

Tabela. Crescimento bacteriano DO₆₀₀ nm

Cultura/OD600	Inóculo (0 h – 10 h)	Indução (2h – 12h)		4 h (14 h)		6 h (16 h)		8 h (18h)	
		NIndz*	Indz**	NIndz	Indz	NIndz	Indz	NIndz	Indz
TfAEST									
BAP									

* Cultura bacteriana não induzida com IPTG

** Cultura bacteriana induzida com IPTG 0,5 mM

2- Lise bacteriana

A lise celular é a primeira etapa do fracionamento celular, isolamento de organelas e extração e purificação de proteínas. Vários métodos são comumente usados para lisar as células, incluindo interrupção mecânica, homogeneização de líquidos, ondas sonoras de alta frequência, ciclos de congelamento / descongelamento, trituração manual, enzimas, detergentes, entre outras. Um artigo de revisão sobre o tema pode ser consultado (doi: 10.3390/mi8030083)

Procedimento:

1. Suspender a massa celular bacteriana em tampão de lise (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM e EDTA 1mM).
2. Adicionar 1/10 de volume de lisozima 10 mg/ml e incubar a 37 °C por 30 min
3. Adicionar 1/20 vol de Triton X-100 20% e incubar a 37 °C por 10 min.
4. Centrifugar 10.000 rpm/10 min,
5. Transferir o sobrenadante a novo tubo eppendorf limpo.
6. Identificar os tubos como
6. Realizar análise de eletroforeses SDS-PAGE.

3- Determinação de atividade de fosfatase alcalina (BAP) e Acetil esterase (TfAEST)

Fosfatase alcalina é uma hidrolase que remove grupos fosfato de diferentes moléculas, sendo mais ativa em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é conhecido como desfosforilação. Acetil esterase é uma hidrolase que remove grupos acetil de diferentes moléculas

Procedimento:

Por definição 1 unidade (1U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto.

Com o material coletado (tubos com 50 uL de cultura induzida) da aula anterior:

1. Em tubos devidamente identificados, contendo 50 uL de massa bacteriana, adicione 50ul de água, suspenda a bactéria e adicione o volume do substrato indicado:
 - BAP: 50 uL de 1 mg/mL p-nitrofenil fosfato (pNP) dissolvido em Tris-Cl 1 M, pH 8
 - TfAEST: 50 uL de p-nitrofenil acetato (pNPa), 5 mM em metanol 50%
2. Misture bem e incube em temperatura ambiente, por 5 minutos, a reação deve ser parada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M.
3. Transferir 100 µL da amostra aos poços da microplaca (96 poços), segundo a tabela, e o p-nitrofenolato liberado será medido pela absorbância a 405 nm, anote o valor na coluna 4.

4. Com os dados da coluna 4, na tabela abaixo, converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da figura abaixo e preencha a coluna 5.

Tabela. Atividade enzimática de fosfatase alcalina/acetil esterase

Coluna	1	2	3	4	5
Tubo INDZ n°/h	Substrato (mL)	Enzima (ml)	Absorbância (600 nm)	Absorbância (405 nm)	Micromols de Produto
1/0	0,05	0,05			
2/2	0,05	0,05			
3/4- 14 h	0,05	0,05			
4/6 – 16 h	0,05	0,05			
5/8 – 18 h	0,05	0,05			

