



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

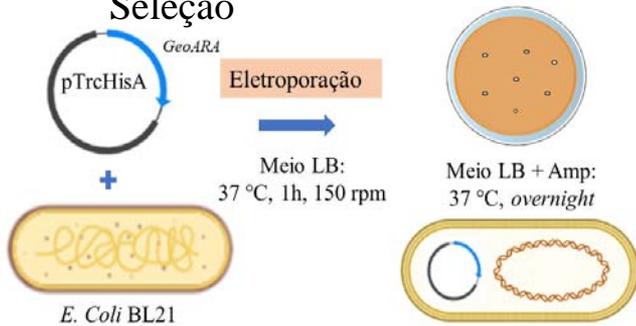
USP - 2024

Atividade de Proteína recombinante

- 1. Atividade Enzima Catalase (CAT)**
- 2. Determinação de atividade enzimática por Zimograma - Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**
- 3. Aplicação em Biotecnologia – Marcador de massa molecular de Proteínas**

Expressão, purificação e atividade de Proteína recombinante

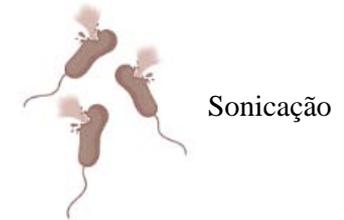
1 Transformação e Seleção



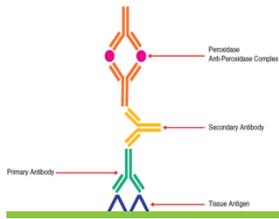
2 Produção da Proteína



3 Lise celular



6 Análise de atividade

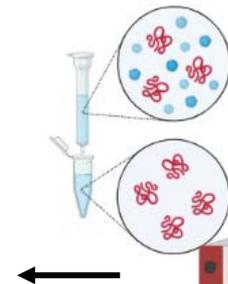
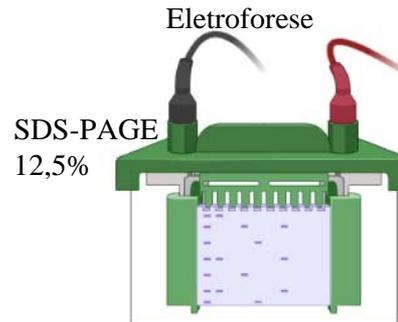


Western Blot



Enzimática

5 Análise da purificação

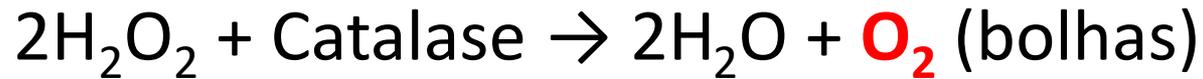


4 Purificação

Cromatografia por afinidade

- Ligação
- Lavagem
- Eluição

1. Atividade Enzima Catalase



Procedimento:

