



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

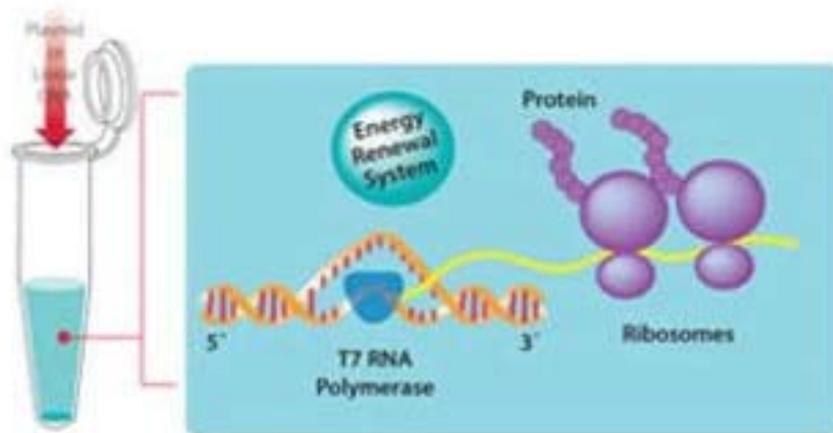
Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

USP - 2024

Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System:

DNA templates:

- Supercoiled plasmid DNA (recommended to obtain the highest yields)
- Linear DNA
- PCR product



Com um molde de DNA contendo um promotor T7 transcrito, ribossomos ligam-se ao extremo 5' do mRNA nascente e sendo traduzido. Um sistema renovável de energia ATP acoplado para ligação estável dos ribossomos resulta em alto nível de proteína produzida.



Nossos produtos

Pensou em produtos de biologia sintética? Lembrou da BIOLINKER. Aqui estamos construindo o portfólio que você precisa para acelerar sua pesquisa científica, finalizar seu produto e produzir em escalas e pureza para órgãos regulatórios. Com a melhor equipe de biotecnologia do país.



Biologia
Molecular

[Veja mais →](#)



Antígenos
Virais

[Veja mais →](#)



Cell-free protein
expression

[Veja mais →](#)

<https://biolinker.tech/>



Mona Oliveira
Diretora Executiva (CEO)



Sandi Ravbar
Diretor Financeiro (CFO)



Phelipe Vitalle
Diretor Científico (CSO)



Mylena Moraes
Gerente do SAC



Nossa equipe



Sheyla Alves
Analista de Qualidade



Iris Todeschini
Pesquisadora



Lana Oliveira
Jovem Aprendiz



QUICK PROTOCOL CELL-FREE PARA EDUCAÇÃO

op02upm10



QUICK PROTOCOL BIOTRECO

O kit BIOTRECO, permite a expressão de proteína reporter (GFP) do inglês, proteína fluorescente no verde.

O kit Inclui os seguintes itens

- Pool de aminoácidos
- Mix Energético
- Tampão Cell-Free Biolinker
- Extrato celular

O Extrato celular deve ser mantido a -80°C quando estocado antes de uso e descongelado sobre o gelo !

EVITE CONGELAR E DESCONGELAR VÁRIAS VEZES.

Item não incluso, mas necessário para o experimento:

- Micropipetadores
- Estufa, banho-maria ou termobloco
- Transluminador

STEP 01: DESCONGELE O KIT NO GELO

Muito importante manter gelado e não aquecer o kit

- Descongelar em gelo por 1h antes de usar
- Não descongele em temperatura ambiente em hipótese alguma o extrato celular.

STEP 02: O KIT JÁ VEM PRONTO PARA USO

Todos os reagentes vem na concentração de uso, não precisando reconstituir apenas será necessário fazer a mistura mestre (MASTERMIX), usando *micropipetas graduadas

STEP 03: VAMOS PREPARAR A SOLUÇÃO DE TRABALHO

O kit educacional pode ser usado até 5 reações de 50 ul cada ou mínimo 10 reações de 25 ul para visualizar a GFP. Calcule os negativos que é adição de água seguindo a tabela:

- Não esqueça que o negativo deve ser sempre o mesmo volume de DNA que você colocou.