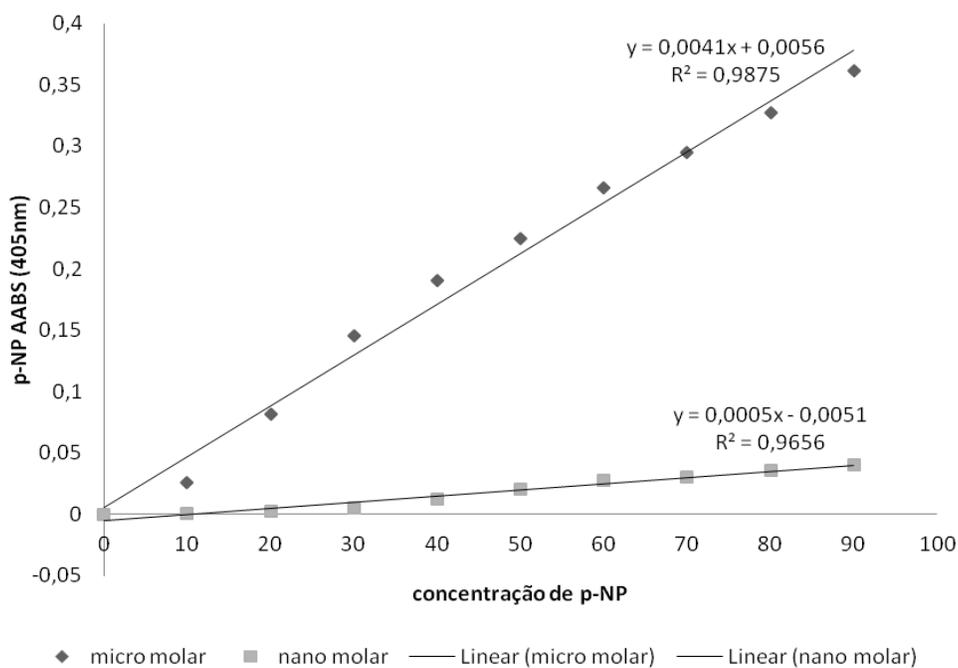


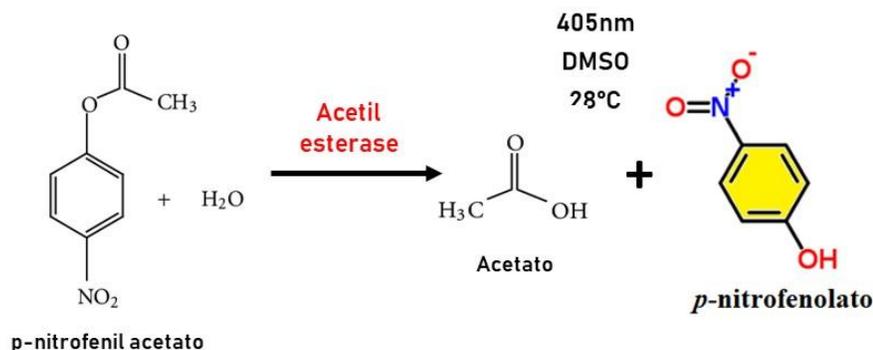
Figura 1. Curva padrão do produto p-nitrofenol

Atividade

Purificação de Proteína Recombinante e Determinação de atividade enzimática

1- Enzima Acetil Esterase

Acetil Esterase é uma hidrolase que remove grupos acetato de diferentes moléculas, a mesma foi expressa em sistema de expressão no qual a enzima é produzida com fusão de uma cauda de 6xHis no N-terminal. O processo de purificação será realizado utilizando Ni-NTA Agarose (Qiagen, USA). A técnica a ser utilizada será a cromatografia por afinidade, que separa a proteína de interesse por sua afinidade a um determinado ligante. A proteína recombinante produzida apresenta uma cauda de seis histidinas (HIS)₆ com afinidade pelos íons metálicos bivalentes carregados positivamente, como é o caso dos íons de níquel (Ni²⁺). Assim, o processo de purificação consiste principalmente de 4 etapas: lise celular, ligação da proteína recombinante, lavagem e eluição. A Ni-NTA Agarose é uma resina Sepharose CL-6B acoplada a Ni-NTA (Nitrilotriacético ácido) (fase estacionária) ligada a íons de níquel (Ni²⁺) e é essa característica que permitirá que a proteína recombinante em estudo se ligue à resina e seja purificada. Para eluição da proteína ligada na resina Ni²⁺-sefarose será usado o reagente imidazol, que é um competidor pela ligação aos íons metálicos, e dessa forma, espera-se obter uma proteína com alto grau de pureza no final do processo.



Procedimento para Purificação por Cromatografia de afinidade:

1. Massa bacteriana será rompida por sonicação (10s on / 50s off, por 4 minutos) em tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2) e centrifugada durante 30 minutos à 4°C e 10.000 rpm;
2. Coletar o sobrenadante e adicionar NaCl para concentração final de 500 mM, objetivando deixar a mistura proteica nas condições do tampão de ligação a ser utilizado na etapa de purificação.

Procedimento:

1. **ETAPA DE LIGAÇÃO:** Em eppendorf de 2 ml, acrescentar 1,5 mL do sobrenadante bacteriano e adicionar 250 µl de resina agarose Ni-NTA (Qiagen, USA).
2. Homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 10 minutos.
3. Em seguida, centrifugar por 1 min a 5.000 rpm, para sedimentar a resina, e transferir 100 µl do sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 1.5 ml (**T1**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar.

Obs: As amostras de sobrenadante conterão proteínas que não se ligaram à resina.

