



## **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](mailto:augusto.roldan@usp.br)

Henrique dos Santos Hernandes - [hernandesrique@usp.br](mailto:hernandesrique@usp.br)

**Servidores não-docentes:**

Tec. Pedro Manoel dos Santos - [pedroms@usp.br](mailto:pedroms@usp.br)

**Créditos: 4**

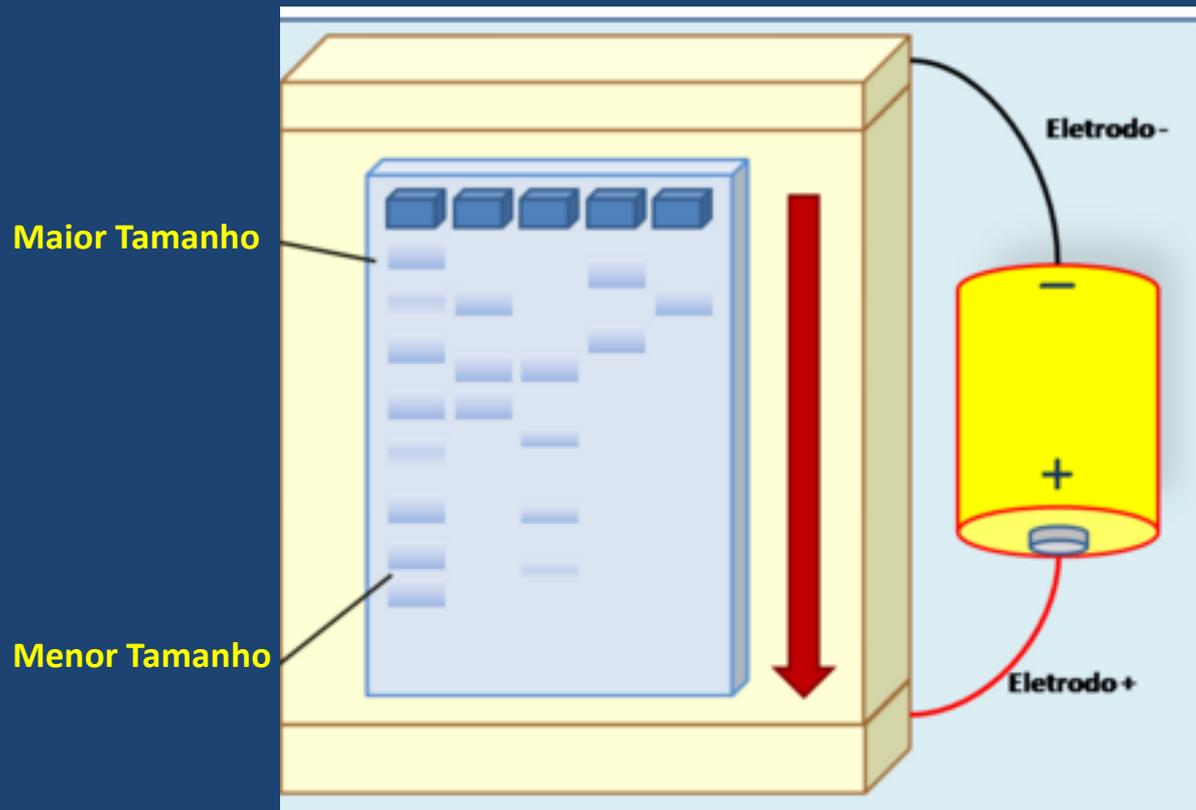
**Período:** Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