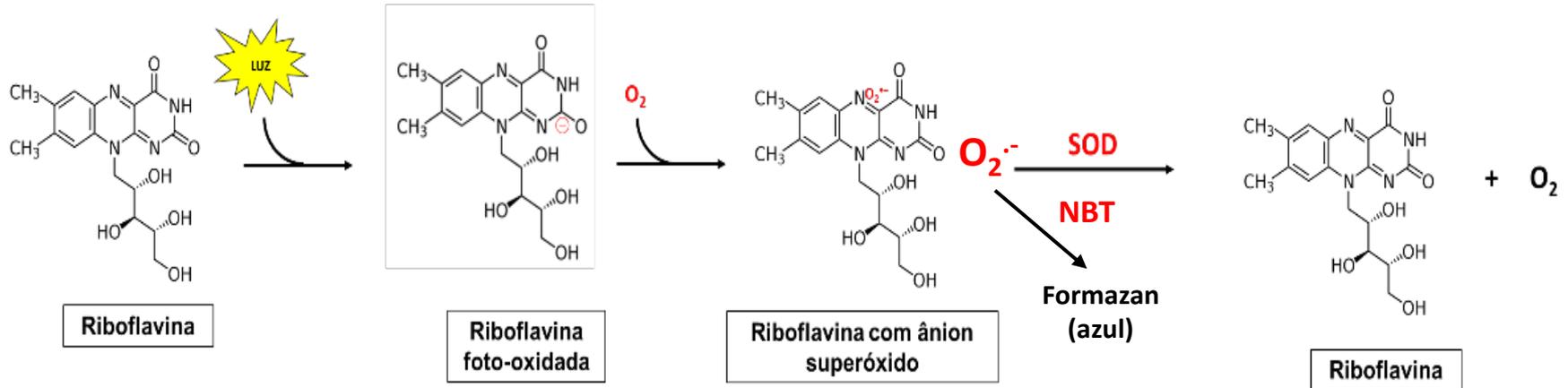
1. Em uma lâmina de vidro, aplique 25 uL de uma solução 3% de H_2O_2 .
2. Adicione 25 uL da enzima catalase e misture.
3. Visualize a formação de bolhas, no tempo máximo de 3 minutos.
4. Registrar o resultado
5. Lave a lâmina com etanol 70% e deixe secar a temperatura ambiente.

1. Atividade Enzima Catalase



2. Determinação de atividade enzimática em gel não desnaturante - Zimograma

Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

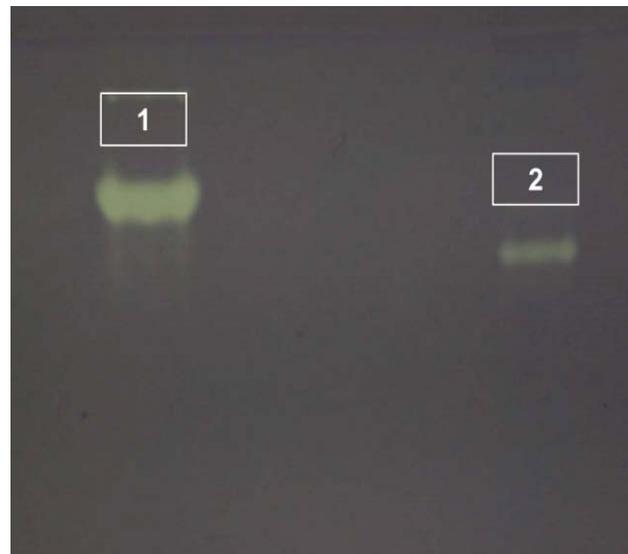


Amostra

- Não SDS
- Não β -MeOH
- Não ferve

Gel e Tampão

- Não SDS



Determinação de atividade enzimática em gel não desnaturante - Zimograma

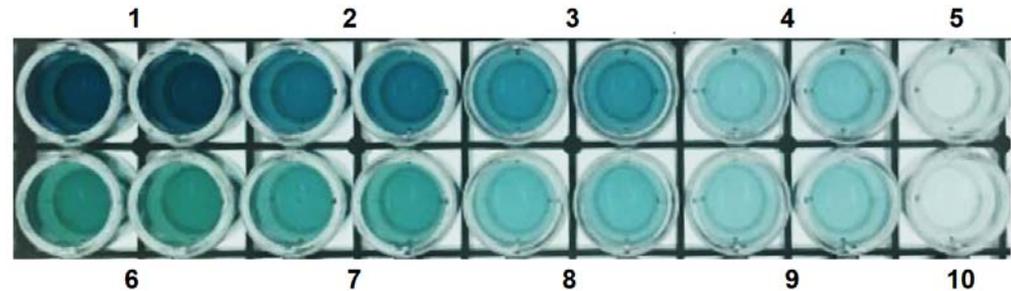
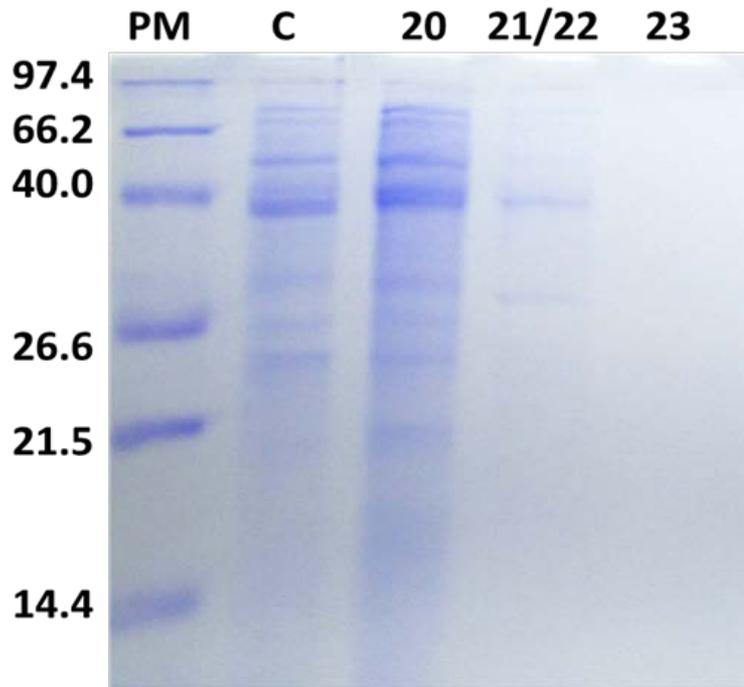
Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Procedimento:

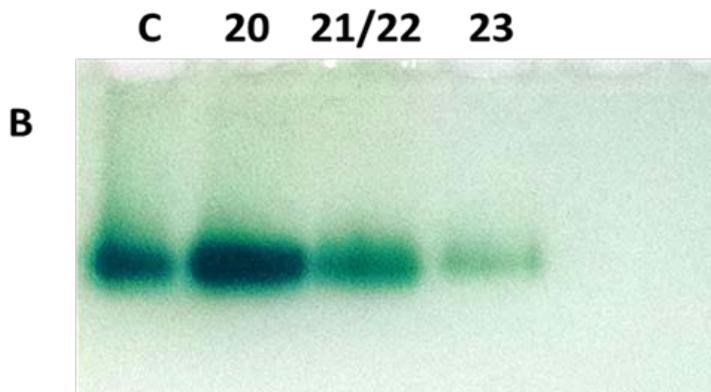
1. Preparar sistema PAGE não desnaturante 15% e tampão de corrida não desnaturante (Trizma base 3,02 g/glicina 14,4 g por litro).
2. Aplicar 50 μ L de solução de enzima SOD em tampão de amostra não desnaturante (glicerol 87%; azul de bromofenol 0,1%; tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8).
3. Separar as proteínas por eletroforese a 40 V, na temperatura de 16 °C, durante 12 horas.
4. Retirar o gel e submergir em solução A: Nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,025%, mais riboflavina 0,010%. Manter no escuro, sob agitação suave durante 30 minutos.
5. Transferir o gel para solução B: contendo TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 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.

