



Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2024

Docente:

Felipe 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

Créditos: 4

Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

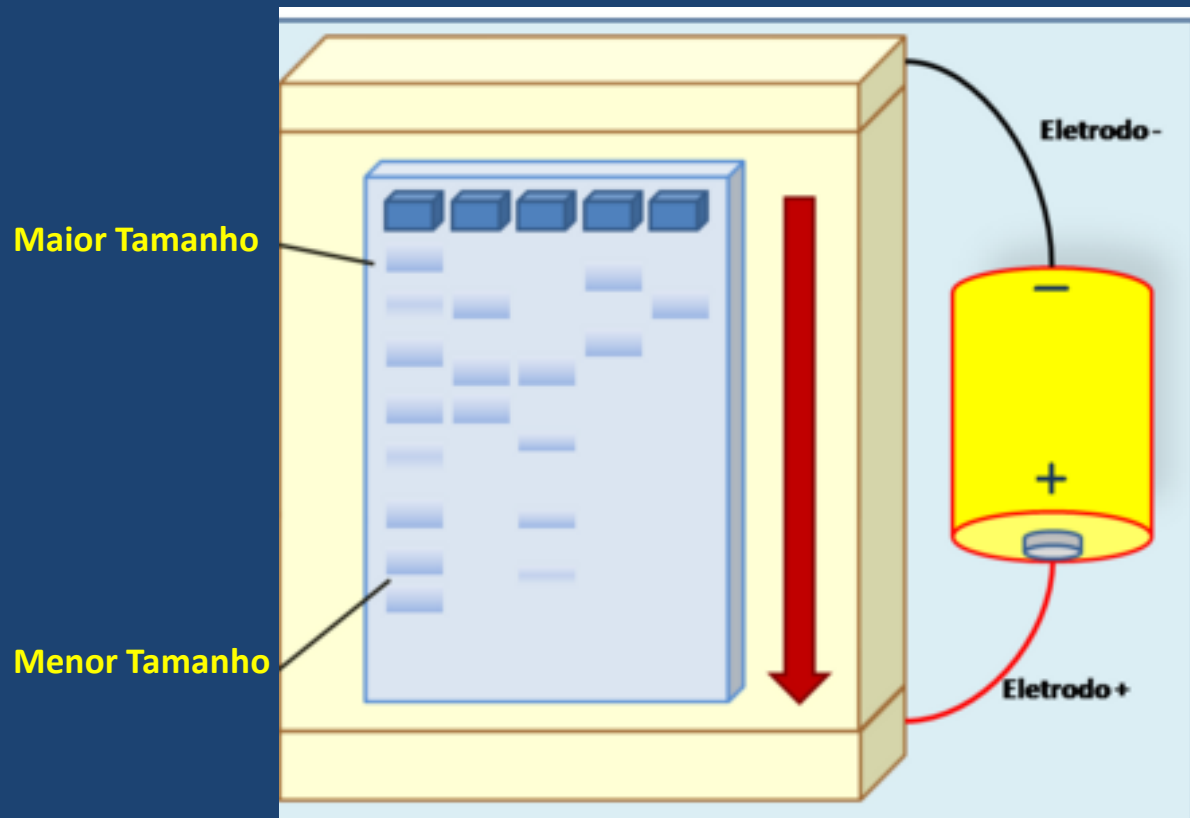
USP - 2024

Separação de biomoléculas por eletroforese: Análise em gel de agarose/poliacrilamida

Eletroforeses de DNA e Proteínas

ELETROFORESES:

Separação de biomoléculas, sob ação de um campo elétrico, é feita de acordo com o tamanho e carga elétrica das moléculas.



Tipos de eletroforeses

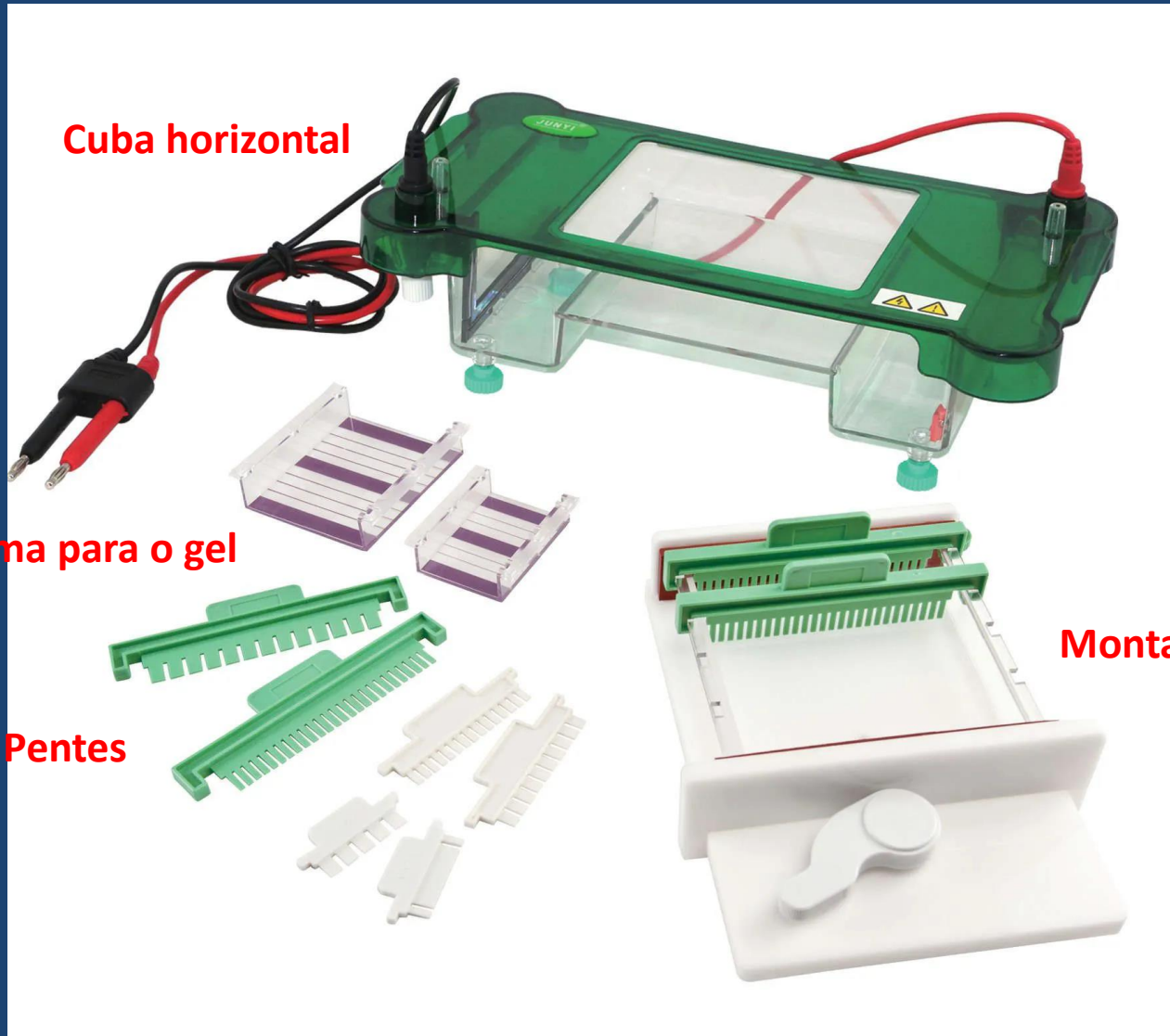
Para separar proteínas e peptídeos

- Eletroforese em papel (acetato de celulose, uso: separar aminoácidos e peptídeos).
- Eletroforese em gel acrilamida:bisacrilamida.
- Eletroforese bidimensional (separação por: ponto isoelétrico e peso molecular).

