



Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2025

Docentes responsáveis:

Felipe Chambergo (fscha@usp.br) - <https://sites.usp.br/lbbp>

Sandra Marcia Muxel (sandrammixel@usp.br)

Monitores:

MSc. Brisa Moreira Gomes (brisa.moreira@usp.br)

Camile Penha de Freitas (camile.penha@usp.br)

Servidores não-docentes:

Tec. Pedro Manoel dos Santos - pedroms@usp.br

Créditos: 4

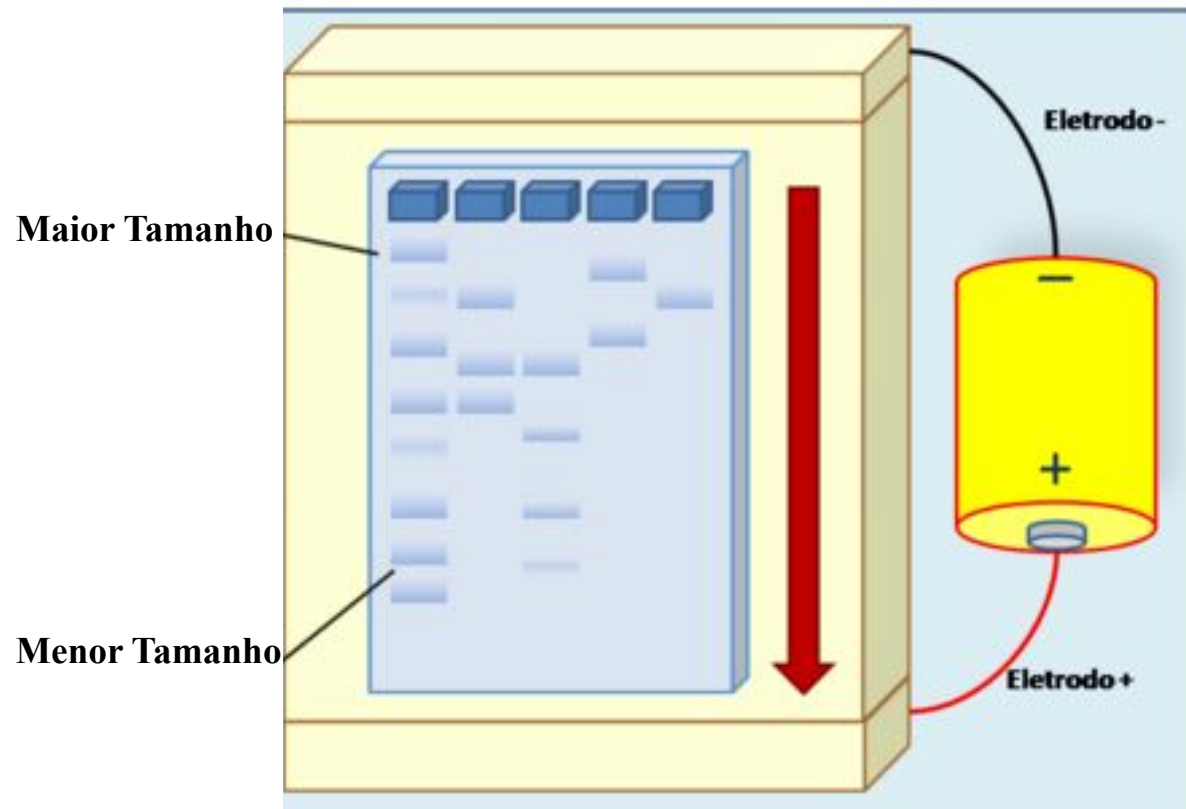
Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

USP - 2025

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

Eletroforeses de DNA e Proteínas

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

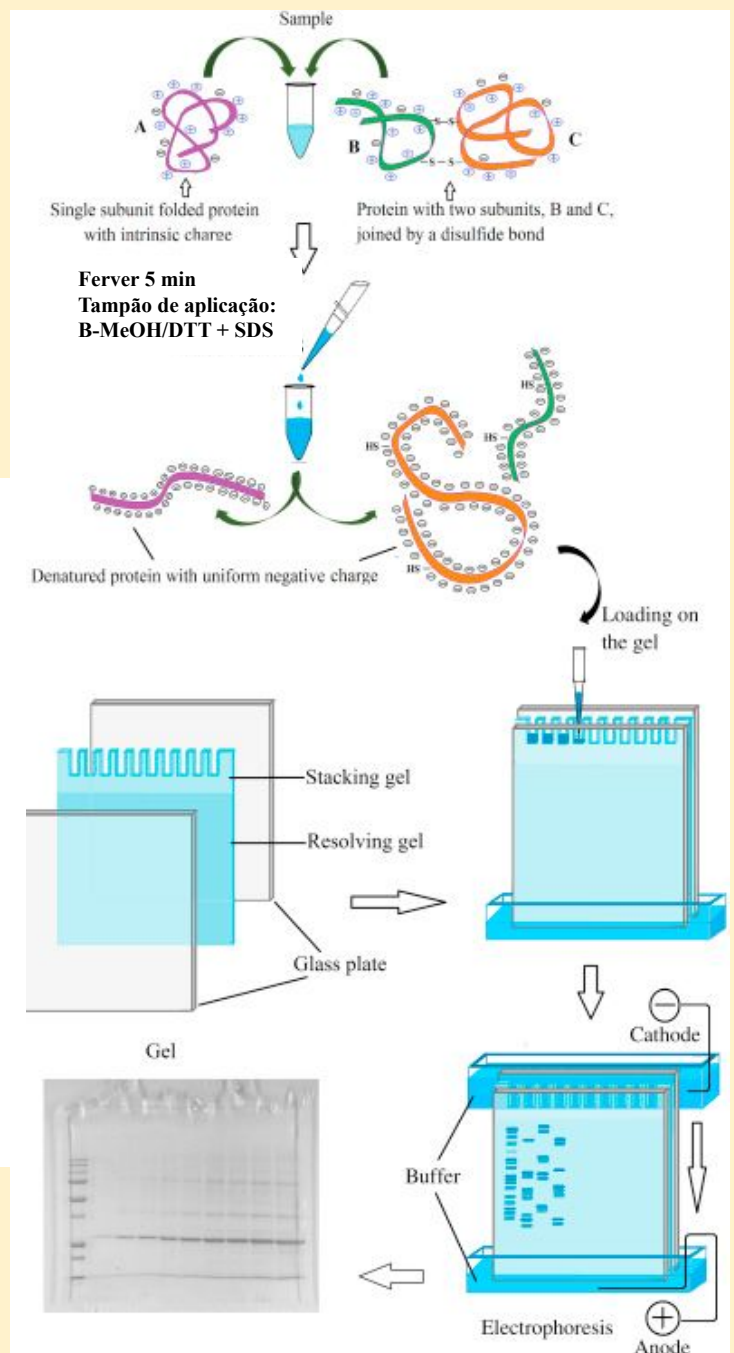
- Eletroforese em papel (acetato de celulose, uso: separar aminoácidos e peptídeos).
- Eletroforese em gel acrilamida:bisacrilamida.
- Eletroforese bidimensional (separação por: ponto isoelétrico e peso molecular).