Identificação de enzimas Oxidases

Substrato: ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

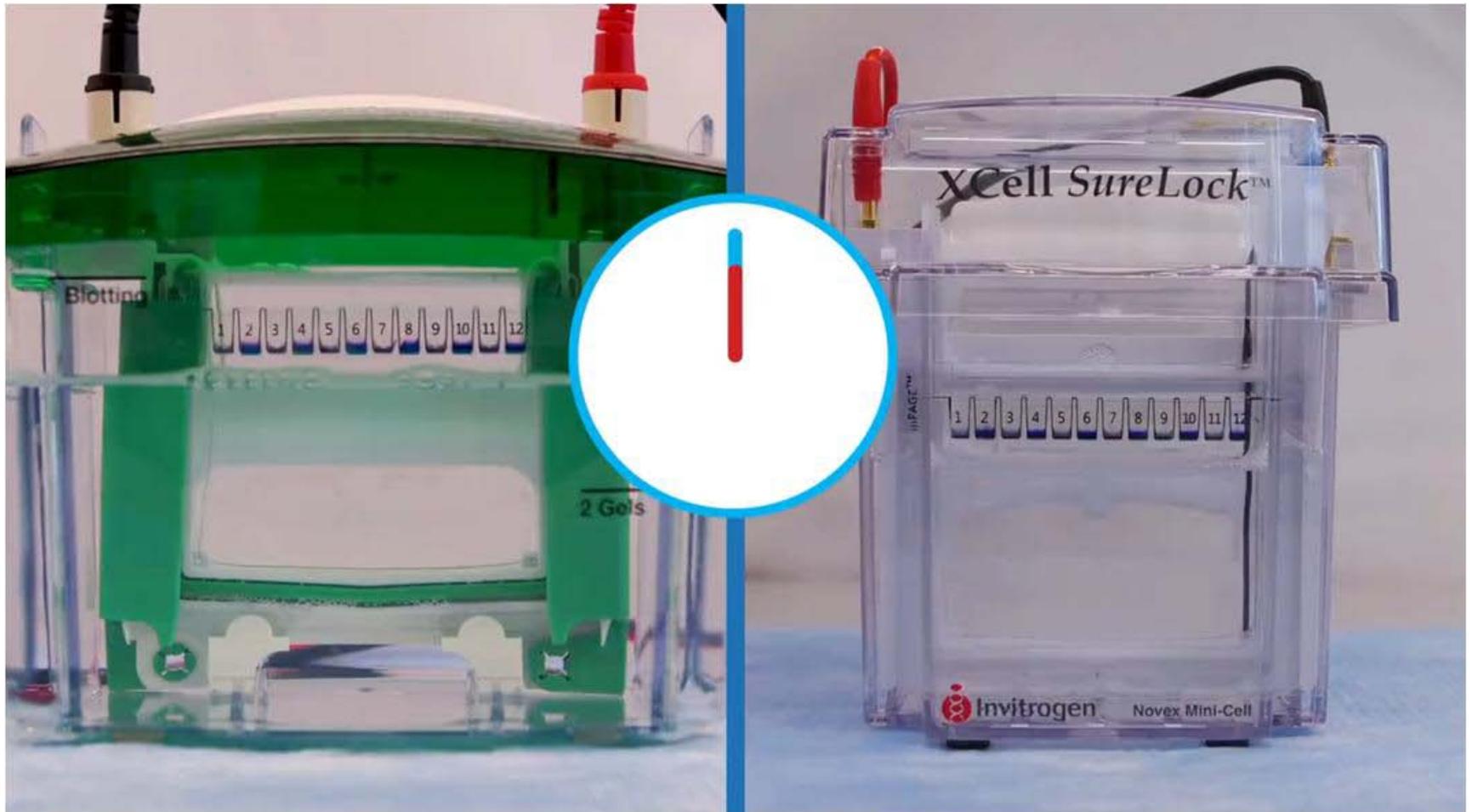


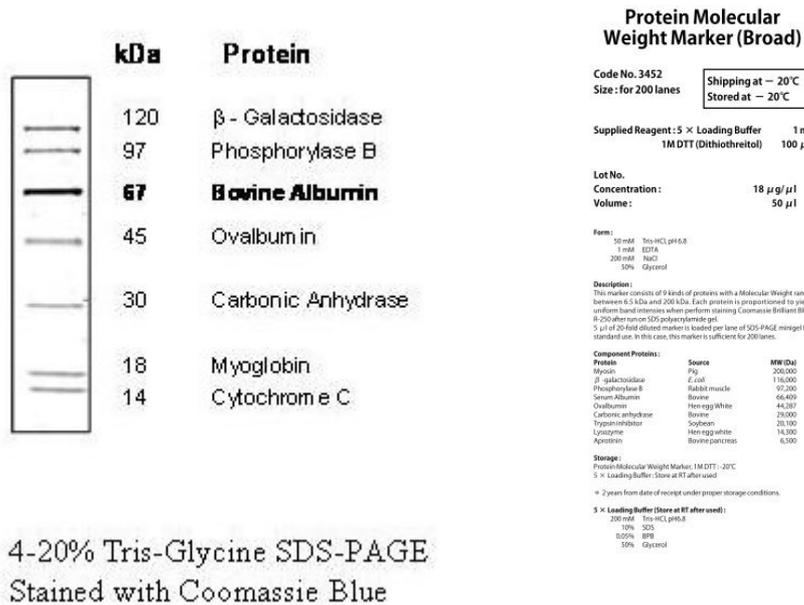
Determinação da atividade enzimática com diferentes concentrações de enzima