# **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

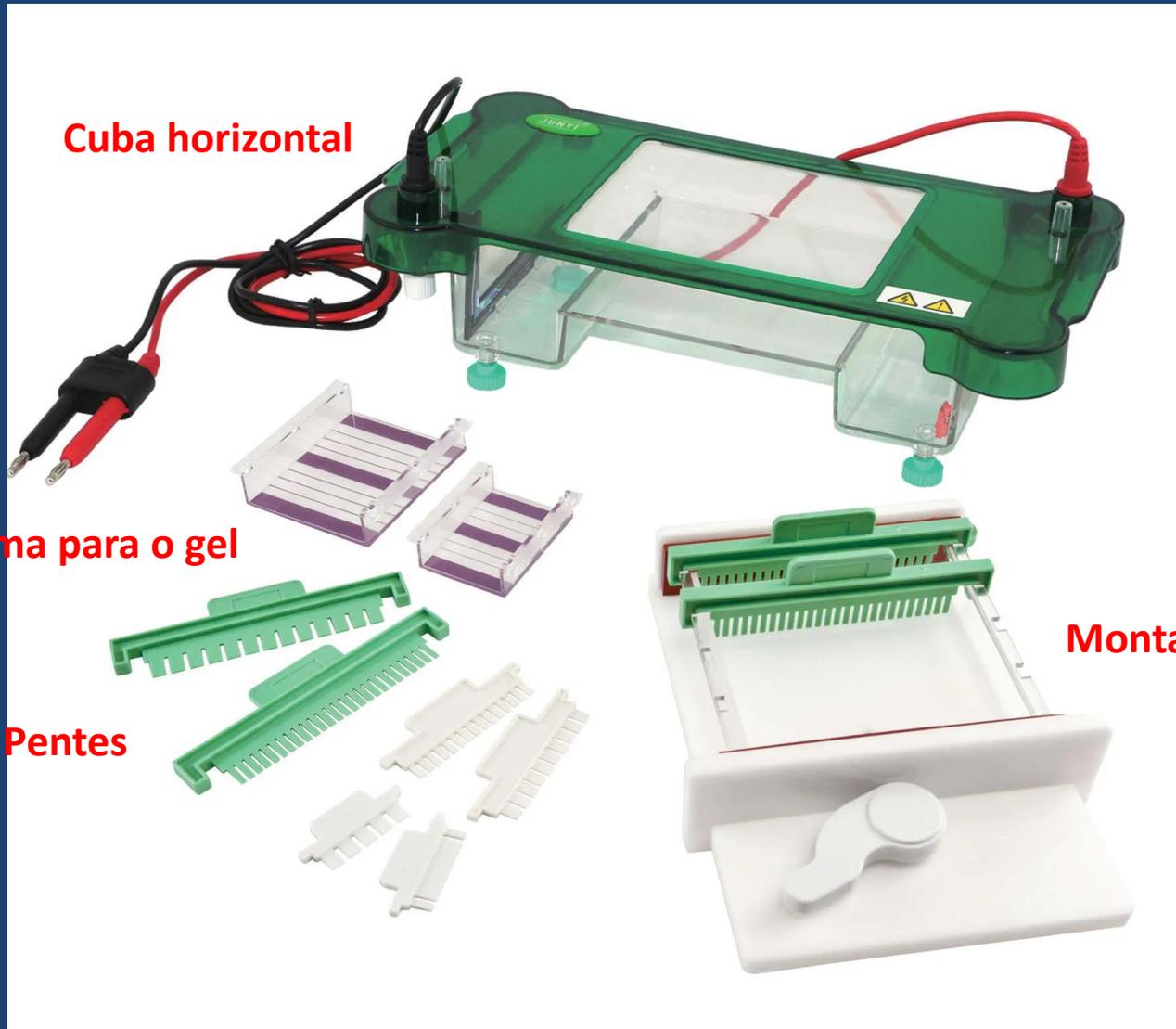
### Para separar proteínas e peptídeos

- 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

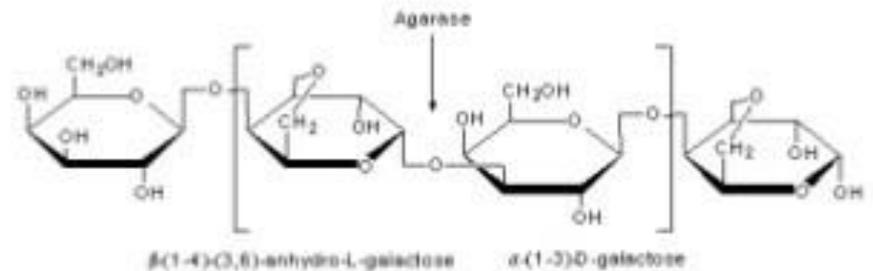
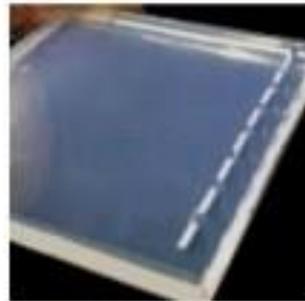
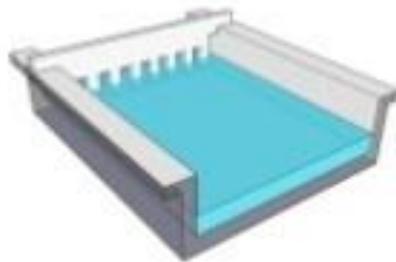
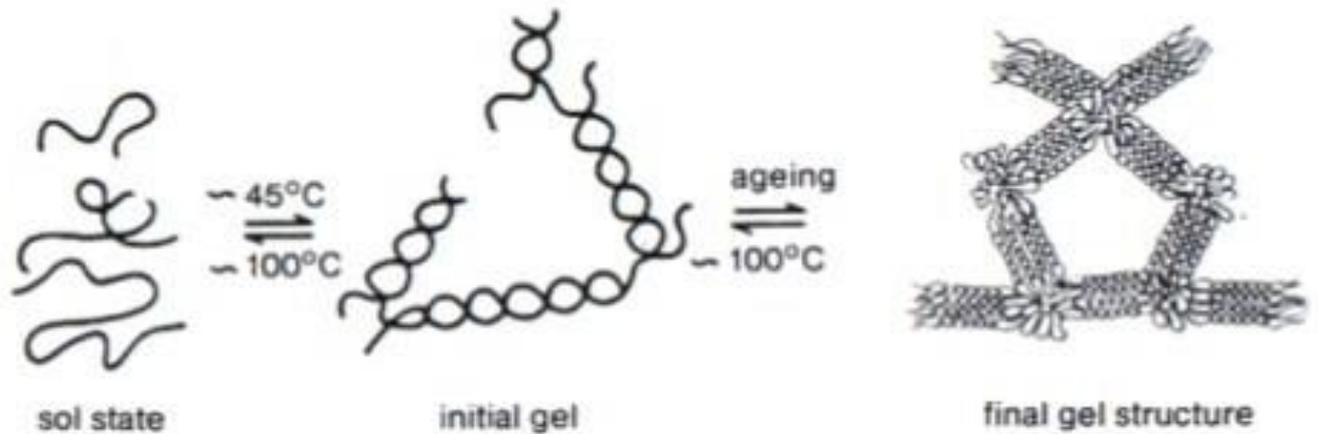
Pentes