4. **ETAPA DE LAVAGEM:** Adicione 1 mL de **TAMPÃO A** (tampão fosfato de sódio 50 Mm/ NaCl 500 mM, pH 7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.
5. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir 100 µl do sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 1.5 ml (**T2**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar. **REPETIR OS PASSOS 4 e 5 (T3)**
6. **ETAPA DE ELUIÇÃO:** Acrescentar 300 µl de **TAMPÃO B** (tampão fosfato de sódio 50 mM/ NaCl 500 mM/ Imidazol 500 mM, pH 7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.
7. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir **TODO** o sobrenadante restante cuidadosamente para um novo tubo eppendorf de 1.5mL (**T4**, armazenar no gelo).

Obs: O sobrenadante dessa etapa contém a enzima purificada.

8. Correr as amostras coletadas nos tubos T1 – T4 (25 µl) em gel SDS-PAGE.

Procedimento para determinação da atividade enzimática

1. Em tubos devidamente identificados, monte o experimento seguindo a tabela abaixo:

	Branco	T1	T2	T3	T4
Tampão de atividade	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Substrato	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Enzima	0	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Volume Final	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
DO 405 nm					
Micromols de Produto					

Substrato: *p*-nitrofenil acetato - pNPa, 5 mM em metanol 50%

Tampão de Atividade: Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2

2. Misture bem e incube a temperatura ambiente por 10 minutos.
3. A reação deve ser parada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M.
4. Adicionar 100 µL da amostra em uma microplaca e o *p*-nitrofenolato liberado será medido a DO 405 nm.
5. Converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da atividade da aula anterior.

Atividade

Extração e Determinação de atividade da enzima fosfatase alcalina

A proteína foi expressa utilizando um vetor com sinal de secreção ao espaço periplasmático, assim a metodologia para recuperação da proteína será por Choque Osmótico (Neu and Heppel, 1965).

Procedimento:

1. Suspender a massa bacteriana em 1 mL de tampão (Tris-HCl 30 mM; sacarose 20%; EDTA 1 mM, pH 8,0), homogeneizar por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugar a 10.000rpm/10min, temperatura ambiente, descartar o sobrenadante,
2. Adicionar 300 μ L de H₂O **destilada gelada, manter a amostra no gelo**, vortexar por 15 segundos fortemente a cada 2 minutos, até completar 15 minutos.
3. Após esse período centrifugar a 10.000rpm/10min, temperatura ambiente. Recuperar o sobrenadante e descartar a massa bacteriana.

Obsv: O sobrenadante contém a enzima que será utilizada para os ensaios de atividade enzimática.

4. Em tubos devidamente identificados, adicione o volume de substrato (1 mg/mL p-nitrofenil fosfato dissolvido em Tris 1 M, pH 8) indicado e em seguida adicione o volume de amostra de enzima, de acordo com a tabela abaixo. Misture bem e incube em temperatura ambiente.

Obsv: Após o tempo de incubação, adicionar a solução de parada da reação enzimática e manter o tubo no gelo.

5. Transferir 100 μ L de cada tubo, para poços devidamente identificados em uma microplaca. Faça leitura da absorbância, no leitor de microplacas Loccus, no tempo indicado na tabela e anote o valor na coluna 5.

6. Com os dados da coluna 5, converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da Figura 1 e preencha a coluna 6.

7. Com os dados da coluna 3 (eixo X) e 6 (eixo Y), construa um gráfico, calcule a equação da reta e determine a inclinação da reta (coeficiente angular) o qual corresponde à velocidade da reação, ou seja, o valor de micromols de produto formado por minuto e que corresponde à atividade enzimática presente em cada um dos tubos.

8. Determinação da concentração de atividade enzimática (U/mL):

Sabendo que cada um dos tubos recebeu igual volume de amostra com enzima (0,01 ml), conclui-se que a solução inicial contendo a enzima apresenta uma concentração de U/ml, igual a multiplicação do valor obtido na coluna 5 vezes 100. Se a amostra de enzima antes de ser adicionada em cada um dos tubos foi diluída o valor anteriormente obtido deve-se multiplicar pelo fator de diluição para finalmente obter a concentração da atividade enzimática em U/ml.