Atividade 3. Atividade Biotecnologia

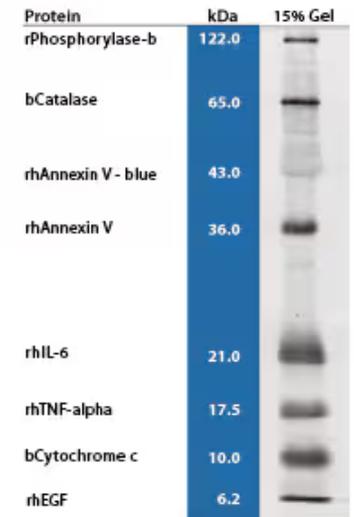
Preparação de Marcador de massa molecular de Proteínas





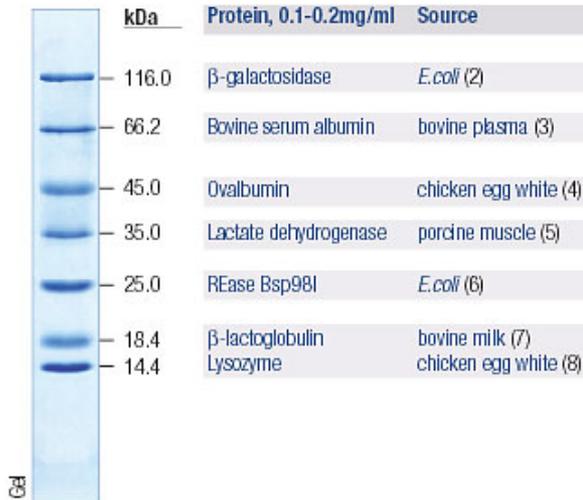
4-20% Tris-Glycine SDS-PAGE
Stained with Coomassie Blue

BIOTINYLATED MOLECULAR WEIGHT MARKER



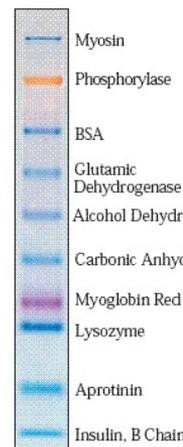
R&D Systems Biotinylated Molecular Weight Marker, Catalog # MW001.

*Calibration based on mass spectrometry.



12% Tris-glycine SDS-PAGE
Staining with PageBlue™ Protein Staining Solution (#R0571)

Protein

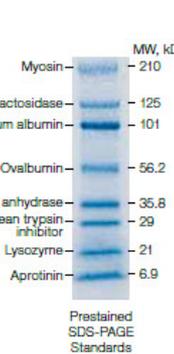


NuPAGE® Novex
Bis-Tris 4-12% Gel

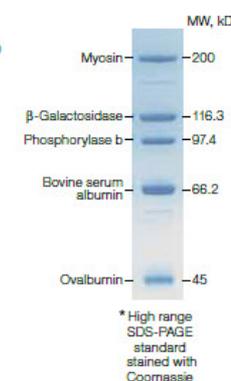
Approximate Molecular Weights (kDa)

Protein	Tris-Glycine	Tricine	Tricine	Tricine	Tricine
Myosin	250	210			
Phosphorylase	148	105			
BSA	98	78			
Glutamic Dehydrogenase	64	55			
Alcohol Dehydrogenase	50	45			
Carbonic Anhydrase	36	34			
Myoglobin Red	22	17			
Lysozyme	16	16			
Aprotinin	6	7			
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

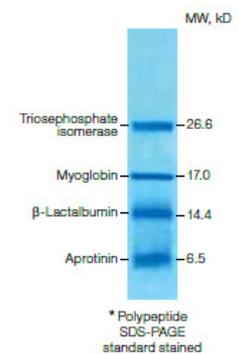
©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.