Components Por mL de reação add

Volume final	1 ml	500 uL	100 uL	50 uL
1.Pool de aminoácidos	184 uL	92 uL	18,4 uL	9,2 uL
2.Mix energético	126 uL	63 uL	12,6 uL	6,3 uL
3.Tampão cell free	390 uL	195 uL	39 uL	19,5 uL
4.Extrato	300 uL	150 uL	30 uL	15 uL
DNA (>100 ug/uL)	50 uL	25 uL	5 uL	2,5 uL



N - HOT

STEP 04: MISTURE E DISTRIBUA EM TUBOS

Misture as soluções para o numero total de reações

- Distribua nas tiras de tubos que vem com o kit (Esses tubos são especiais, livres de enzimas que degradam o DNA/RNA) - recomendamos mínimo 47,5 ul mix + 2,5 ul de DNA -Volume total 50ul.
- Adicione o gene de expressão do GFP no tubo seguindo a tabela acima ou de forma proporcional se usar outros volumes.

STEP 05: FECHER OS TUBOS

Depois de misturar as soluções com o DNA é importante

- Fechar os tubos com firmeza, evitando evaporação
- Se uma placa de 96 poços, selar com adesivo de placas evitando a evaporação.

STEP 06: INCUBAÇÃO

Incube os tubos positivos e negativos

- Você pode incubar em *banho-maria, *termobloco, *banho seco e incubadora. O importante é ter a garantia da temperatura e incubar entre 31-37°C não mais não menos!

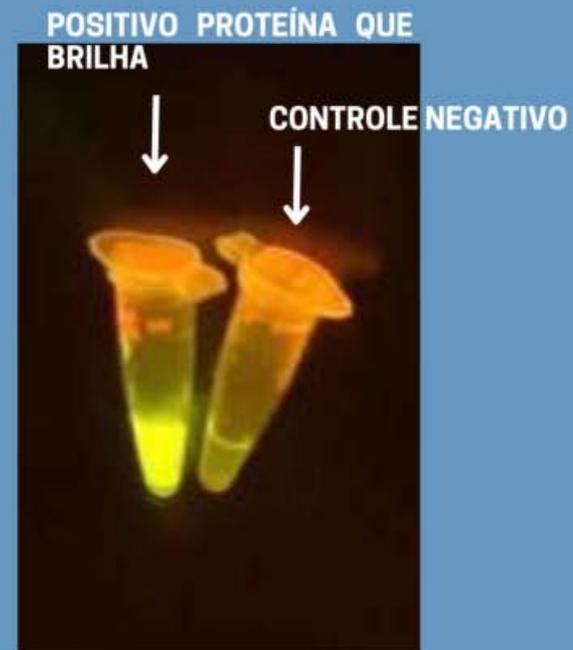
STEP 07: AGORA É VER A EMISSÃO DE LUZ DA SUA PROTEÍNA

Após 15 min de incubação já pode ser visto a expressão da sua proteína.

Visualise usando um *transluminador com luz azul e filtro amarelo



STEP 08: EXEMPLO DE RESULTADO A SER VISTO



PREPARANDO SUA SOLUÇÃO



O kit educacional pode ser usado até 5 reações de 50 μ L cada para visualizar a proteína que brilha. Calcule os negativos que é adição de água seguindo a tabela: Não esquece que o negativo deve ser sempre o mesmo volume de DNA que você colocou no positivo

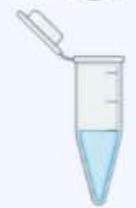
Componentes Para μ L de reações

Volume final	250 μ L	50 μ L
Pool de aminoácidos	46	9,2 μ L
Mix energético	31	6,3 μ L
Tampão cell free	97,5	19,5 μ L
Extrato	75 μ L	15 μ L
DNA (>100 μ g/ μ L)	12,5 μ L	2,5 μ L



1 Misture os reagentes

DNA 



Positivo

ÁGUA

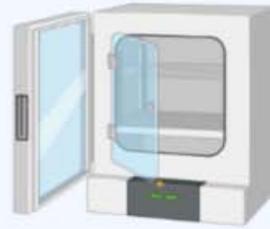


Negativo

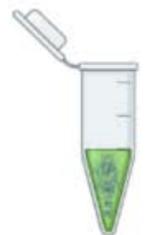
2 Incubar na temperatura á 37°C

 15 min

 37 °C



3 Visualizar a proteina que brilha



Positivo



Negativo





Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024