Para separar DNA

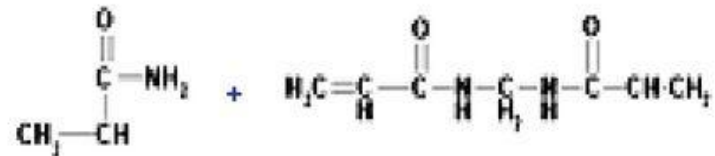
- Eletroforese em gel de agarose.
- Eletroforese capilar (sequenciamento de DNA, utiliza-se capilares de sílica fundida a potenciais elevados 20 a 30 kV em um campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por ar).
- Eletroforese de campo pulsado (separa grandes moléculas (até 600kb), cromossomos inteiros , utiliza-se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

SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

Eletroforese de proteínas: SDS-PAGE

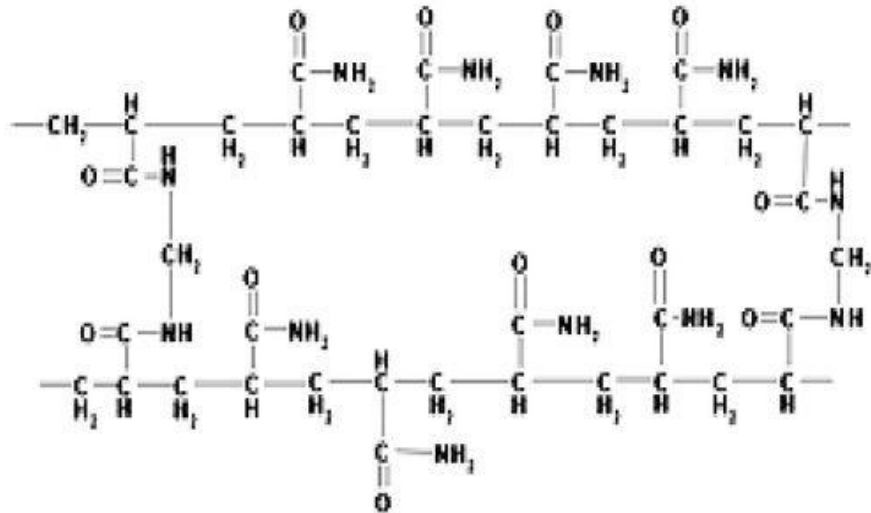


- $$\begin{array}{ccc} \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 \\ & \diagdown & / \\ & \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} & \\ & / & \diagdown \\ \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 \end{array}$$

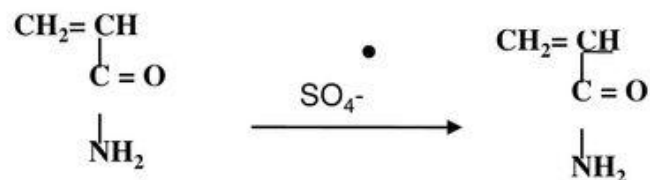


N,N'-metilenobisacrilamidaacrilamida

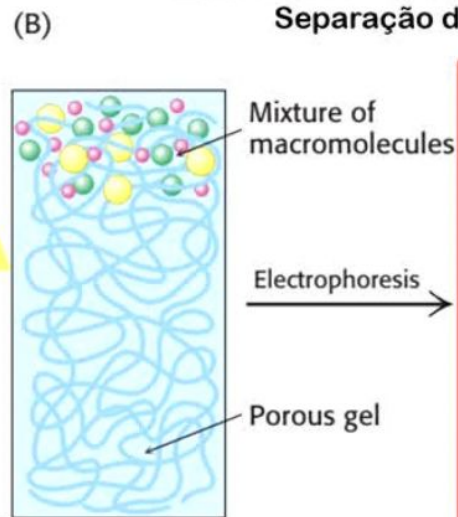
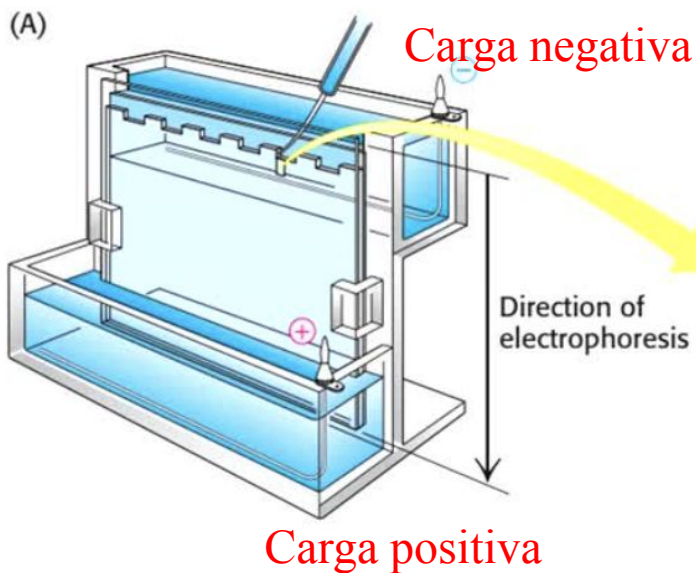
Catalisador
(persulfato de amônio)



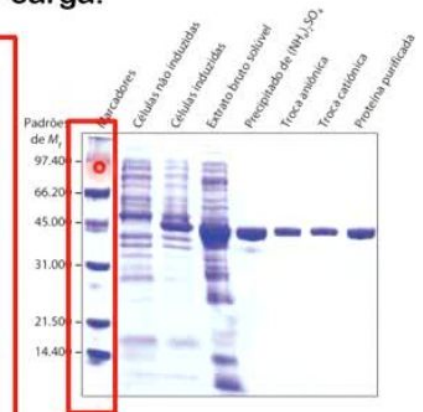
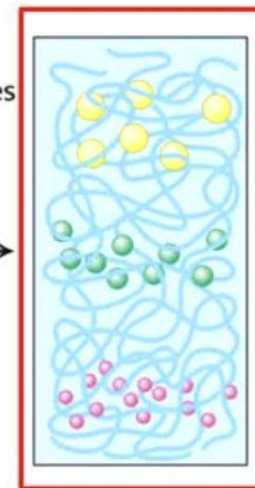
poliacrilamida