Prestained
SDS-PAGE
Standards



* High range
SDS-PAGE
standard
stained with
Coomassie



* Polypeptide
SDS-PAGE
standard stained
with Coomassie
Brilliant Blue
G-250 stain

IM-1008F 072602

Atividade 3. Atividade Biotecnologia

Preparação de Marcador de massa molecular de Proteínas

Marcadores de massa molecular de proteínas, às vezes chamados de padrões de proteínas ou marcadores de proteínas, são usados para estimar a massa molecular de proteínas de interesse e monitorar o progresso da separação eletroforética ou transferência em western blot.

Os marcadores de proteína não corados, de modo geral, consistem em uma mistura de proteínas nativas ou recombinantes purificadas de pesos moleculares definidos. Visualizar sua localização em um gel ou membrana requer uma etapa de coloração.

Os marcadores de proteínas pré-corados permitem o fácil rastreamento da separação eletroforética e eficiência de transferência. Padrões individuais de proteínas também estão disponíveis para aplicações de eletroforese de proteínas, focalização isoelétrica e PAGE bidimensional.

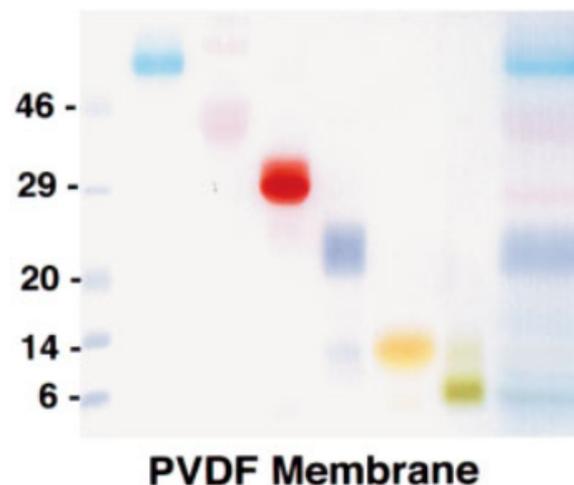
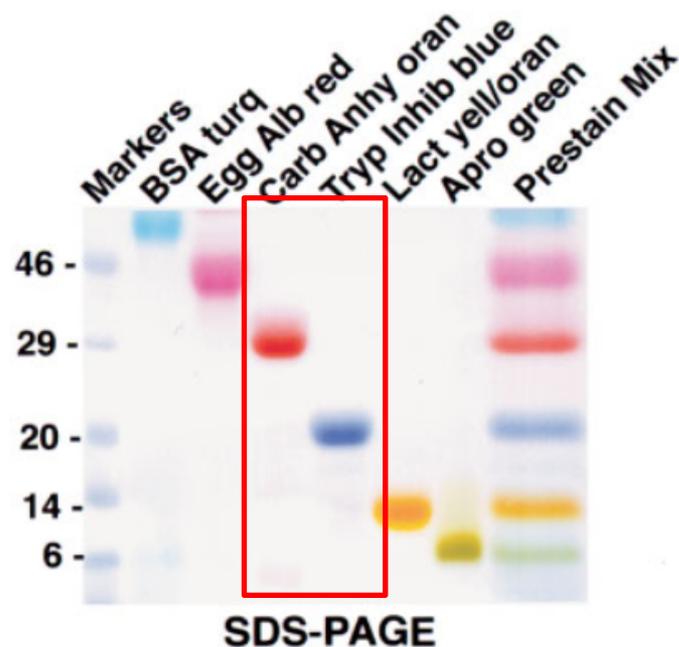
Table 1. Remazol dye and marker protein combination