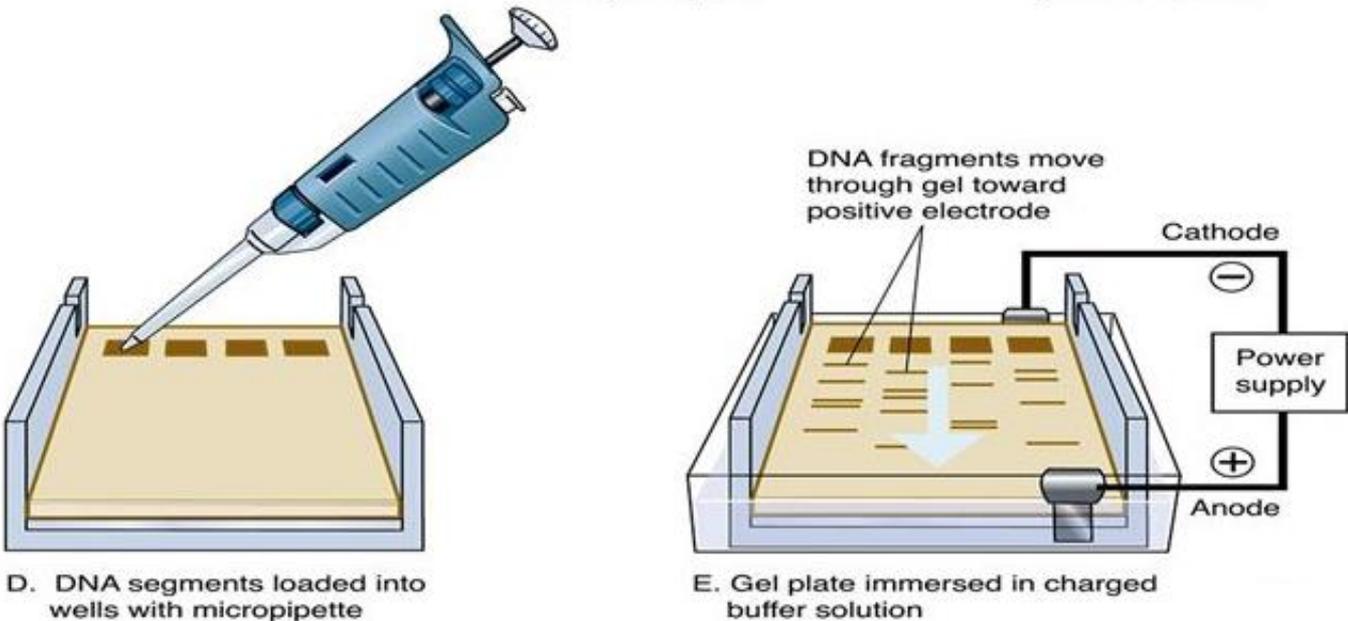
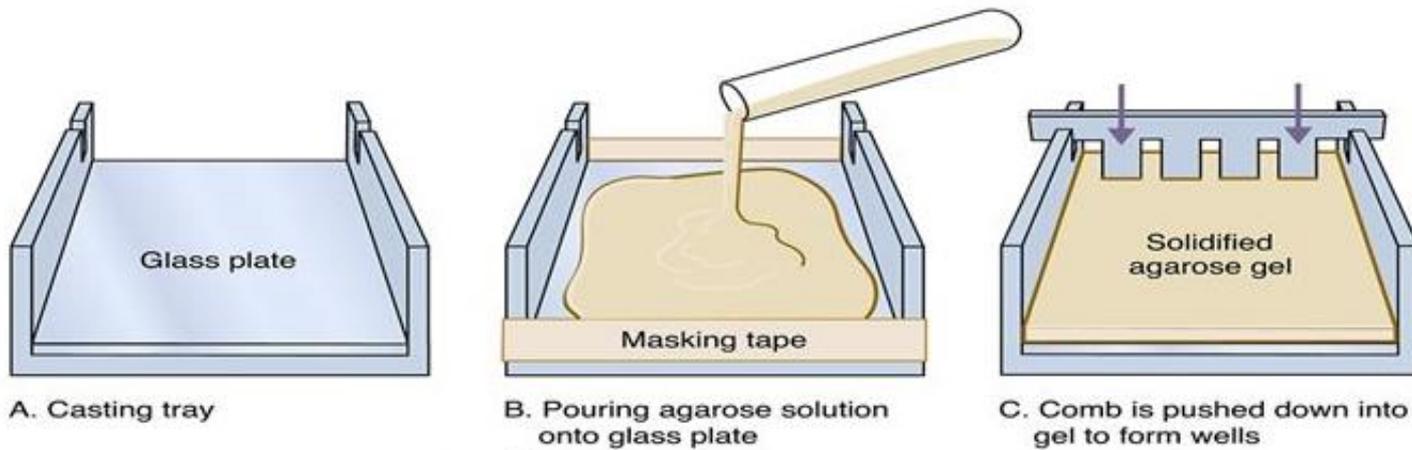
Montagem

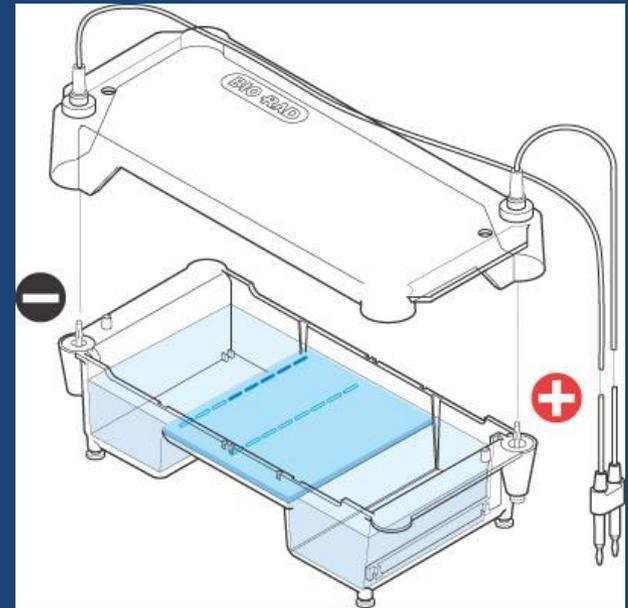
Agarose = polímero polissacarídico (D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopirranose)

Agarose gelifica - não há polimerização!

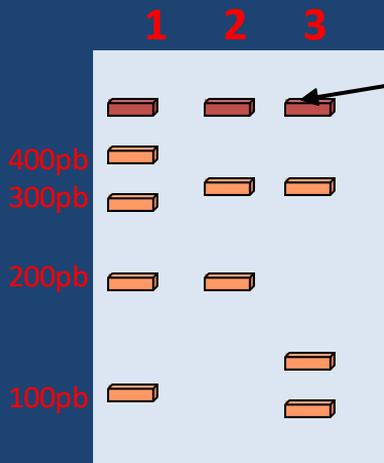
% de agarose no gel varia com a amostra em análise



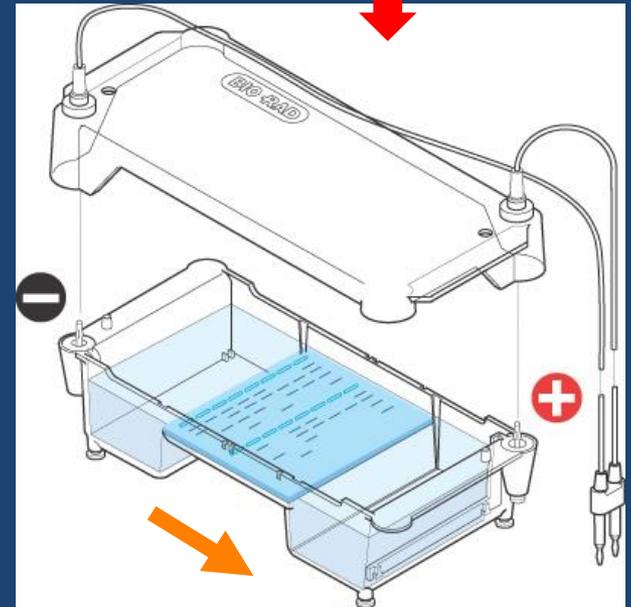




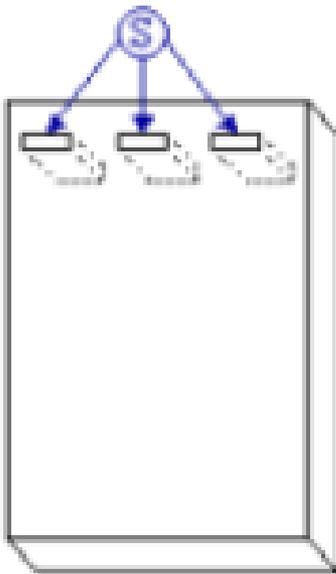
Poços para aplicação das amostras de DNA