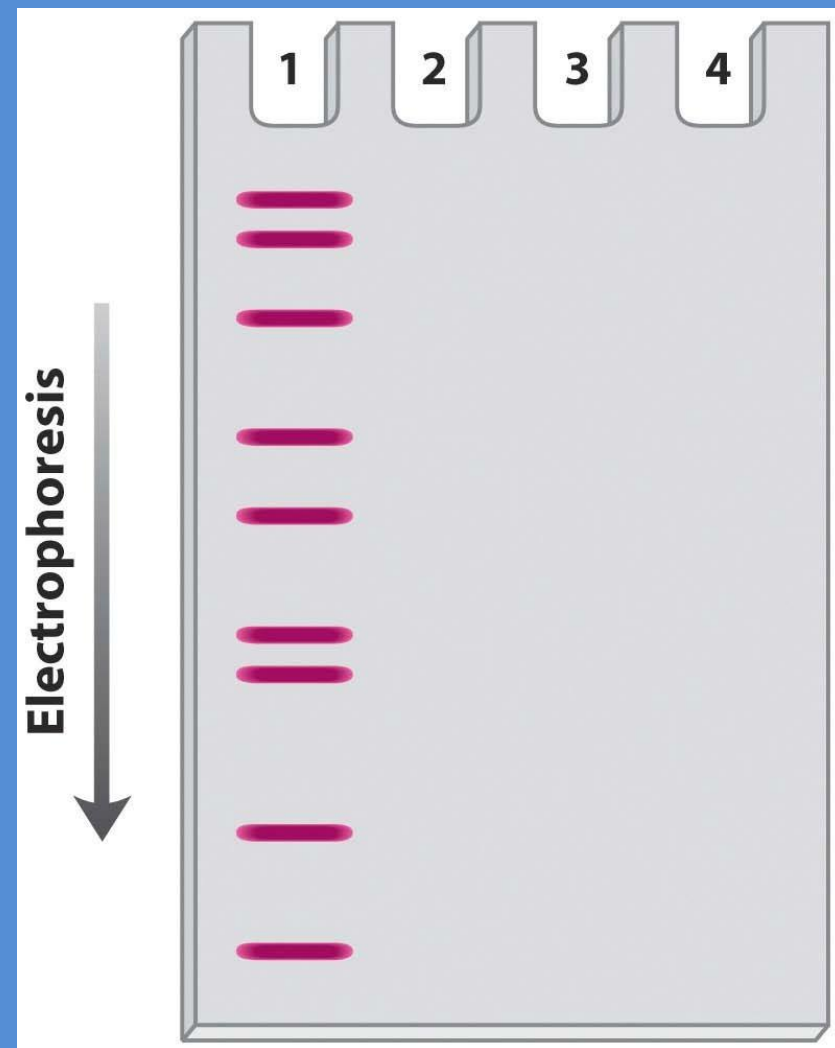
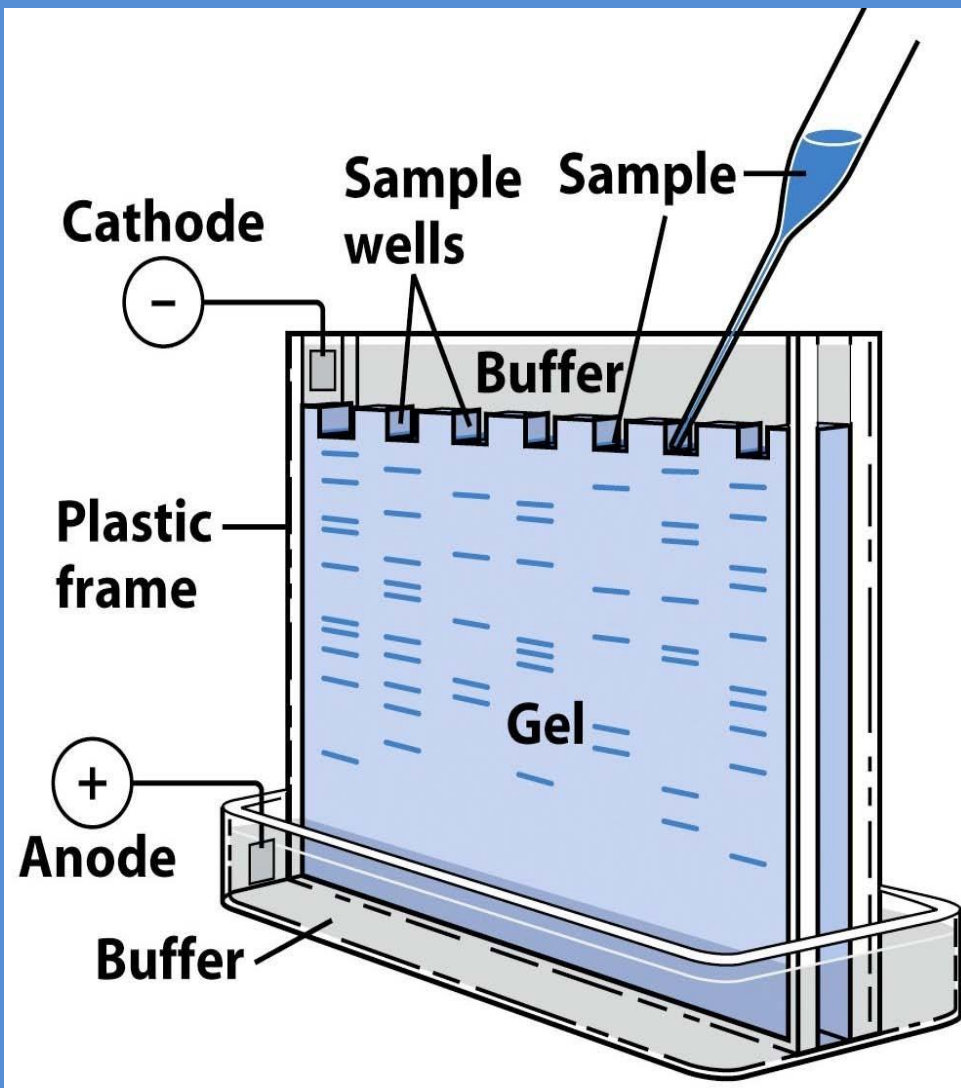
$$\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8 \longrightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{SO}_4^{\bullet -}$$


SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL



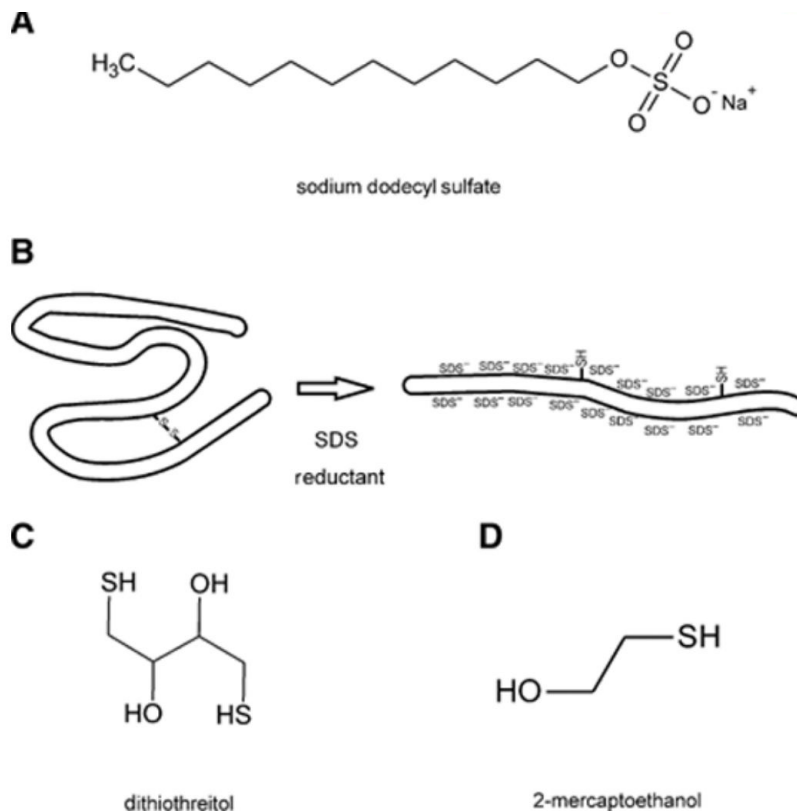
Electrophoresis





ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

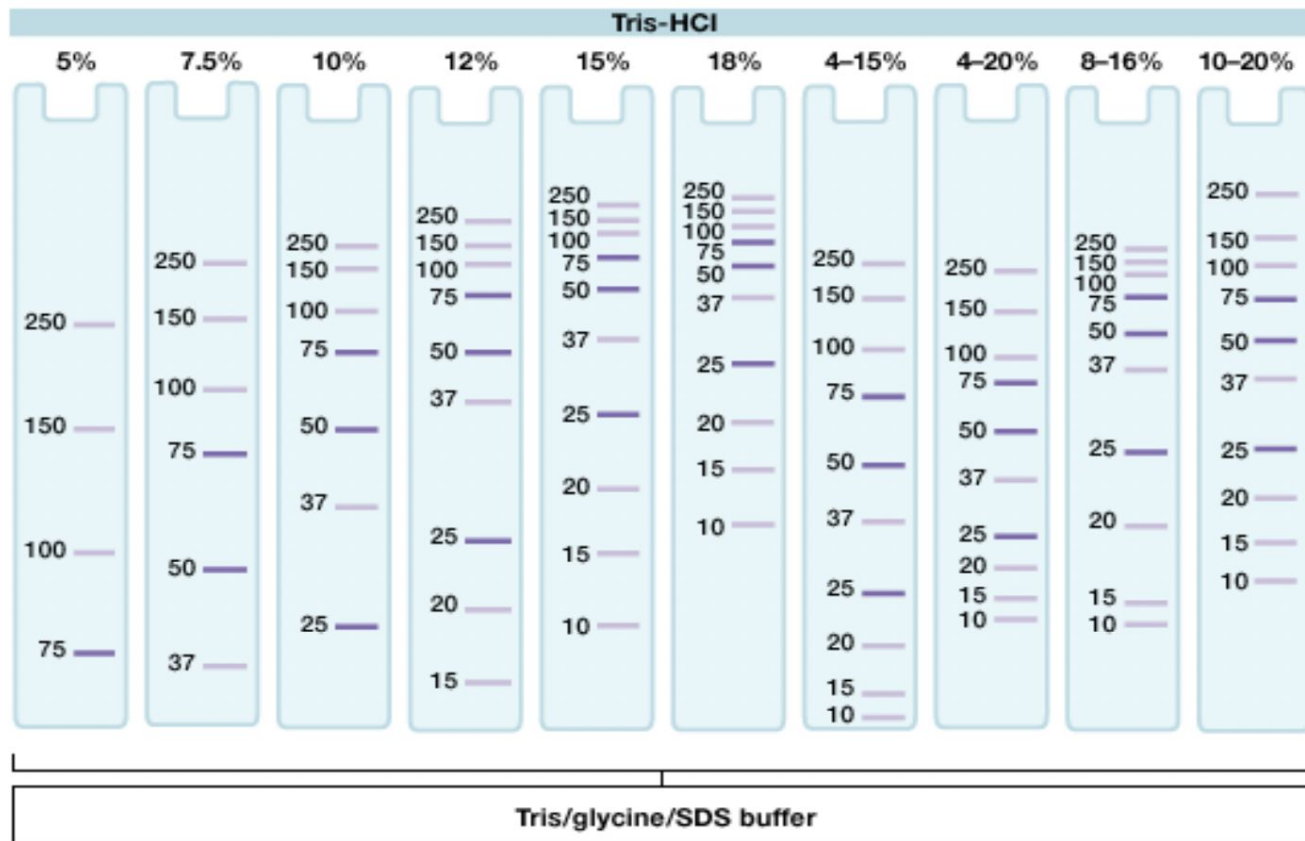


- Permite análise direta da **MASSA** em função da **mobilidade eletroforética (RF)**
- SDS normaliza efeitos devido ao formato da partícula, pois desnatura a proteína
- Curva padrão deve ser corrida nas mesmas condições experimentais (mesmo gel preferencialmente, **Ladder**)

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

POROSIDADE DO GEL

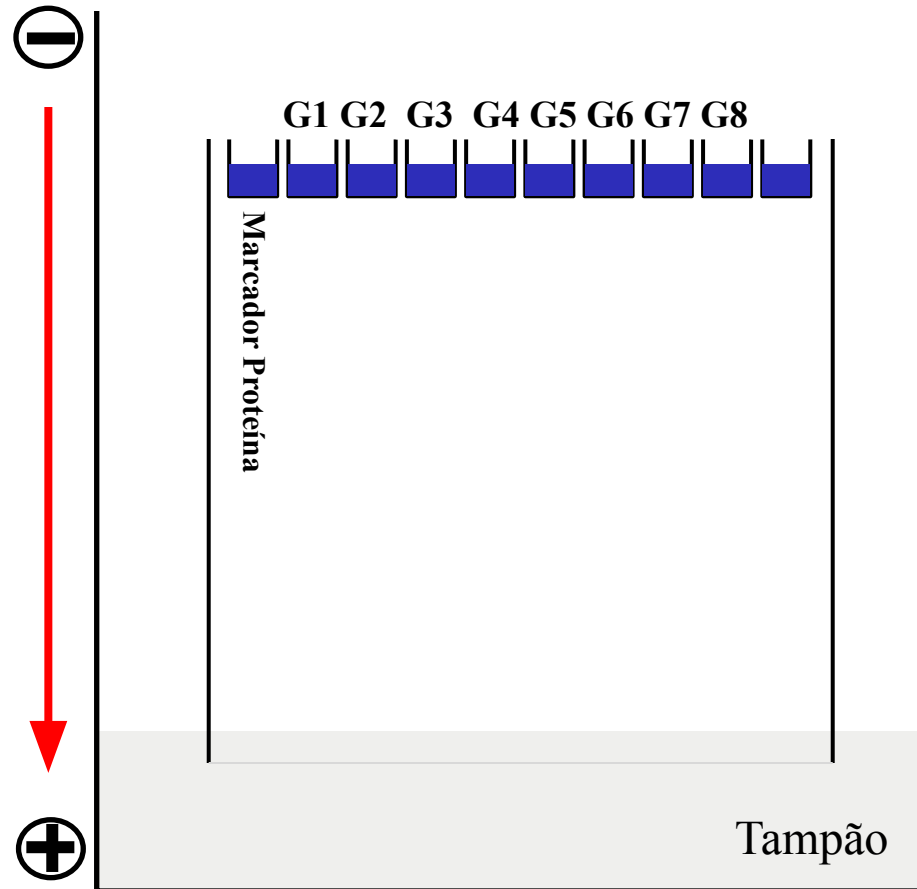


Elektroforeses de proteínas: SDS-PAGE

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 eletroforese. 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.