Marker protein ^{a)}	Rel. molecular mass	Remazol dye ^{b)}	Protein/dye designation
Bovine serum albumin	66 000	Remazol Turquoise	BSA turq
Egg albumin	45 000	Remazol Brilliant Red F3B	Egg alb red
Carbonic anhydrase	29 000	Remazol Brilliant Orange 3R	Carb anhy oran
Trypsin inhibitor	20 000	Remazol Brilliant Blue R	Tryp inhib blue
α -Lactalbumin	14 200	Remazol Golden Yellow RNL/Remazol Brilliant Orange 3R (4:1 ratio)	Lact yell/oran
Aprotinin	6 000	Remazol Brilliant Blue R/ Remazol Golden Yellow RNL (4:1 ratio)	Apro green

a) Sigma Chemical Company

b) DyStar LP

devices or size-exclusion chromatography. However, this additional purification step did not appear to enhance the generation of the prestained markers and thus, this step was eliminated from the protocol. The combination of marker proteins and Remazol dyes used in this report are indicated in Table 1. The selection of these particular protein/dye combinations was based on a series of experiments designed to optimize the contrast of proteins within a set of protein standards. Following the generation



Procedimento

1. Preparar o corante remazol (Azul ou Laranja) na concentração de 10 mg/mL em SDS 10% (pesar 10 mg e diluir em 1 ml de SDS 10%)
2. Suspender 1 mg da proteína de interesse em 25 ul de carbonato de sódio 100 mM pH 10
3. Adicionar 5 ul do corante remazol (Azul ou Laranja), em SDS 10%
4. Incubar a 60 °C por 30 minutos
5. Adicionar 5 uL (1 mg) de lisina para parar a reação
6. Incubar por mais 10 minutos a 60 °C
7. Pegar 15 ul da proteína corada, adicionar 15 ul de tampão de aplicação SDS-PAGE
8. Ferver por 5 minutos
9. Aplicar 20 ul no SDS-PAGE

	Proteína	Massa Molecular (kDa)	Grupo
1	Albumina de Soro Bovino	67	1, 3, 5, 7
2	Ovalbumina	43	2, 4, 6, 8
3	Quimotripsinogênio A	25	1, 3, 5, 7
4	Ribonuclease A	13,7	2, 4, 6, 8

Nº	Proteína	Massa Molecular estimada (kDa)	Grupo
1	Albumina de Soro Bovino	67	1, 3, 5, 7
2	Ovalbumina	43	2, 4, 6, 8
3	Quimotripsinogênio A	25	1, 3, 5, 7
4	Ribonuclease A	13,7	2, 4, 6, 8

Mapa do gel SDS-PAGE

Gel 1 e 2: Marcador de Massa

1- Proteína 1 – G1

2- Proteína 3 – G1

3- Proteína 2- G2

4- Proteína 4- G2

5- Mix Proteínas G1/G2

6- Proteína 1 – G3

7- Proteína 3 – G4

8- Proteína 2 – G4

9- Proteína 4 – G4

10- Mix Proteínas G3/G4

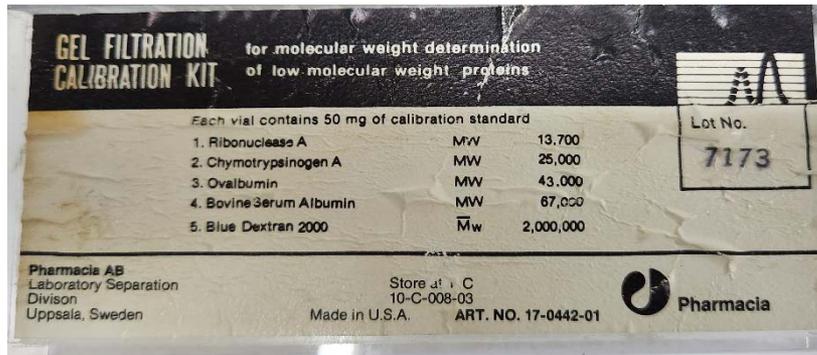


Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024

Preparação de 2 mg de proteína do kit (preparei 25 tubos c/u com 2 mg de proteína)



Adicionados 500 uL água a cada vial

Aplicados 15 uL da preparação

67

45

25

13,7