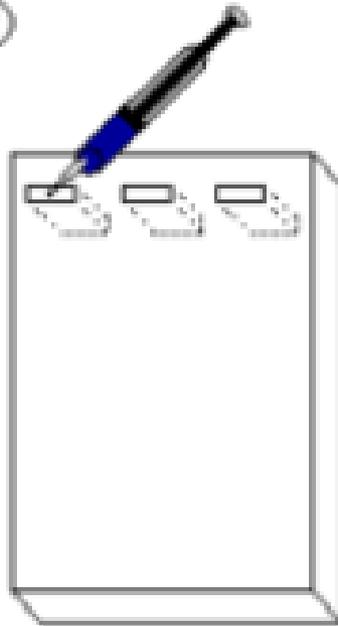
Fragmentos de DNA separados pelo tamanho em pares de bases (pb)



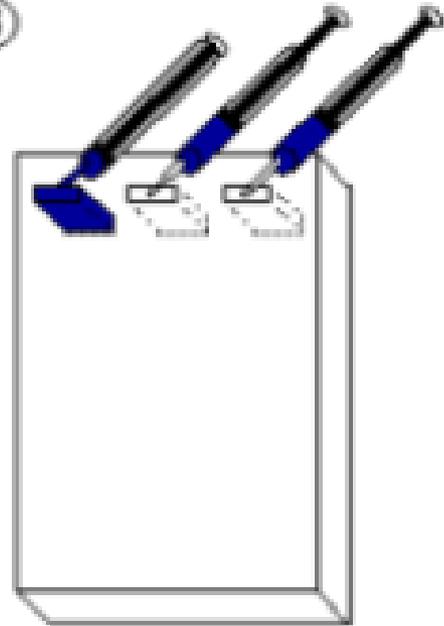
①



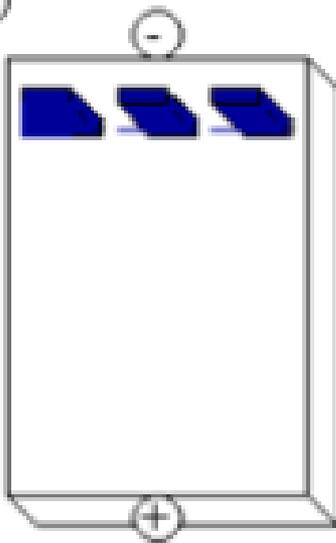
②



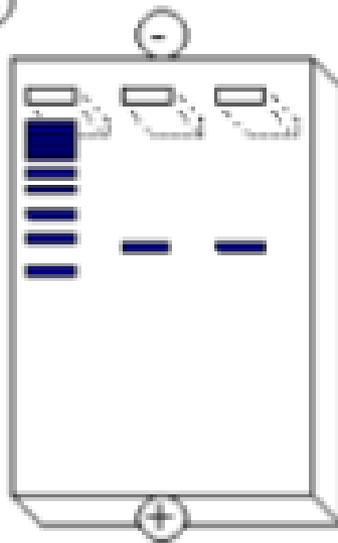
③



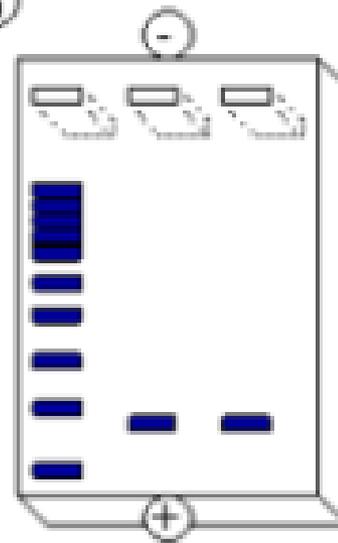
④



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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de DNA e 3  $\mu\text{L}$  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

