

Curso de Biotecnologia
ACH5545 - Engenharia Genética
Atividade de Laboratório

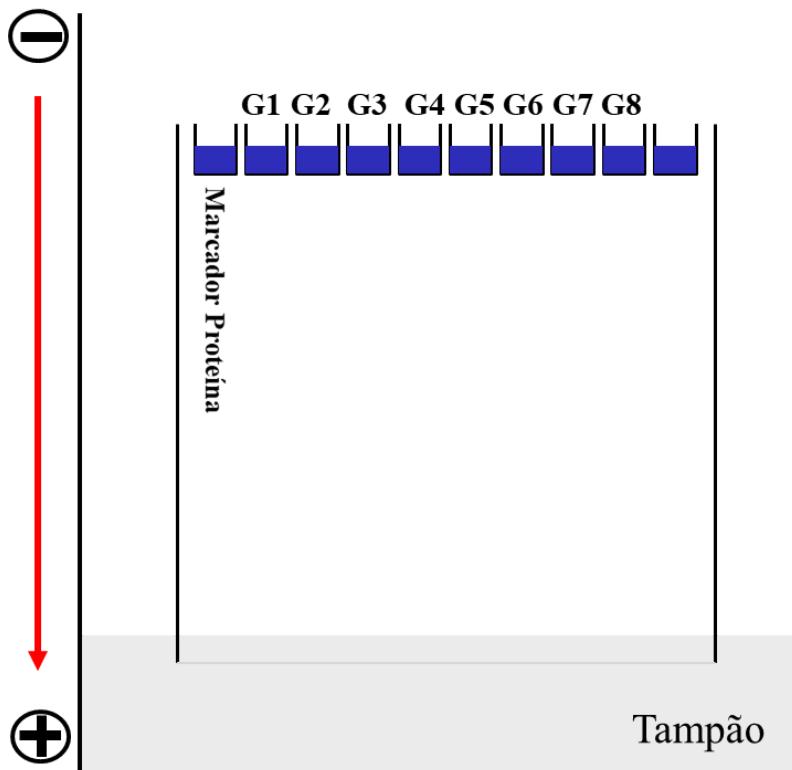
(11/09/2025)

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

1- Análise de Proteína em 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.



2- Análise de DNA em gel de agarose

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 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.

Grupo 1:

- | | | |
|------------------|------------------|------------------|
| PCR-gDNA-2 | PCR-gDNA-2 | PCR-gDNA-2 |
| PCR-pDNA-2 | PCR-pDNA-2 | PCR-pDNA-2 |
| PCR-pDNA-1 | PCR-pDNA-1 | PCR-pDNA-1 |
| DNA plasmidial-2 | DNA plasmidial-2 | DNA plasmidial-2 |
| DNA plasmidial-1 | DNA plasmidial-1 | DNA plasmidial-1 |
| gDNA Bactéria-2 | gDNA Bactéria-2 | gDNA Bactéria-2 |
| gDNA Bactéria-1 | gDNA Bactéria-1 | gDNA Bactéria-1 |
| Marcador DNA | Marcador DNA | Marcador DNA |

Grupo 2:

- | | | |
|------------------|------------------|-----------------|
| DNA plasmidial-2 | DNA plasmidial-1 | gDNA Bactéria-2 |
| DNA plasmidial-1 | gDNA Bactéria-1 | gDNA Bactéria-1 |
| Marcador DNA | Marcador DNA | Marcador DNA |