Eletroforese de Proteína



ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

SDS-PAGE - MÉTODO DE VISUALIZAÇÃO

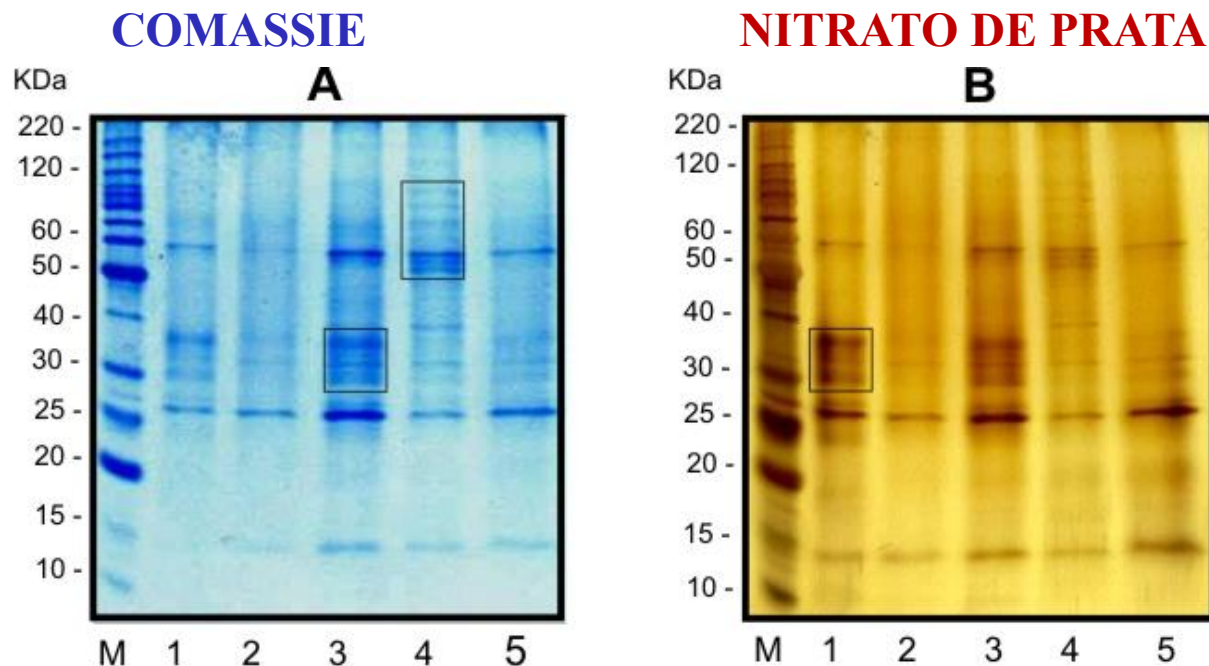
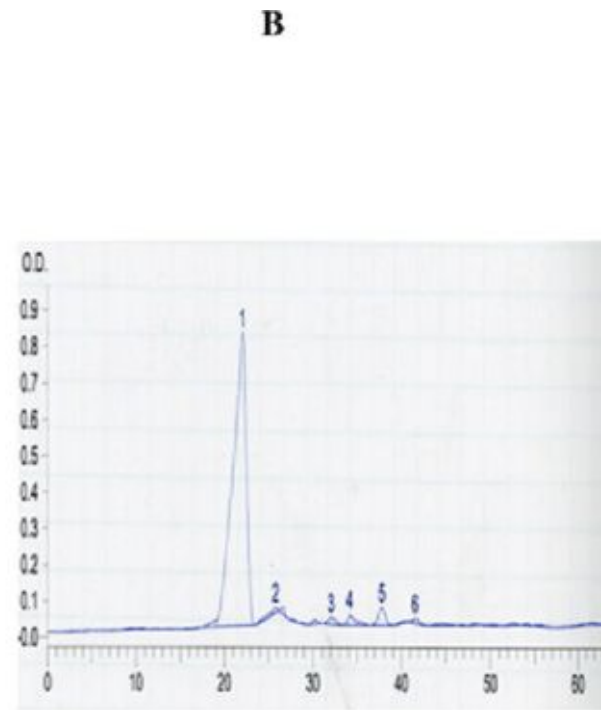
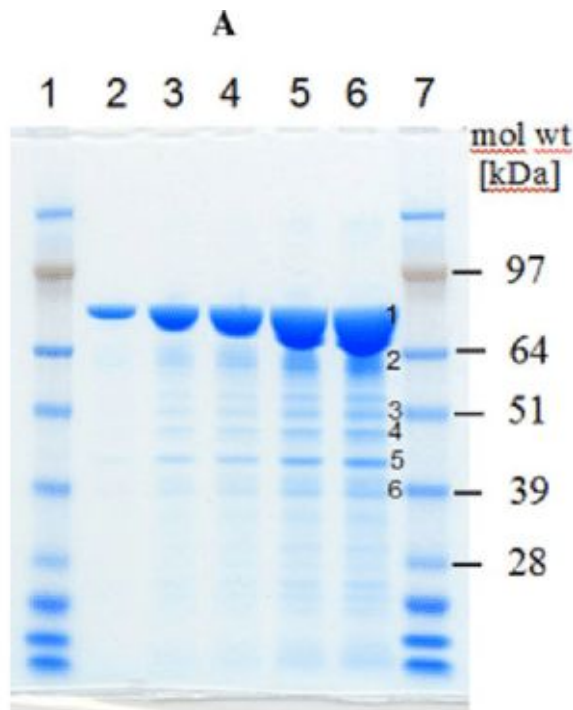


Figura 6 - Análise eletroforética (SDS-PAGE) de extratos protéicos (3 µg) de raízes de *P. tuberculatum* Jacq. Em A, coloração com azul de Coomassie, em B, coloração com nitrato de prata. M- Marcador molecular (KDa), 1 – Extrato protéico obtido com tampão salino; 2 – Extrato protéico obtido com tampão fosfato de sódio; 3 – Extrato protéico obtido com tampão sacarose; 4 – Extrato protéico obtido com tampão uréia; 5 – Extrato protéico obtido com tampão glicerol. As caixas na Figura A indicam as bandas diferenciais observadas nas amostras obtidas com os tampões sacarose e uréia. A caixa na Figura B indica as bandas que ficaram mais evidentes com a coloração com prata.

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

ELETROFORESE EM GEM DE ACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

MÉTODO DE VISUALIZAÇÃO



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

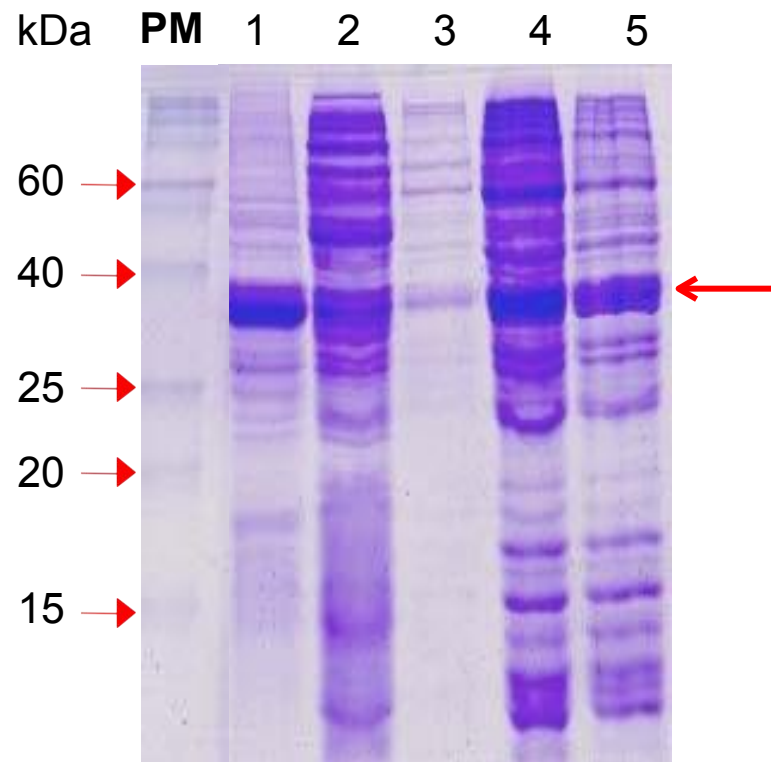


Figura 7. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10 μ L); Linha 2 – fração solúvel (10 μ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna 'HiTrap Chelating' carregada com Ni²⁺ (10 μ L). PM: Marcador de peso molecular Benchmark protein (Invitrogen, USA).