Para separar DNA

- Eletroforese em gel de agarose.
- Eletroforese capilar (sequenciamento de DNA, utiliza-se capilares de sílica fundida a potenciais elevados 20 a 30 kV em um campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por ar).
- Eletroforese de campo pulsado (separa grandes moléculas (até 600kb), cromossomos inteiros , utiliza-se sucessivos campos elétricos alternados).

SISTEMA DE ELETROFORESE HORIZONTAL



Cuba horizontal

Cama para o gel

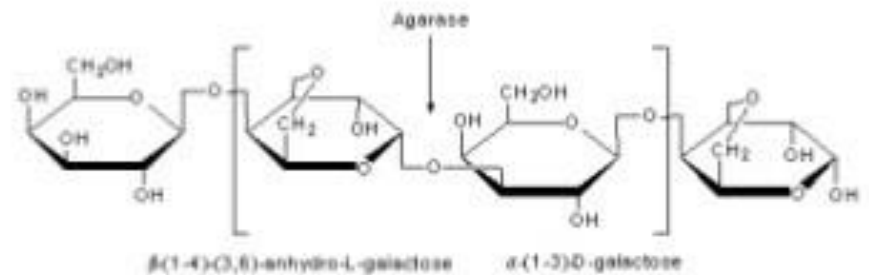
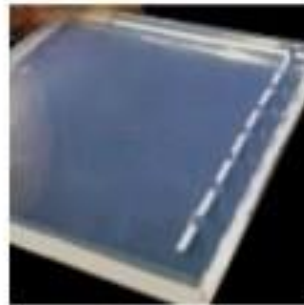
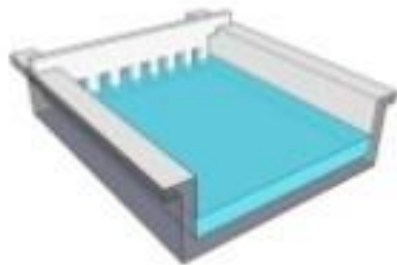
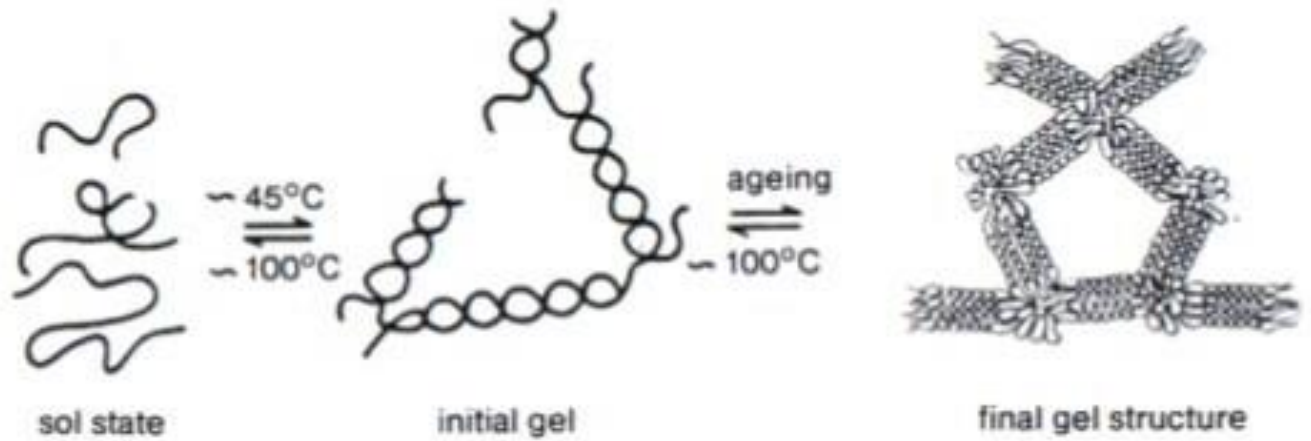
Pentes

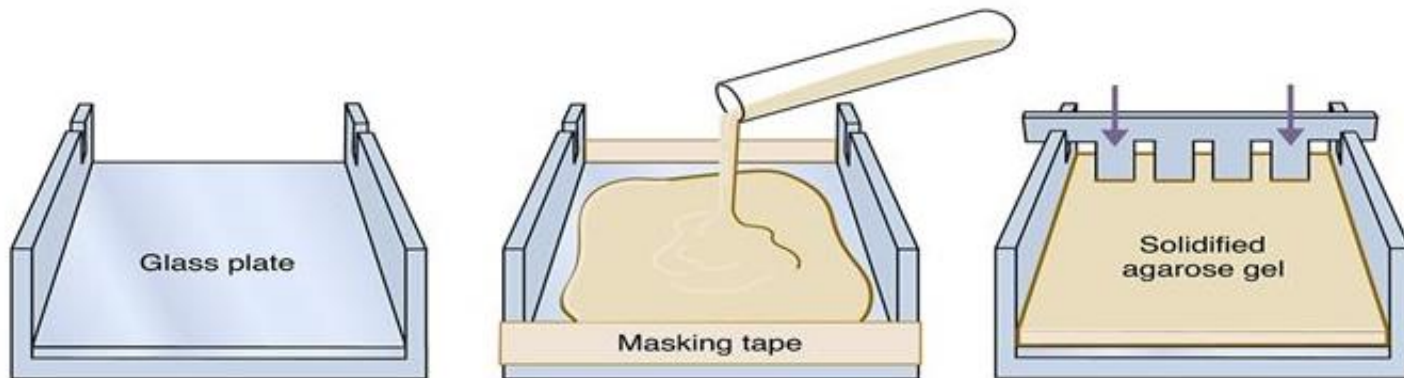
Montagem

Agarose = polímero polissacarídico (D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopirranose)

Agarose gelifica - não há polimerização!