Coluna	1	2	3	4	5	6
Tubo nº	Substrato (uL)	Amostra Enzima (uL)	Tempo Incubação (min)	Solução de parada (Na₂CO₃-0.5M) (uL)	Absorbância (405 nm)	Micromols de Produto
1	90	10	2	100		
2	90	10	4	100		
3	90	10	6	100		
4	90	10	8	100		
5	90	10	10	100		

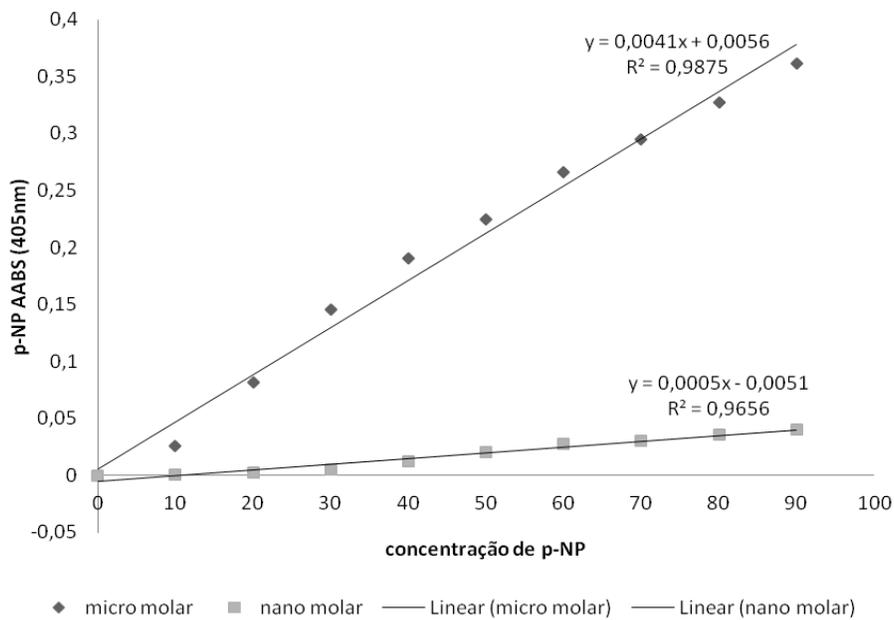


Figura 1. Curva padrão do produto p-nitrofenol

2. Determinação de atividade da enzima acetil esterase

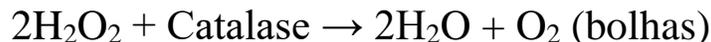
Utilizando a enzima acetil esterase purificada na aula anterior (tubo T4), siga o roteiro da atividade 1, a partir do passo 4, utilizando o substrato específico.

Atividade

1. Enzima Catalase

A catalase é uma enzima produzida por microrganismos que vivem em ambientes na presença de oxigênio para neutralizar as formas tóxicas dos metabólitos do oxigênio, como o peróxido de oxigênio (H₂O₂). A enzima catalase neutraliza os efeitos bactericidas do peróxido de hidrogênio e os protege. Os organismos anaeróbios geralmente não possuem a enzima catalase.

A catalase medeia a quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água. Para determinar a atividade da enzima catalase, é utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio (3%), após mistura é observado a rápida formação de bolhas de oxigênio.



Procedimento:

1. Em uma lâmina de vidro porta-objeto, transfira 50 ul da enzima catalase.
2. Adicione 50 ul de uma solução 3% de H₂O₂ misture.
3. Visualize a formação de bolhas, no tempo máximo de 1 minuto.
4. Registrar o resultado
4. Lave a lâmina com etanol 70% e deixe secar a temperatura ambiente.

2. Determinação de atividade da proteína TrSOD por Zimograma

Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) são metaloenzimas, que podem ser classificadas em quatro tipos, dependendo do metal ligado ao seu sítio ativo (Mn-SOD, Zn/Cu-SOD, Fe-SOD ou Ni-SOD). Essas enzimas desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, pois elas são responsáveis por catalisar a dismutação de O₂^{•-} para O₂ e H₂O₂ originados principalmente no processo de respiração celular. SOD é o principal sistema de defesa antioxidante enzimático contra radicais superóxidos. O peróxido de hidrogênio resultante dessa reação é neutralizado por meio da ação da enzima catalase ou glutathione peroxidase.



O ensaio de atividade enzimática foi adaptado por Flohé e Otting (1984; DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05013-8) em gel de poliacrilamida não desnaturante. A reação baseia-se na produção de $O_2^{\bullet-}$ decorrente da fotooxidação da riboflavina seguida da fotorredução de O_2 . O radical superóxido reduz o nitroazul de tetrazólio (NBT), formando o composto azul de formazan. Na presença de SOD, ocorre a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ impedindo a redução do NBT e, conseqüentemente, a presença de bandas acromáticas, denotando a ausência da formação do azul de formazan e atividade SOD.