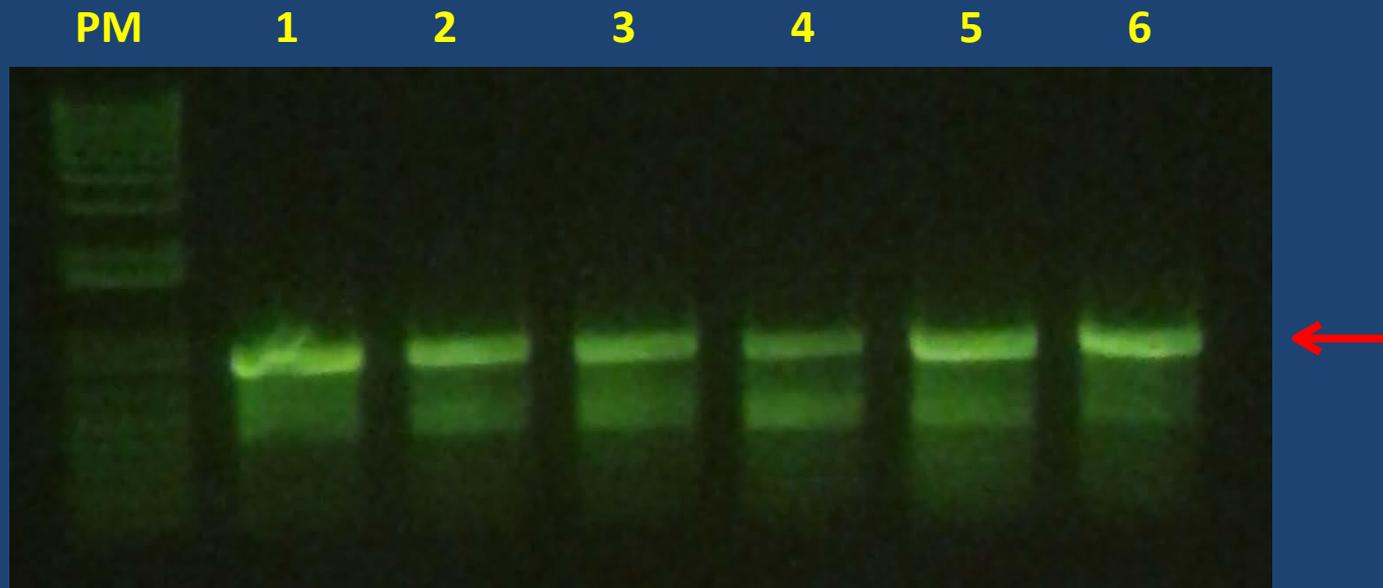
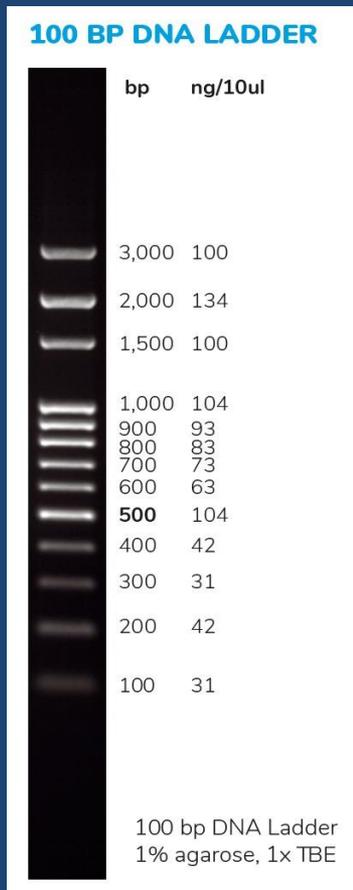
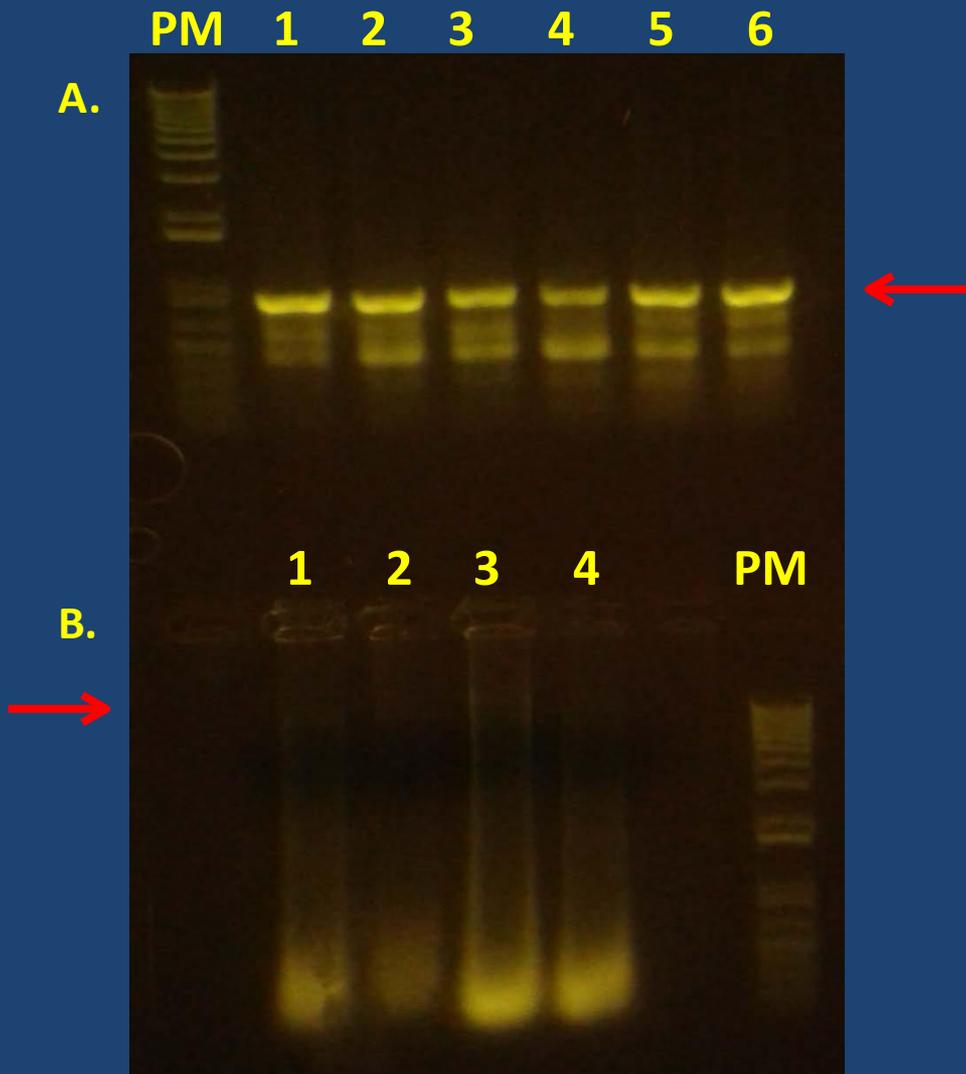


Figura X. Eletroforeses em gel de agarose 1% de PCR do gene ApoB a partir de ghDNA obtido de mucosa oral.

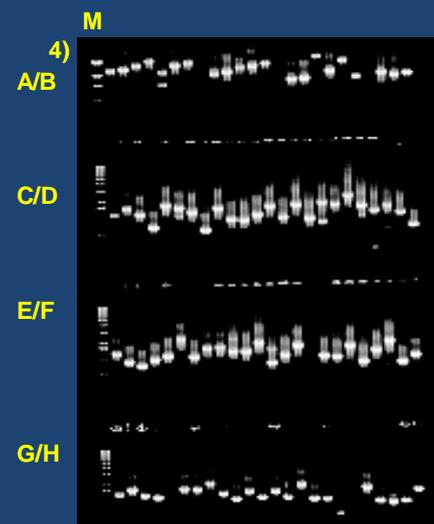
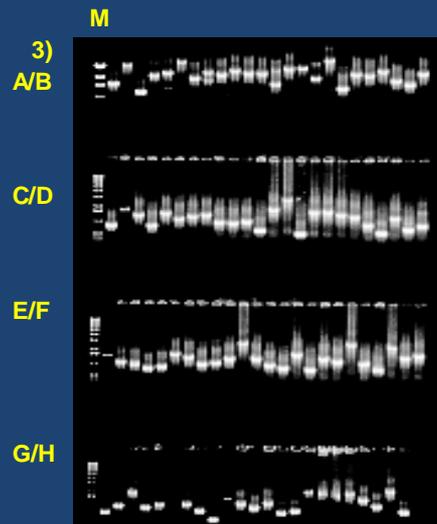
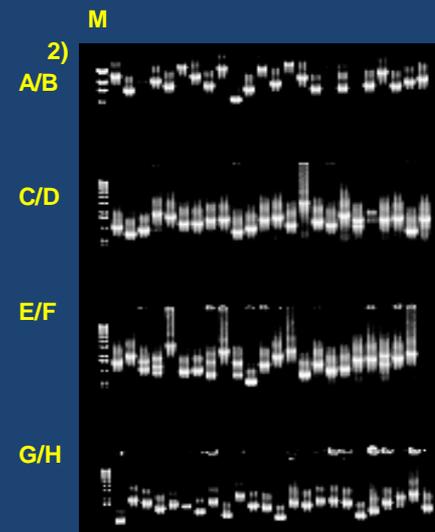
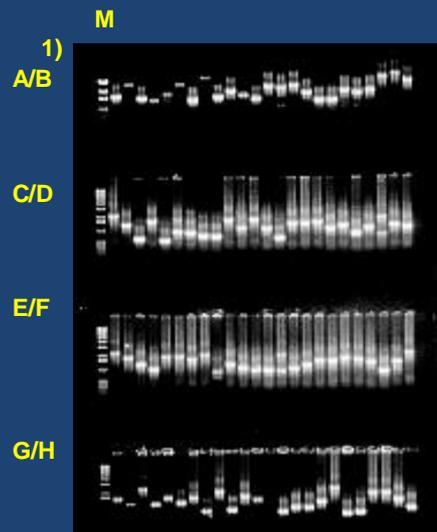
Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; linha 5: amostra # 7; linha 6: amostra # 8. Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante SYBR Green (Lifetechnologies, USA). Seta vermelha indica a amostra de DNA.