% de agarose no gel varia com a amostra em análise

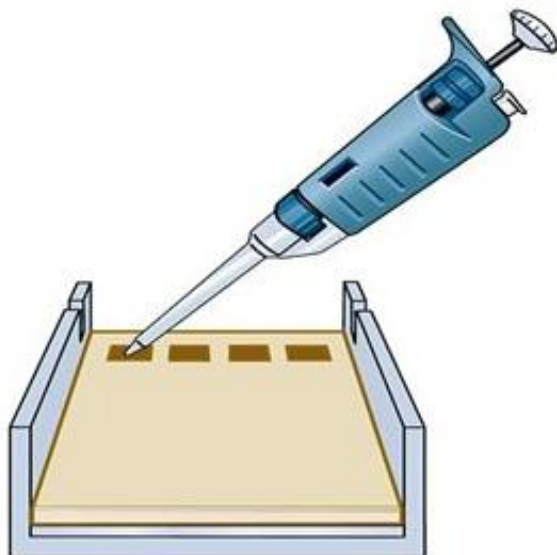




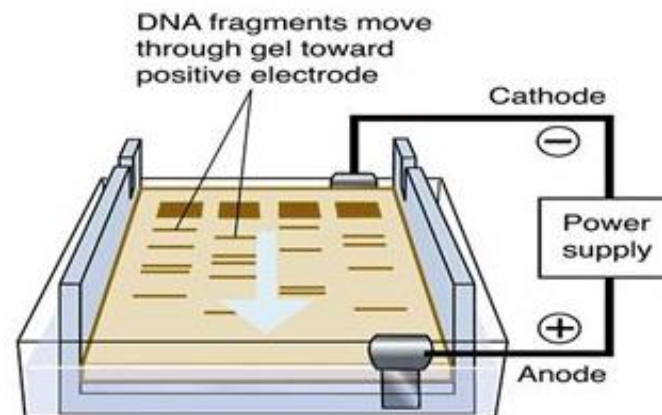
A. Casting tray

B. Pouring agarose solution onto glass plate

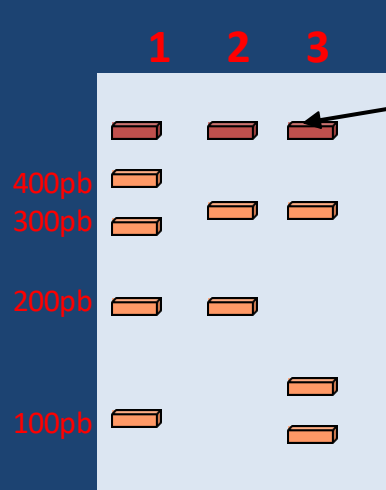
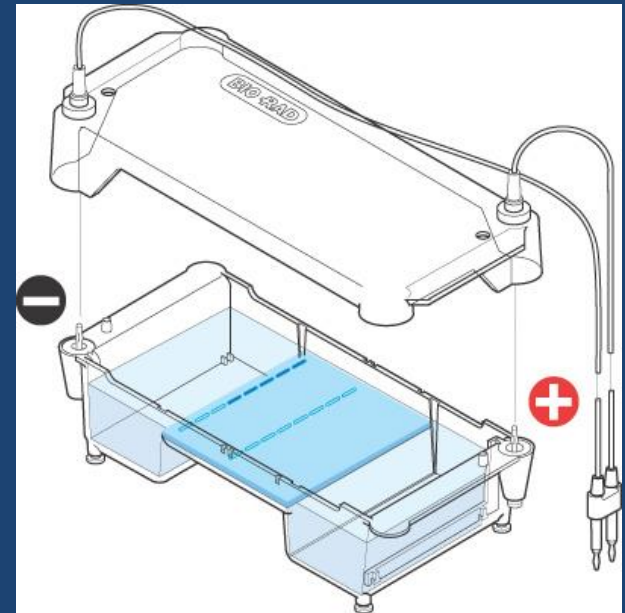
C. Comb is pushed down into gel to form wells



D. DNA segments loaded into wells with micropipette

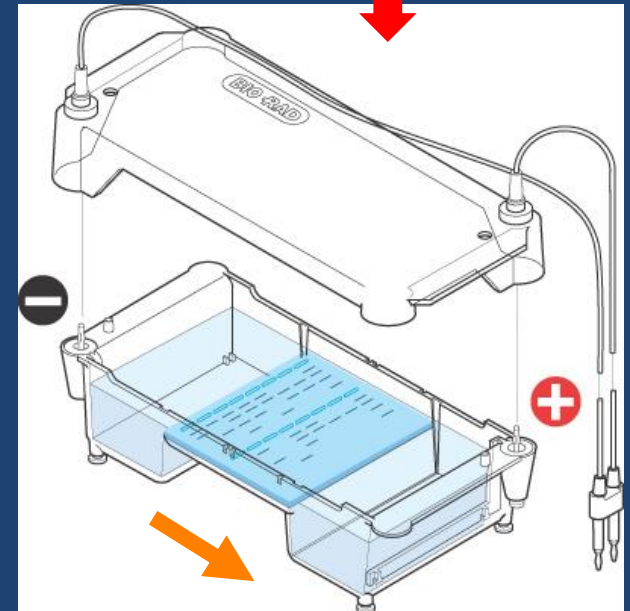


E. Gel plate immersed in charged buffer solution

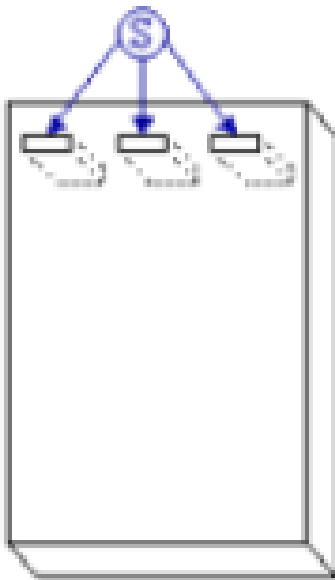


Poços para aplicação das amostras de DNA

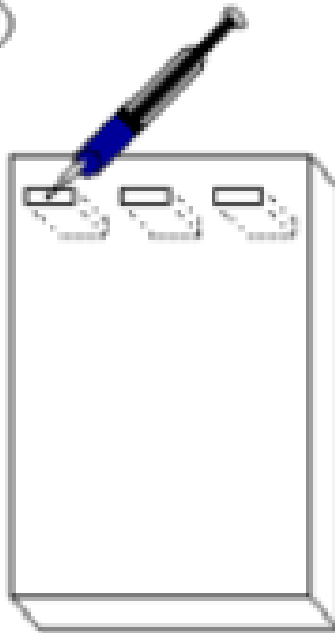
Fragmentos de DNA separados pelo tamanho em pares de bases (pb)



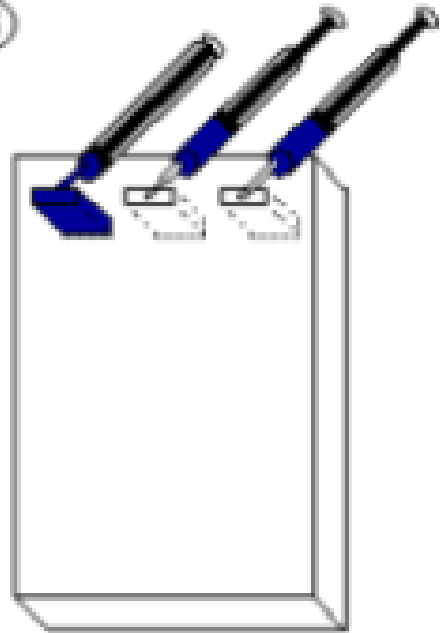
①



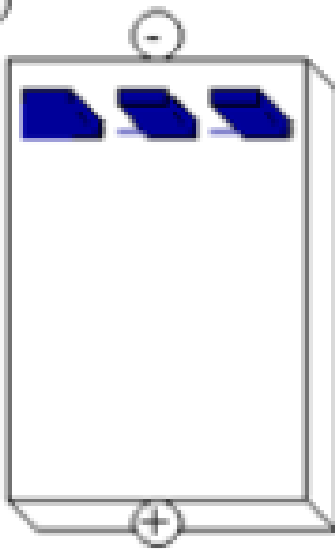
②



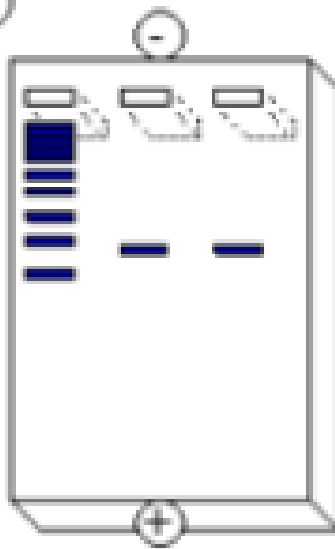
③



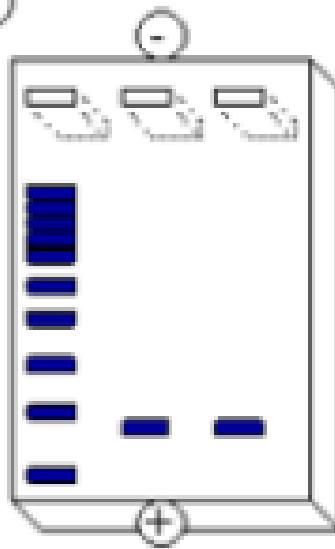
④



⑤



⑥



Eletoforeses de DNA

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 $\sim 50^{\circ}\text{C}$, 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 15 μL de DNA e 3 μL de tampão de aplicação da amostra 6x;
 11. Aplicar a 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 e registrar fotograficamente.