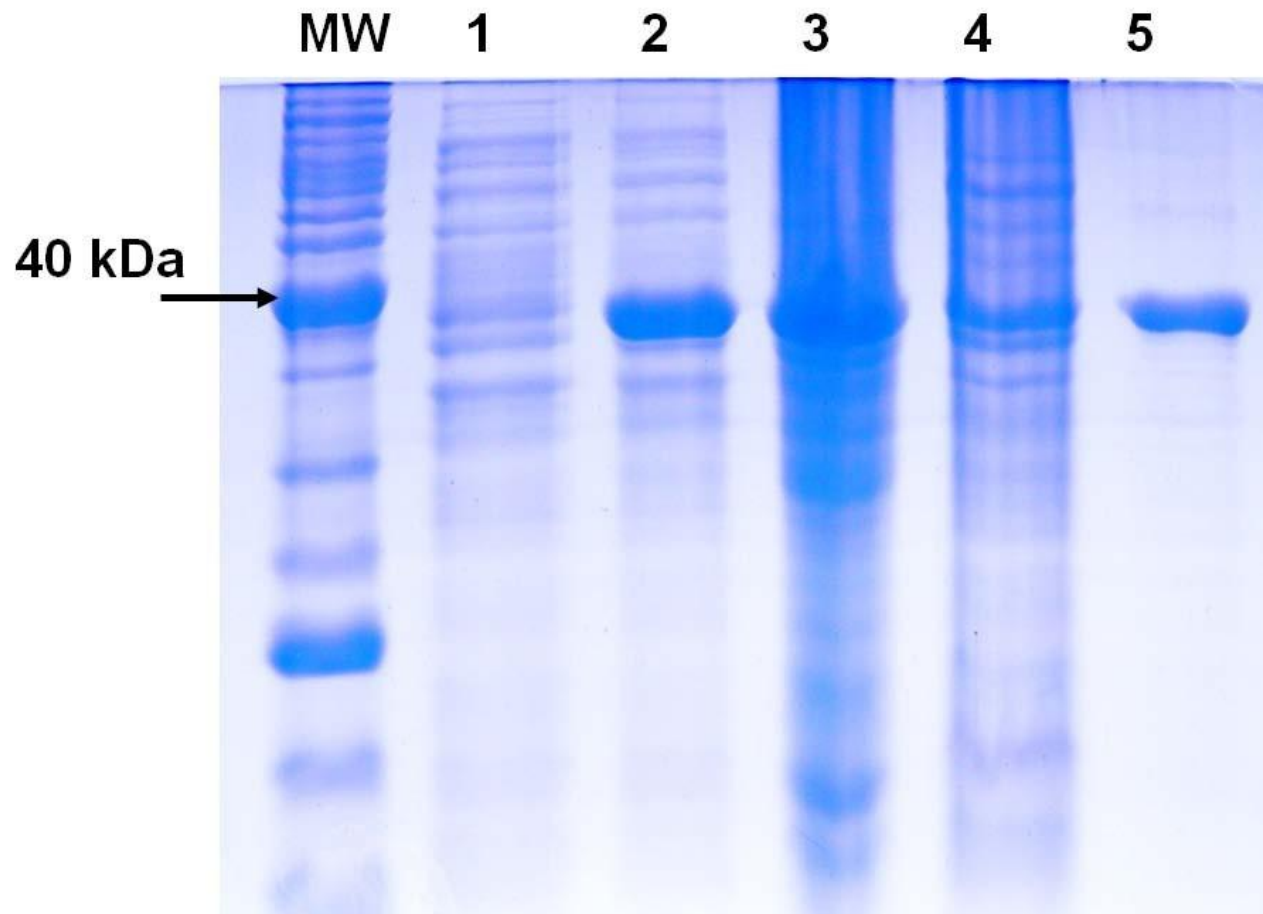


Figura 8 – Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína recombinante TrEH2, em *E. coli* BL21. (1) Amostra de 20 μ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20 μ L da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20 μ L do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel); (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).

Eletoforeses de DNA/RNA/Proteína

- Proteínas ou DNA/RNA
- Uso de sondas de DNA/RNA marcadas com radioisótopos, biotina ou fluoróforos

Método:

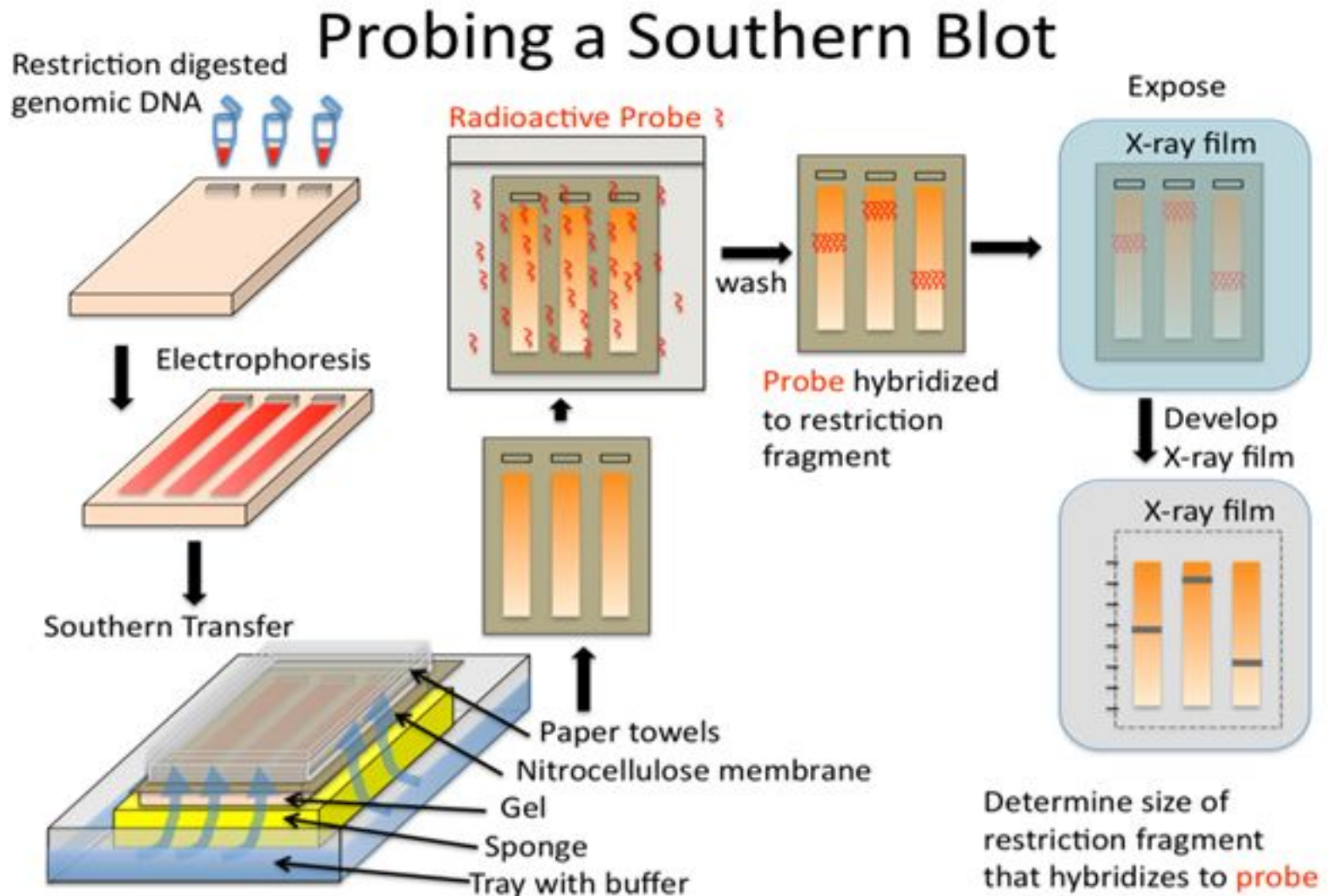
- 1) Transferência da amostra do gel
- 2) Imobilização das moléculas numa membrana de nitro-celulose
- 3) Incubação com a Sondas de DNA/RNA marcadas com radioisótopos/biotina/fluoróforos
- 4) Exposição ao filme fotográfico ou detecção de fluorescência