Solis BIODYNE cat 07-11-00050



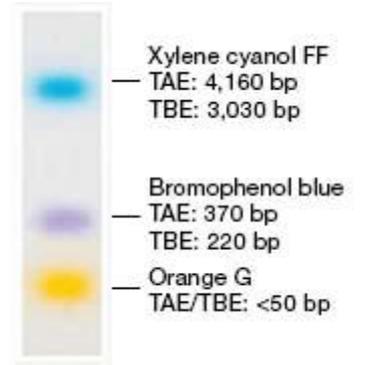
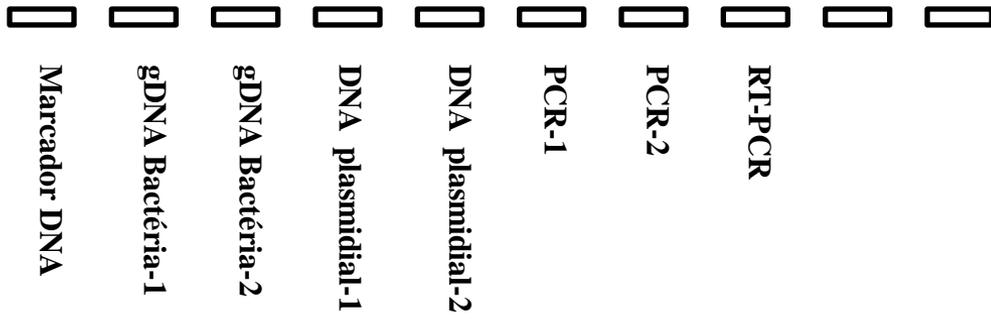
**Figura X. Eletroforeses em gel de agarose de hDNA. A. PCR do gene APO a partir de DNA obtido de mucosa oral. Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; linha 5: amostra # 7; linha 6: amostra # 8. Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante 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).**



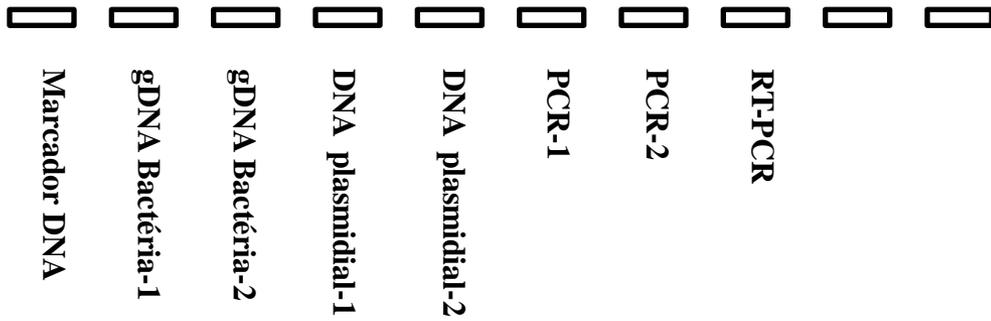
**Fig. # 1. Eletroforese em gel de Agarose 0.8%, do produto de PCR (1  $\mu$ L). 1)Placa # 1, 2)Placa # 2, 3)Placa # 3, 4)Placa # 4. M: Marker 1 kb DNA leader (GIBCO BRL. USA); A/B, C/D, E/F, G/H: fileiras correspondentes a cada placa.**

# Electroforeses de DNA

Grupo 1:

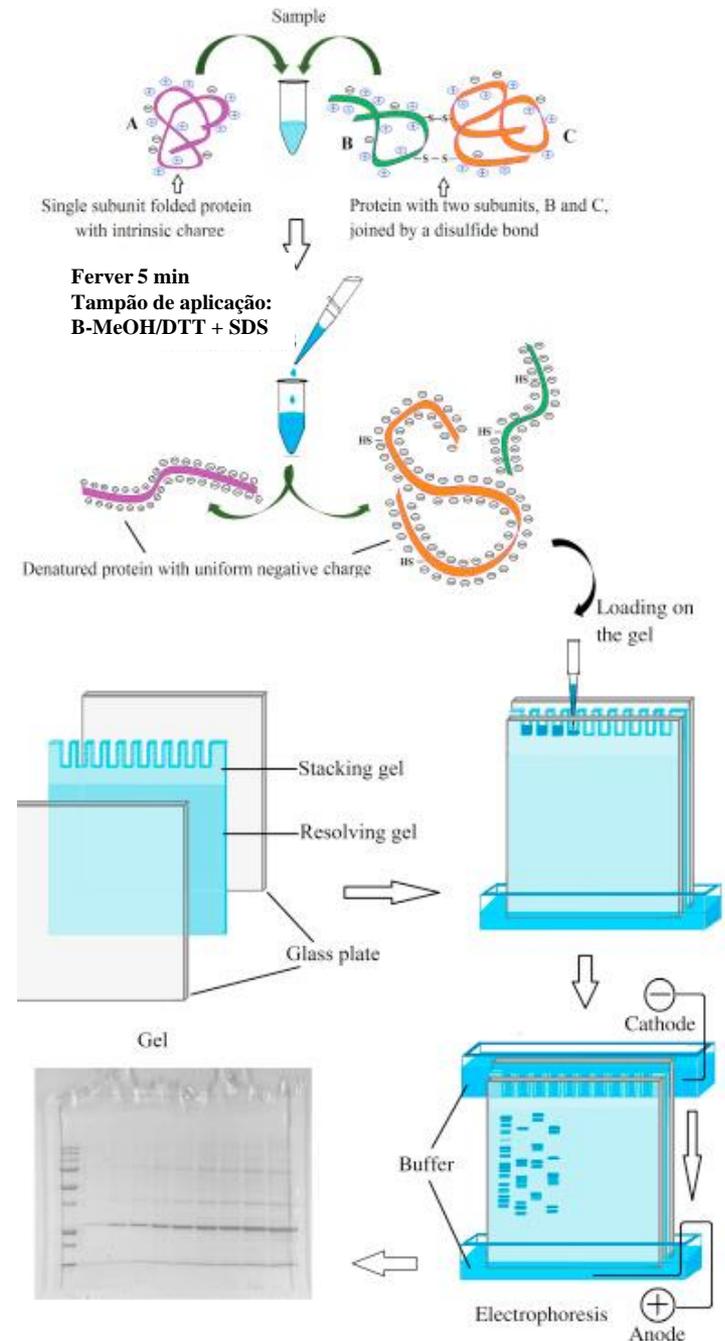


Grupo 2:

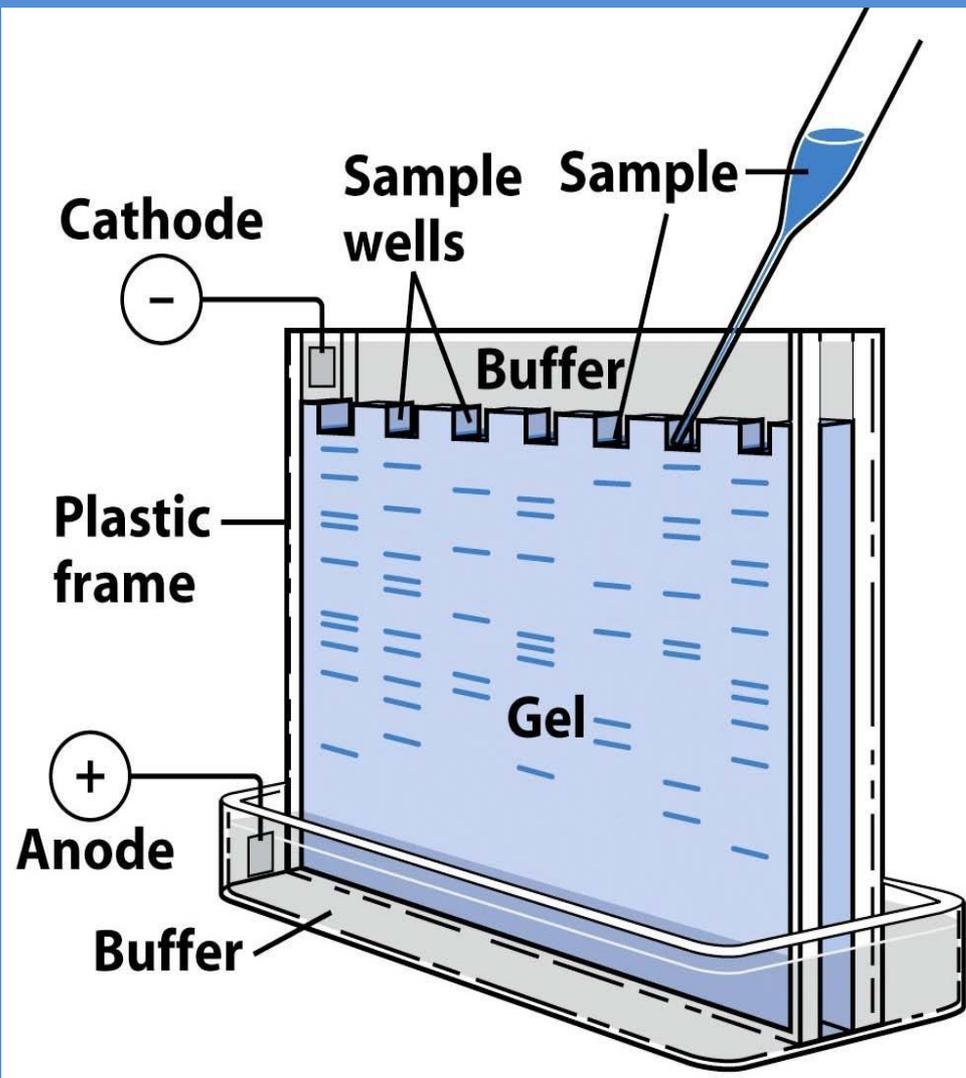


# SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

## Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE







## 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	$\beta$ -galactosidase <i>E.coli</i>
~85	Bovine serum albumin bovine plasma
~50	Ovalbumin chicken egg white
~35	Carbonic anhydrase bovine erythrocytes
~25	$\beta$ -lactoglobulin bovine milk
~20	Lysozyme chicken egg white