Procedimento:

1. Preparar sistema PAGE não desnaturante 15% e tampão de corrida não desnaturante (Trizma base 3,02 g/glicina 14,4 g, por litro).
2. Aplicar 50 μ L de solução de enzima SOD em tampão de amostra não desnaturante (glicerol 87%; azul de bromofenol 0,1%; tampão Tris-Cl 50mM, pH 6,8).
3. Separar as proteínas por eletroforese a 40 V, na temperatura de 16 °C, durante 12 horas.
4. Retirar o gel e submergir em solução de nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,025%, mantido no escuro, sob agitação suave durante 30 minutos.
5. Transferir o gel para uma solução contendo riboflavina 0,01% e tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,01% e expor à luz intensa até a observação das bandas da zona acromática branca, indicativa da atividade da SOD.
6. Registrar o resultado.

Atividade

Imunodeteção de proteínas (Western Blotting)

Procedimento:

1. Após a separação das proteínas (**Antígeno**) presentes em gel de poliacrilamida/SDS (vide protocolo de SDS-PAGE), realizar a transferência para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente elétrica à 400 mA, por 1 h, utilizando tampão de transferência (g/L: glicina 2,9/Trizma base 5,8/metanol 20%)

(https://www.youtube.com/watch?v=7SVHqK_mFtQ).

2. Após o período, verificar pelo marcador de peso se a transferência foi efetiva na membrana e, então, corar a membrana com corante Ponceau S 0,2%, por 5 minutos, agitar no shaker 150 x g.

3. Ao visualizar a presença das bandas (proteínas), remover o corante e lavar com água Milli-Q. Utilizar as referências do marcador para identificar a massa molecular das bandas. Na sequência a membrana de nitrocelulose será utilizada no ensaio de Immunoblot.

4. Bloqueio: Adicionar 10 ml de solução bloqueadora (TBS-Tween, leite desnatado 5%) à membrana e incubar por 1 h, à temperatura ambiente;

Obs: Essa etapa é importante para bloquear sítios inespecíficos da membrana, impedindo que haja ligação do anticorpo com proteínas que não sejam de interesse.

5. Lavagem: Realizar 2 lavagens de 5 minutos, com 10 ml de tampão de lavagem (TBS-Tween) em temperatura ambiente para remover completamente a solução bloqueadora;

Obs: Descartar o tampão de lavagem da membrana a cada 5 minutos e adicionar novo volume.

6. Anticorpo primário: Com o anticorpo específico (*primary Ab*) para a proteína alvo (antígeno) na proporção de 1:1000, ou seja, 10 µl de anticorpo para 10 ml de solução bloqueadora, adicioná-lo à membrana e incubar pelo período *overnight* à 4°C, ou por 2 h, em temperatura ambiente (TA);

O anticorpo primário é um IgG contra uma proteína alvo, ele é obtido a partir do soro de animais inoculados com a o antígeno purificado. Por exemplo, na atividade estamos utilizando um anticorpo primário, produzido em coelho.

7. Lavagem: Após a incubação, reservar o anticorpo primário (freezer) para que seja reutilizado. Realizar 4 lavagens, de 5 minutos cada, com 10 ml de tampão de lavagem em TA, para remover o *primary Ab* completamente da membrana;

8. Anticorpo secundário: Após as lavagens, adicionar o anticorpo conjugado IgG (*secondary Ab*) à membrana, na mesma proporção de 1:1000, e incubar por 1h30, em TA; O anticorpo secundário (conjugado) é um anti-IgG, que reconhece um anticorpo. Por exemplo, na atividade estamos utilizando um anticorpo primário anti uma proteína de interesse, produzido em coelho, assim será utilizado um anticorpo secundário anti-IgG de coelho, que reconhecerá qualquer anticorpo produzido em coelho.

Obs: Anticorpo conjugado é aquele anticorpo ao qual foi adicionado uma molécula do tipo fluorocromo, ouro, biotina, avidina, estreptavidina ou a enzima Horseradish peroxidase – HRP (que na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação do luminol, formando uma mancha obscura na membrana), de forma a facilitar sua detecção visual ou em equipamento específico;

9. Lavagem: Após a incubação, reservar o *secondary Ab* para que seja reutilizado. Realizar 4 lavagens, de 5 minutos cada, com 10 ml de tampão de lavagem em TA, para remover o *secondary Ab* completamente da membrana;

10. Revelação: Adicionar à membrana 200 µL do revelador quimiluminescente (Luminata™ Western Chemiluminescent HRP Substrates – Millipore), em ambiente com baixa luminosidade;

Obs: A revelação é realizada imediatamente, no equipamento ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare, Massachusetts, USA).