Southern Blot - DNA

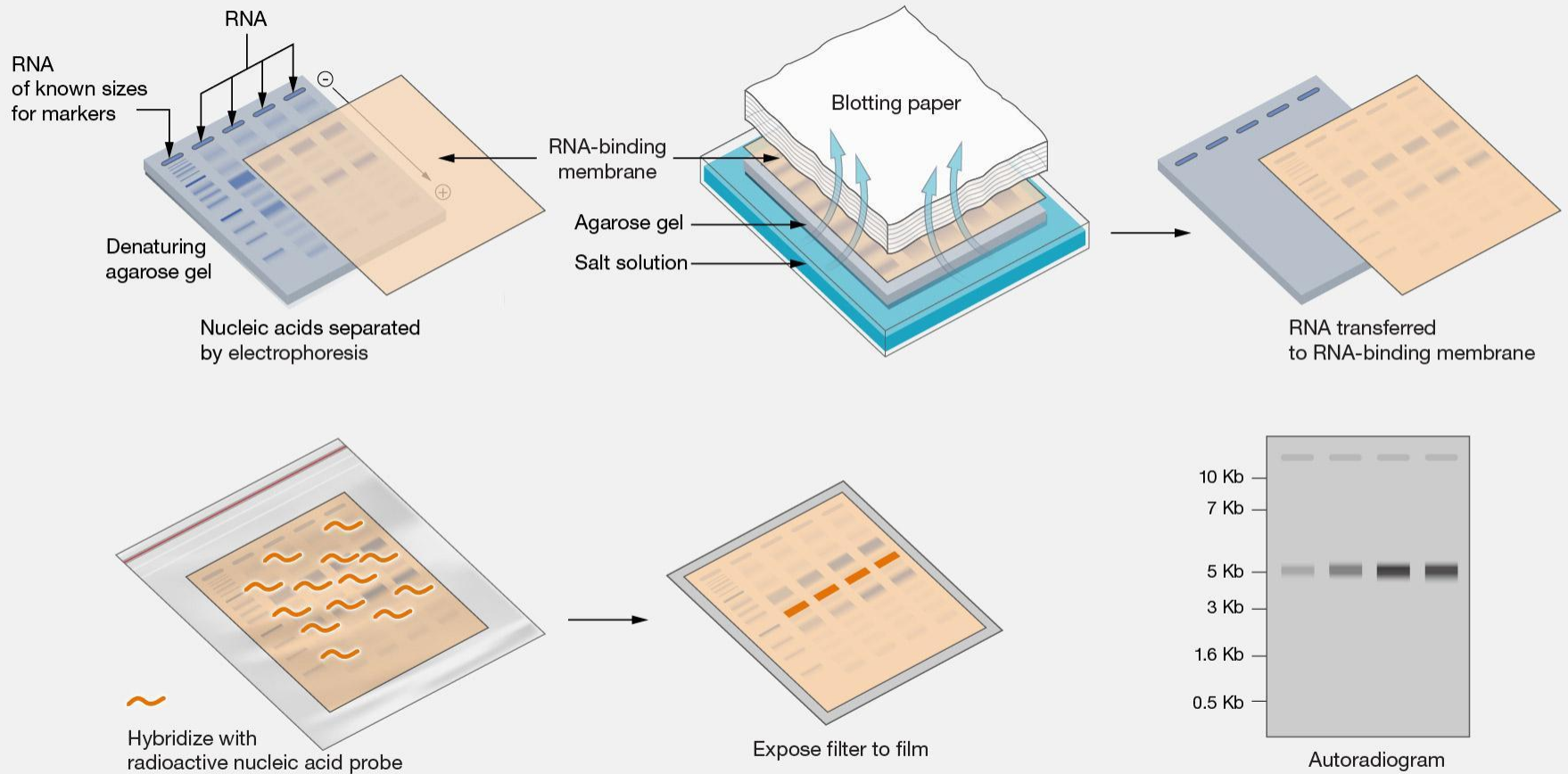
Northern Blot - RNA

Western Blot - Proteínas

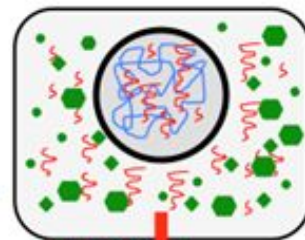
Southern blot



Northern blot



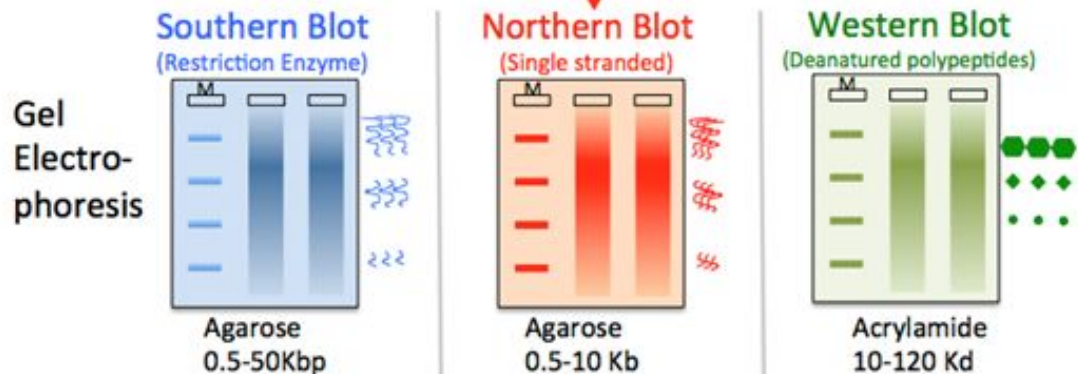
Cell with **DNA**,
RNA, & **Protein**



(DNA)

(RNA)

(Protein)