8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

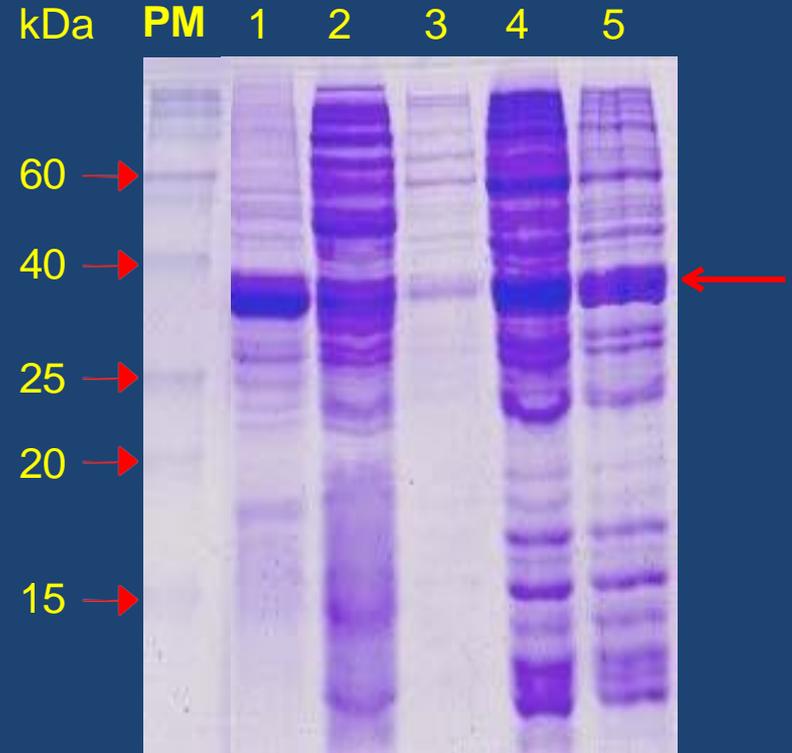
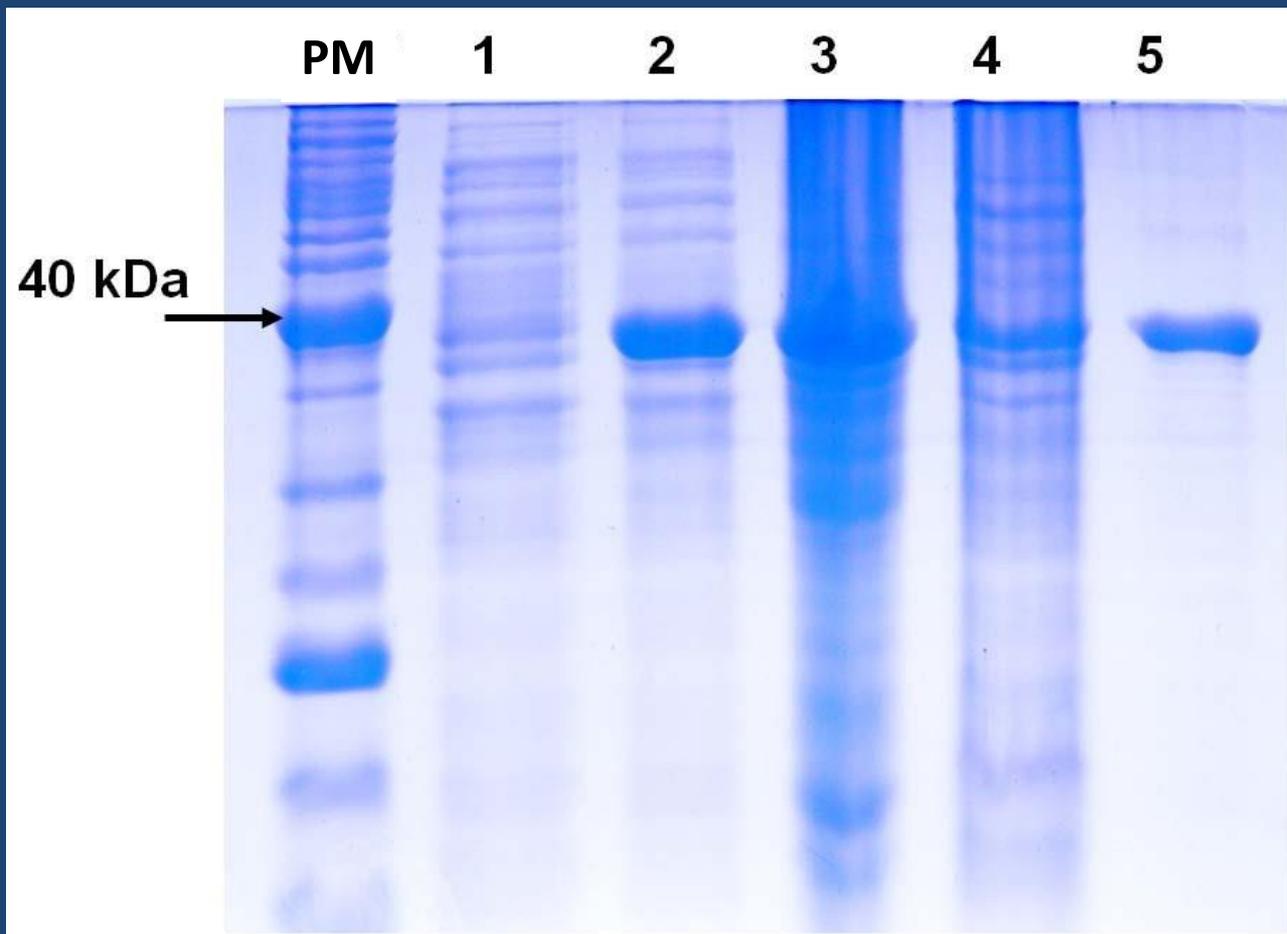
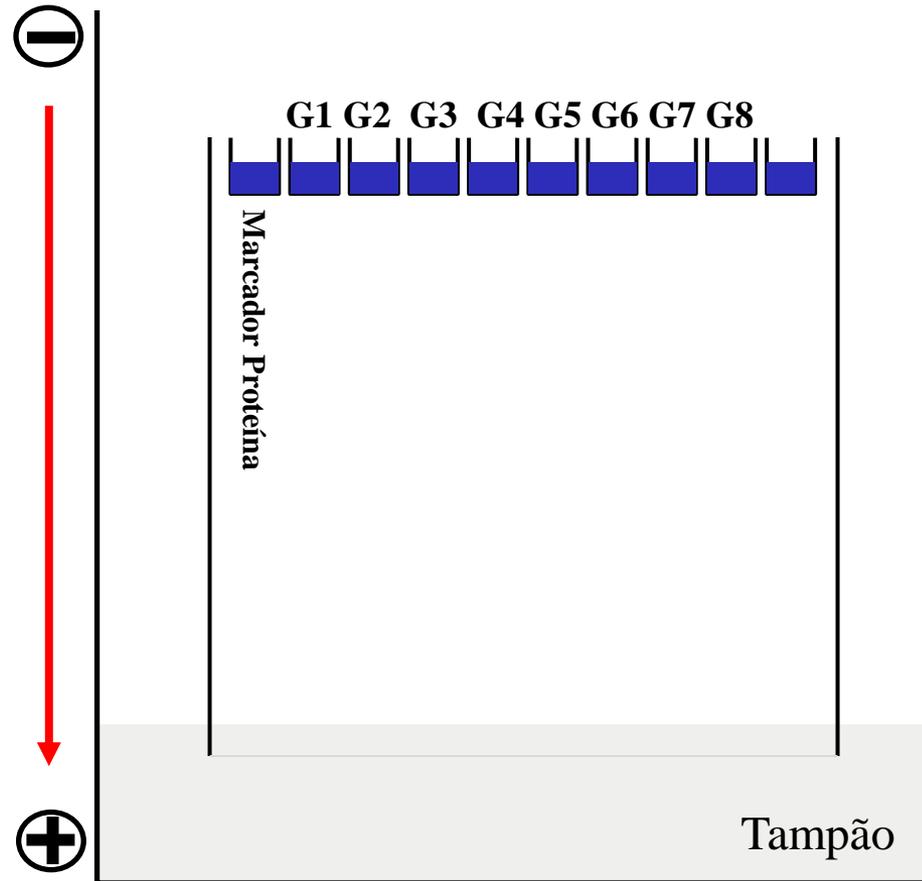


Figura X. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10  $\mu$ L); Linha 2 – fração solúvel (10  $\mu$ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna 'HiTrap Chelating' carregada com Ni<sup>2+</sup> (10  $\mu$ 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  $\mu$ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20  $\mu$ L da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20  $\mu$ L do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel); (4) Amostra de 20  $\mu$ L do sobrenadante do lisado bacteriano (solúvel); (5) Amostra de 20  $\mu$ 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**