Corante de DNA SYBR

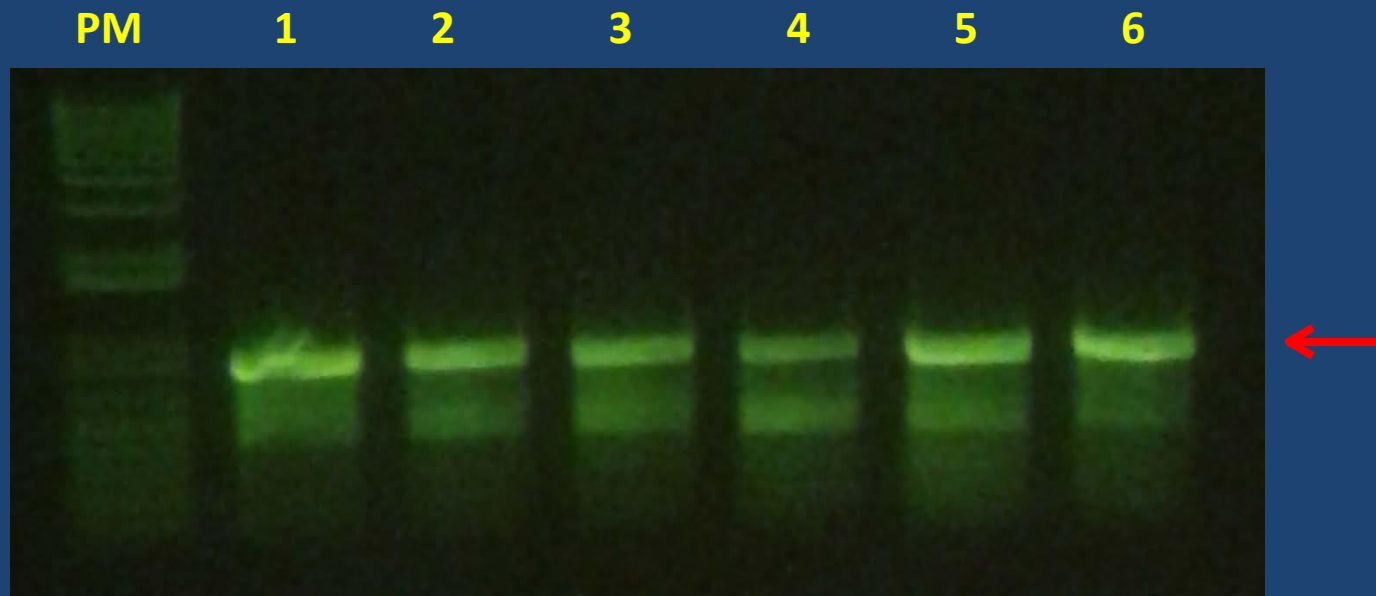
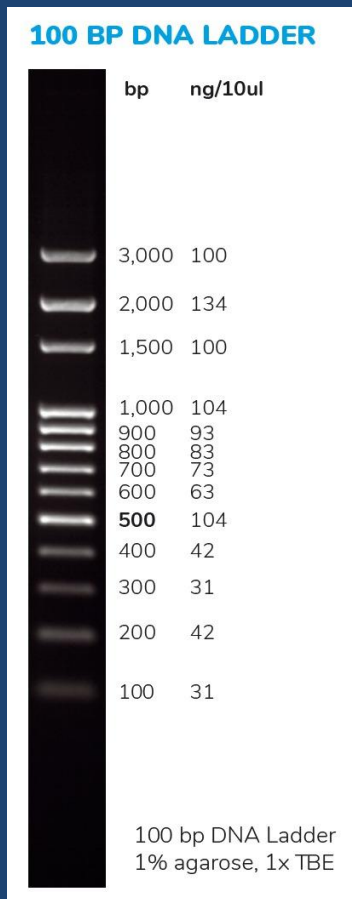


Figura X. Eletroforeses em gel de agarose 1% de PCR do gene ApoB a partir de ghDNA obtido de mucosa oral.

Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; linha 5: amostra # 7; linha 6: amostra # 8. Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante SYBR Green (Lifetechnologies, USA). Seta vermelha indica a amostra de DNA.