11. Documentar os resultados.

Tampão Tris-sal (TBS) pH 7.6

8 g NaCl

20 mL Tris HCl 1 M, pH 7.6

Completar com 1 L de água Milli-Q

TBS Tween (TBS-T)

TBS mais 0,1% de tween 20

Atividade

Aplicação em Biotecnologia

Além das múltiplas aplicações que as proteínas recombinantes podem ter nas diversas áreas econômicas da sociedade, às mesmas podem ser empregadas em atividades de pesquisa laboratorial, como por exemplo para produção de marcadores de massa molecular de proteínas. A proposta pretende que cada grupo descreva e prepare um marcador de massa molecular, utilizando as proteínas recombinantes produzidas na disciplina e referência de artigo científico.

Procedimento:

1. Com base na referência abaixo, cada grupo deve elaborar uma lista de materiais/reagentes e procedimento a ser utilizado.
2. Realizar o procedimento descrito, utilizando os materiais fornecidos pela disciplina.
3. Analisar e visualizar as proteínas por SDS-PAGE.
4. Registrar o resultado

Referências:

Compton MM, Lapp SA, Pedemonte R. Generation of multicolored, prestained molecular weight markers for gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2002 Sep;23(19):3262-5. doi: 10.1002/1522-2683(200210)23:19<3262::AID-ELPS3262>3.0.CO;2-8.

Referências Bibliográficas

1. Ausubel, F., Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Current Protocols in Molecular Biology. Kevin Struhl (eds.) 2003 John Wiley & Sons, Inc.
 2. Sambrook, J., Frisch, E. & Maniatis, T. Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour, N.Y. 2003
 3. Wilson K and Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology Seventh edition. 2010
- Protocolos fornecidos pelos fabricantes dos kits e reagentes utilizados nas atividades práticas.

MATERIAL DE APOIO

Links que direcionam para páginas no site de empresas do setor de Biotecnologia, que fornecem materiais e equipamentos de uso comum em Biologia Molecular e Engenharia Genética, apresentando informações gerais sobre diversas técnicas de interesse.

THERMOFISHER

- **The School of Molecular Biology**
<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/invitrogen/molecular-biology-technologies/mol-bio-school.html?CID=fl-mbschool>
- **Overview de Expressão de Proteínas**
<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html>
- **Protein Biology Learning Center – informações sobre eletroforese de proteínas, western, isolamento e purificação de proteínas e outros**
<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center.html>
- **Brochura DNA purification**
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/dna-isolation-purification-brochure.pdf>
- **RNA isolation e purification**

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/rna-isolation-purification-brochure.pdf>

SINAPSE BIOTECNOLOGIA Ltda

(<http://www.sinapsebiotecnologia-loja.com.br/>)

- Extração de DNA genômico/plasmidial

<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=14455>

- Proteínas, Cromatografia, Western blot

<https://www.gelifesciences.com/ko/kr/support/Documents-and-Downloads/Handbooks>

- Eletroforese

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis.html?SID=fr-dnaelectrophoresis-main>

- PCR

<https://www.takarabio.com/learning-centers/pcr>

- Enzimas de restrição

<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/conventional-restriction-enzymes-thermo-scientific.html?SID=fr-restrictionenzymes-2>

- Expressão de proteínas

<https://www.takarabio.com/learning-centers/protein-research/expression-systems/protein-expression-overview>

- Clonagem

<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/in-fusion-cloning-webinars>

BIO-RAD

- Aplicações e Tecnologias

<https://www.bio-rad.com/pt-br/life-science-research/applications-technologies?ID=1120>

- Introduction to Protein Electrophoresis

<https://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/introduction-protein-electrophoresis?ID=LUSOVO47B>

- Introduction to Western Blotting

<https://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/introduction-western-blotting?ID=LUSPPAKG4>

- Introduction to Chromatography

<https://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/introduction-chromatography?ID=LUSMIS7OP>

- Tutoriais

<https://www.bio-rad.com/pt-br/life-science-research/support/tutorials?ID=KVY62KE8Z#>

Além disso a Bio-Rad possui uma linha de produtos educacionais projetados para serem utilizados em salas de Atividade, abaixo o link do catálogo completo.

https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_2112-global.pdf