Solis BIODYNE cat 07-11-00050

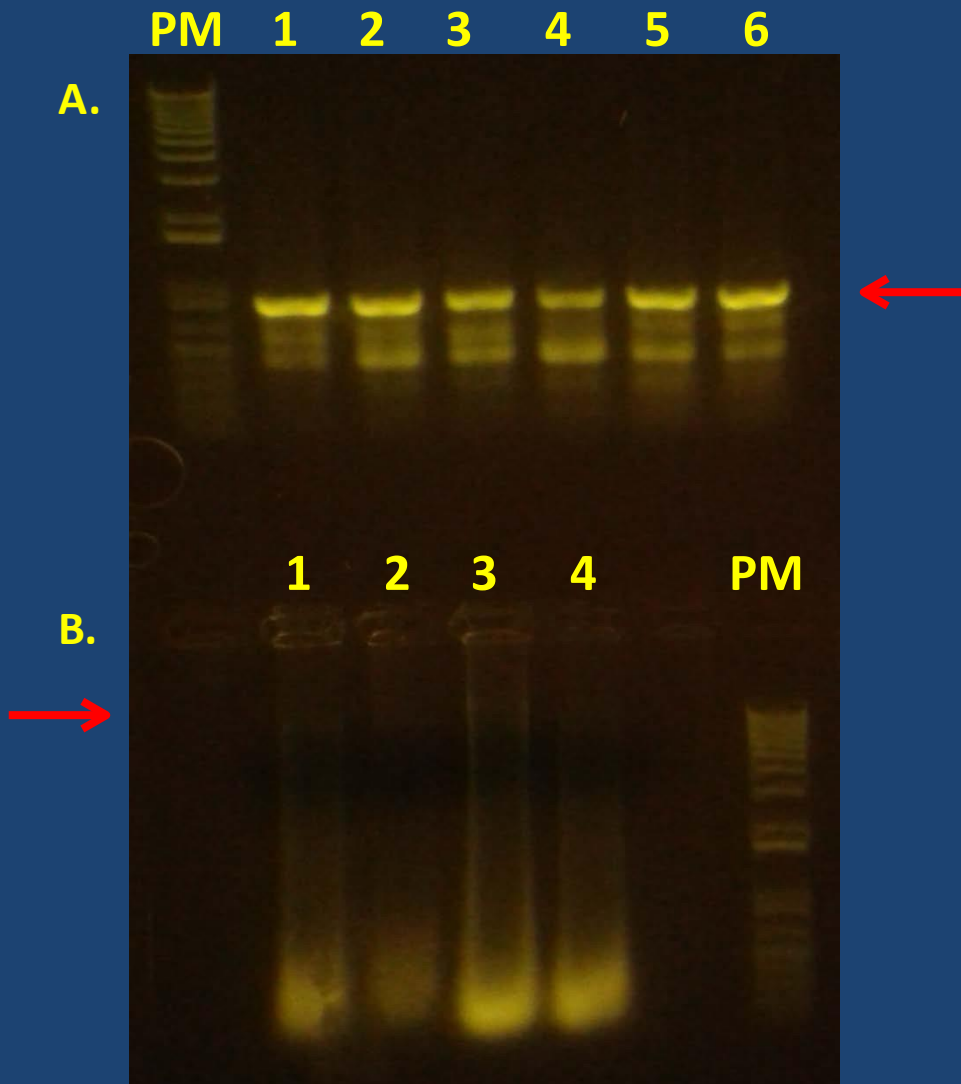


Figura X. Eletroforeses em gel de agarose de hDNA. A. PCR do gene APO a partir de DNA obtido de mucosa oral. Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; linha 5: amostra # 7; linha 6: amostra # 8. Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante SYBR Green (Lifetechnologies, USA). (24/09/2014). PM: Peso Molecular 1 kb DNA ladder. B. ghDNA obtido de mucosa oral. Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante SYBR Green (Lifetechnologies, USA). PM: Peso Molecular 1 kb DNA ladder. 03/10/2014).

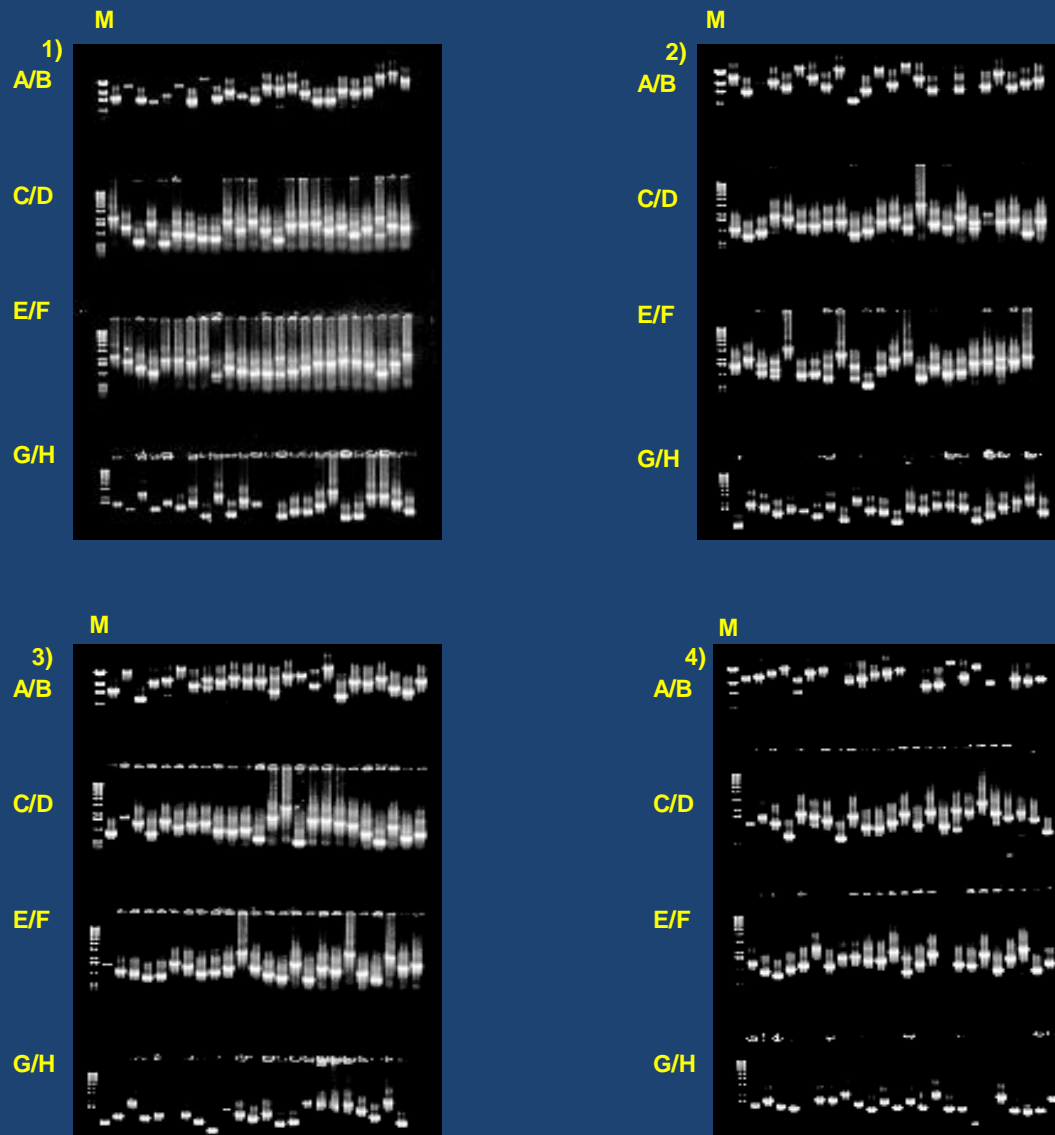
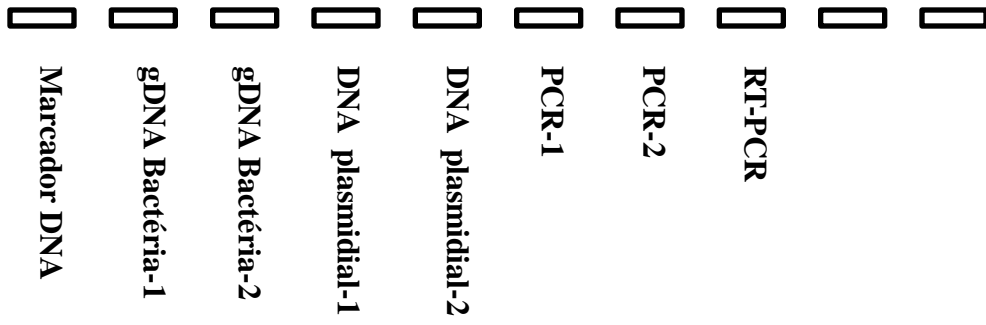


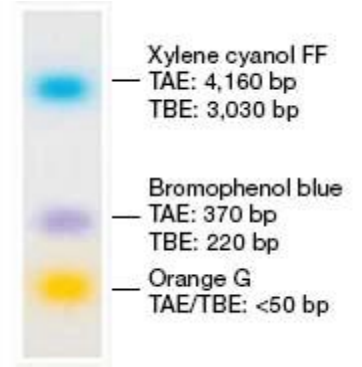
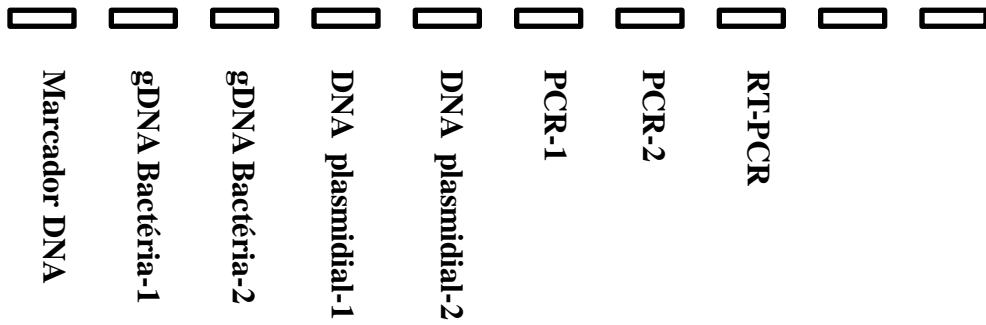
Fig. # 1. Eletroforese em gel de Agarose 0.8%, do produto de PCR (1 μ L). 1)Placa # 1, 2)Placa # 2, 3)Placa # 3, 4)Placa # 4. M: Marker 1 kb DNA leader (GIBCO BRL. USA); A/B, C/D, E/F, G/H: fileiras correspondentes a cada placa.

Electroforeses de DNA

Grupo 1:

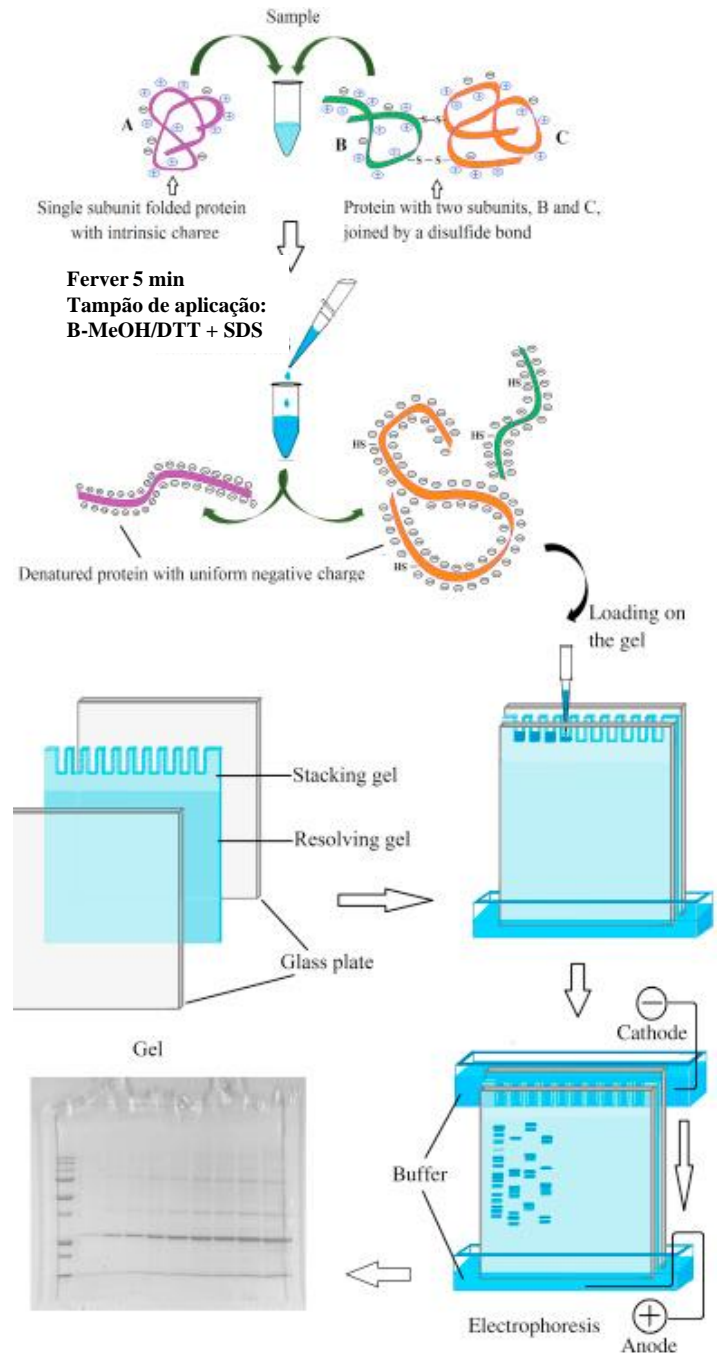


Grupo 2:

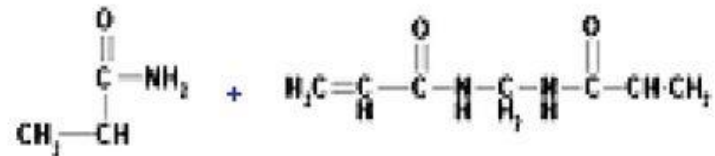
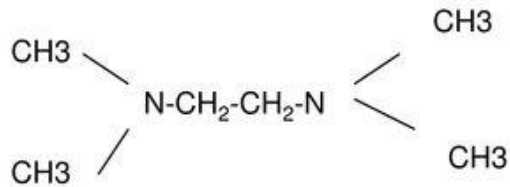


SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE



- O **suporte** mais utilizado para conduzir a eletroforese de proteínas é o gel de poliacrilamida, em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE)

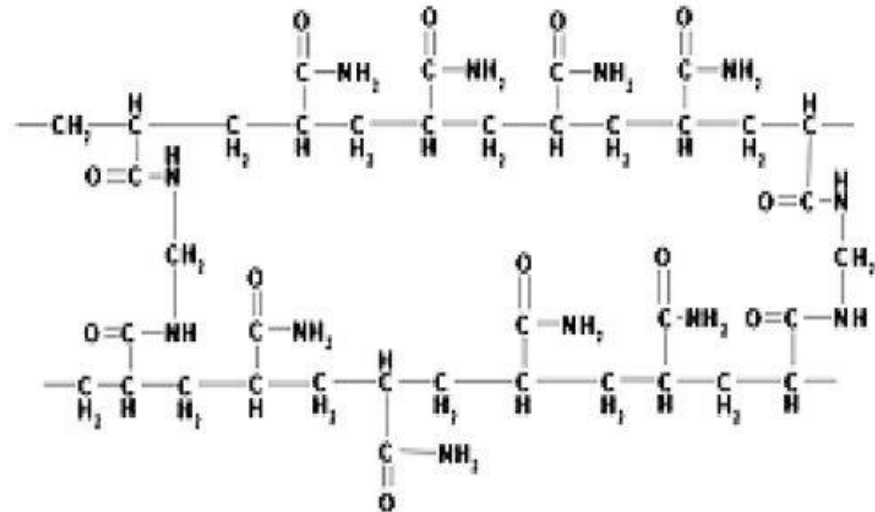


acrilamida

N,N'-metilenobisacrilamida

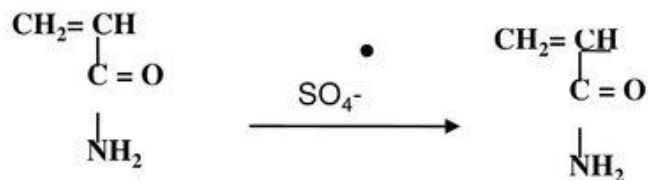


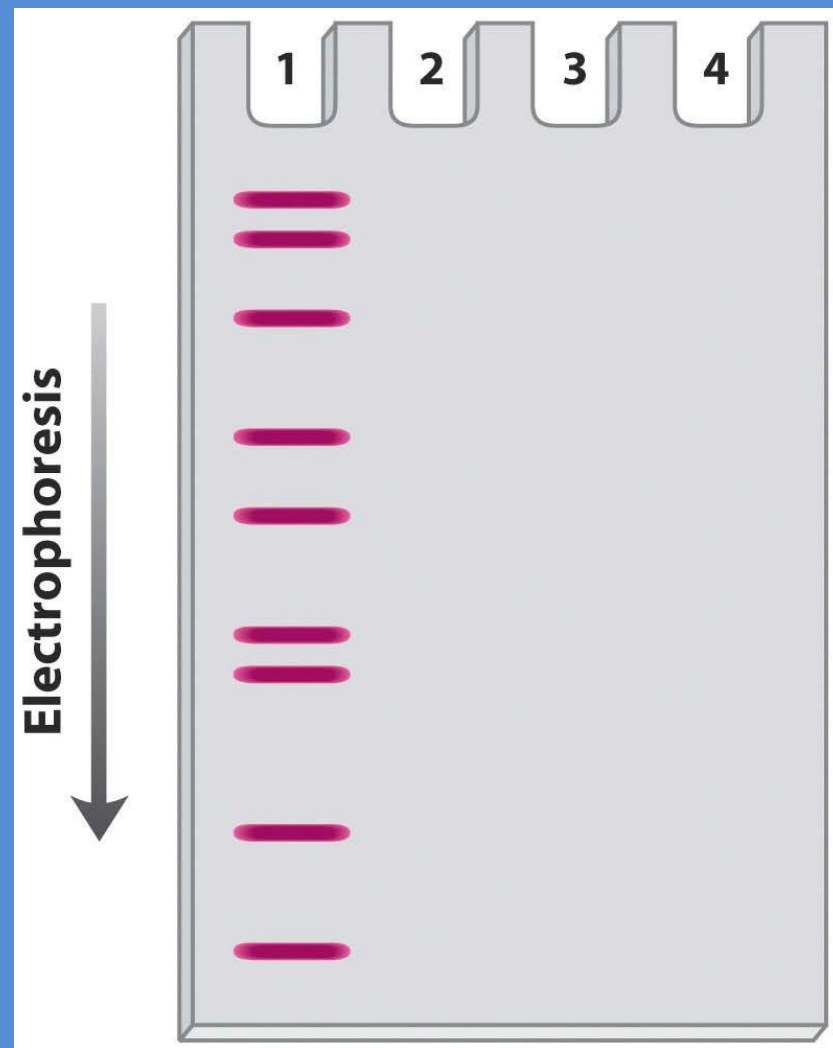
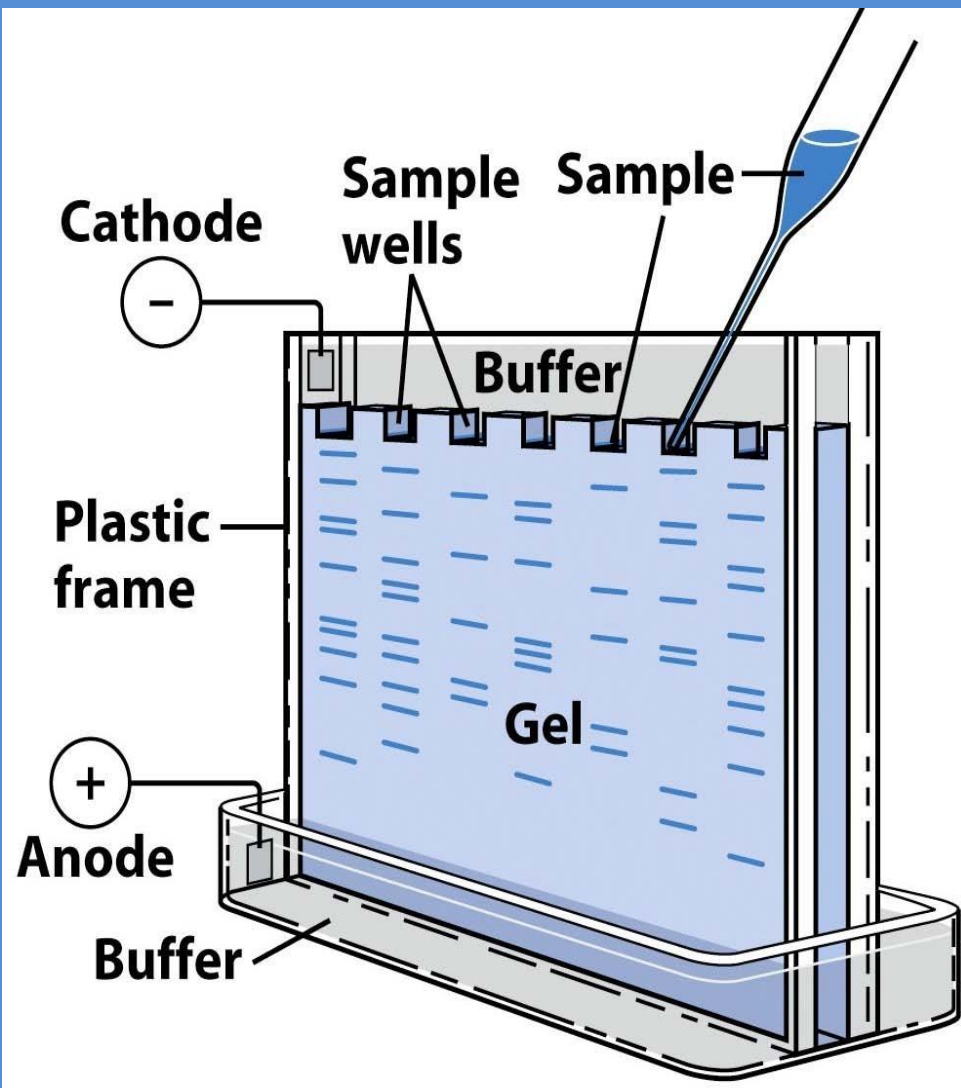
Catalisador
(persulfato de amônio)



poliacrilamida

TEMED - tetrametiletenodiamina





Aula: Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE

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 (15 uL amostra + 15 uL tampão de aplicação). Ferver por 5 minutos, deixar esfriar.
7. Utilizando agulha/ponteira, 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.

Representative picture of Prestained Protein Molecular Weight Marker
 ThermoScientific cat. 26612

Protein	Source
~120	β -galactosidase <i>E.coli</i>
~85	Bovine serum albumin bovine plasma
~50	Ovalbumin chicken egg white
~35	Carbonic anhydrase bovine erythrocytes
~25	β -lactoglobulin bovine milk
~20	Lysozyme chicken egg white

8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

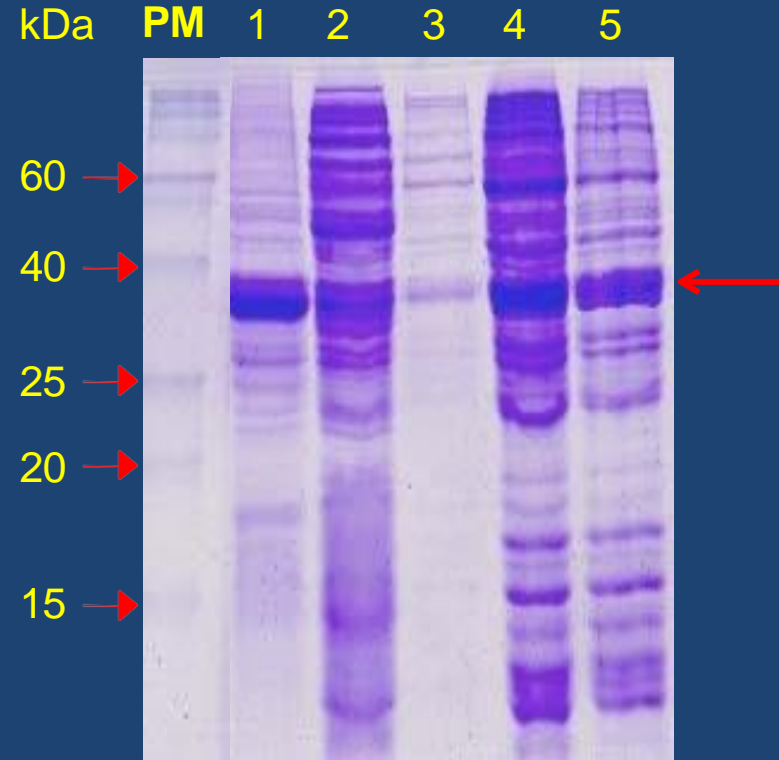


Figura X. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10 μ L); Linha 2 – fração solúvel (10 μ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna 'HiTrap Chelating' carregada com Ni²⁺ (10 μ L). PM: Marcador de peso molecular Benchmark protein (Invitrogen, USA).

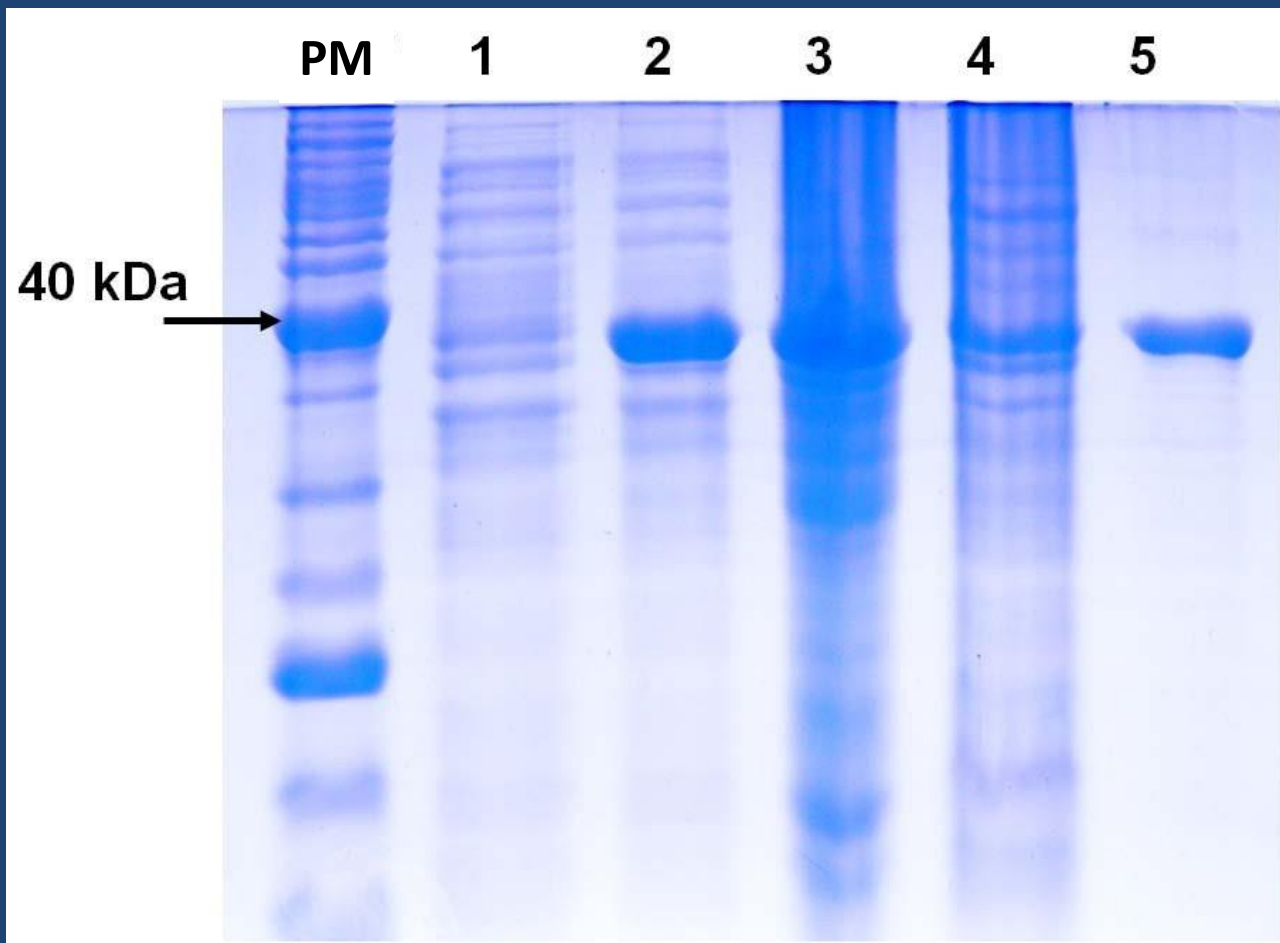
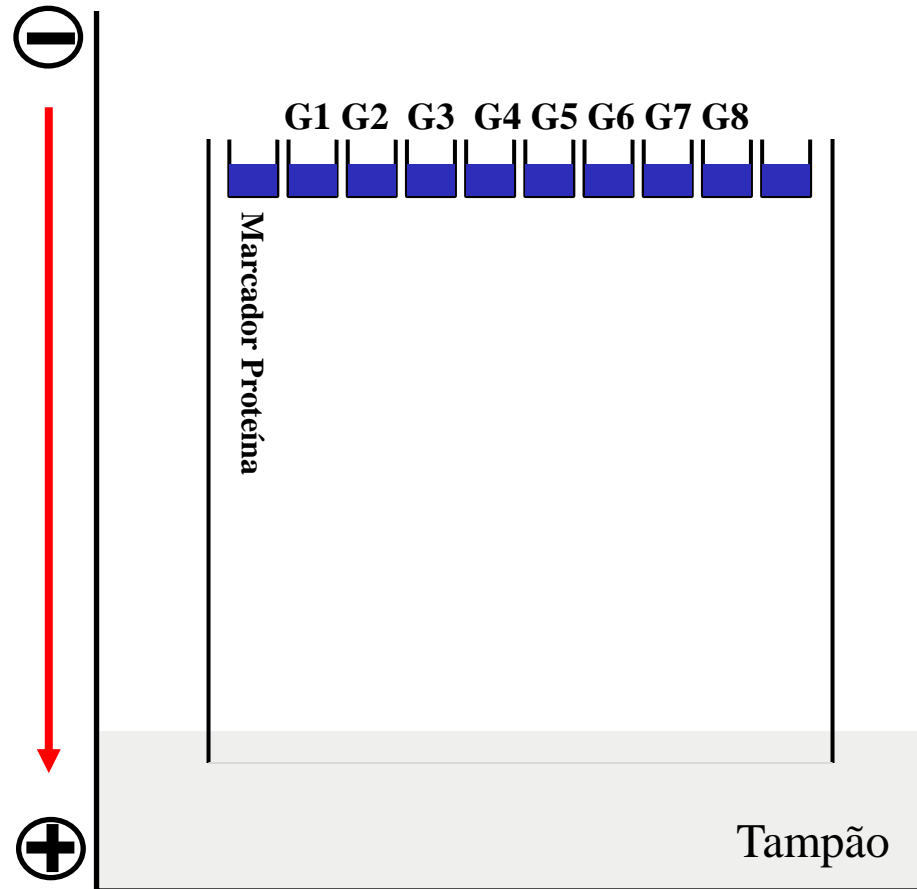


Figura X – Eletroforeses SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína recombinante TrEH2, em *E. coli* BL21. (1) Amostra de 20 μ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20 μ L da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20 μ L do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel); (4) Amostra de 20 μ L do sobrenadante do lisado bacteriano (solúvel); (5) Amostra de 20 μ L das frações coletadas após a purificação. (PM) peso molecular BenchMark protein ladder (Invitrogen).

Eletroforeses de Proteína





Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024