Transfer separated samples to membrane

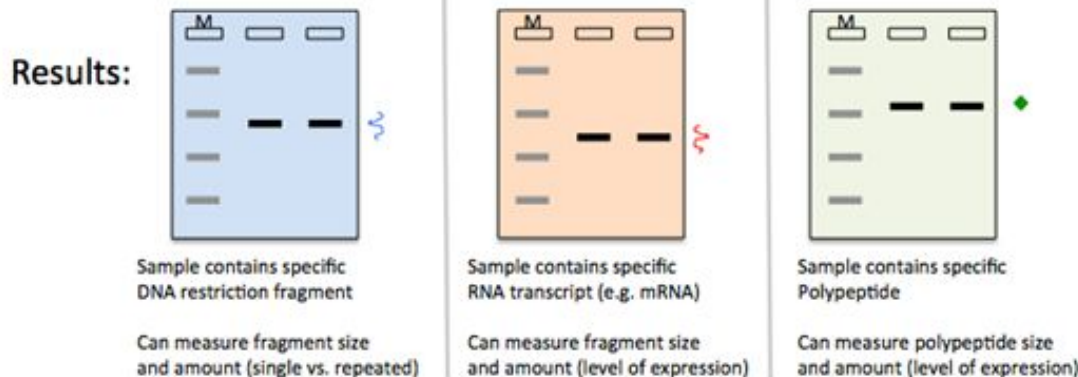
Probe Mem-brane:

Single stranded complementary DNA or RNA to specific sequence (restriction fragment)

Single stranded complementary DNA or RNA to specific sequence (transcript)

Primary antibody to specific polypeptide
Use Secondary antibody to detect/amplify primary

Detect labeled probe on membrane



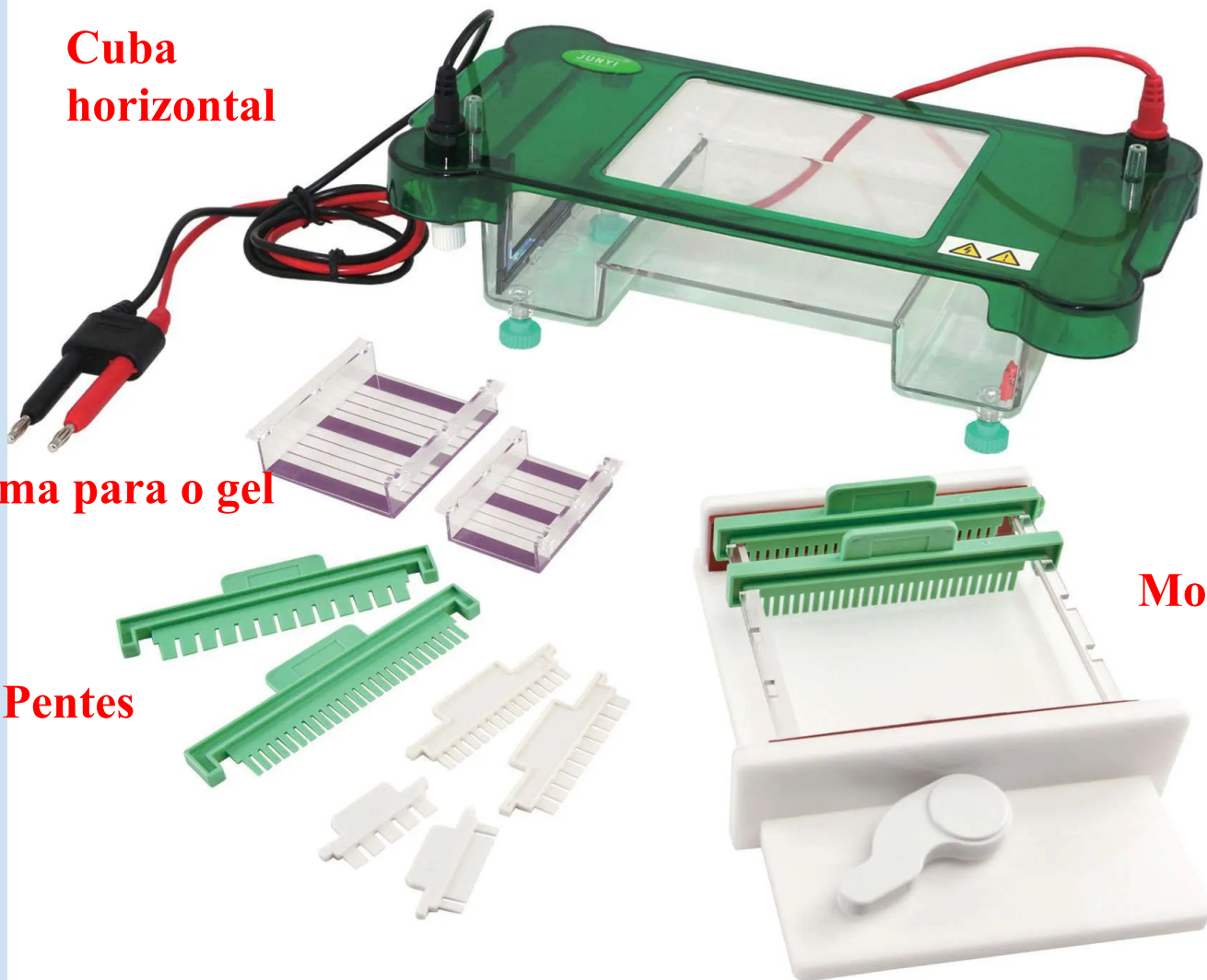
SISTEMA DE ELETROFORESE HORIZONTAL

**Cuba
horizontal**

Cama para o gel

Pentes

Montagem

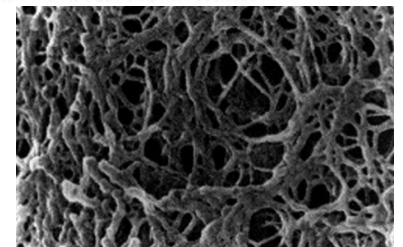
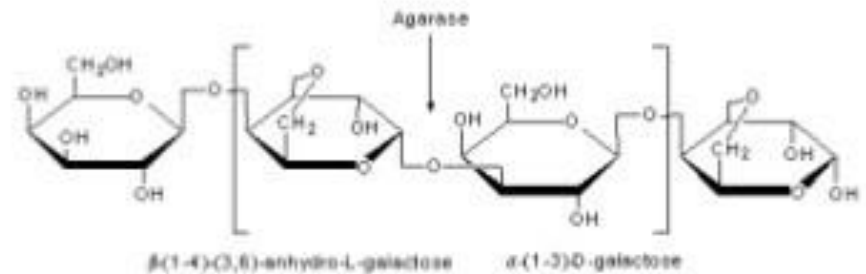
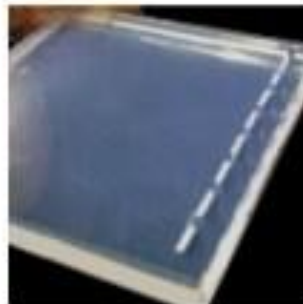
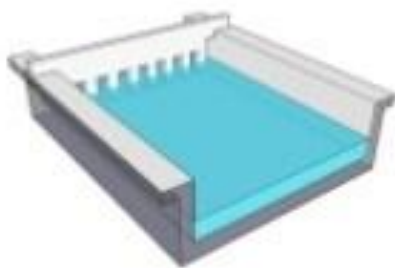
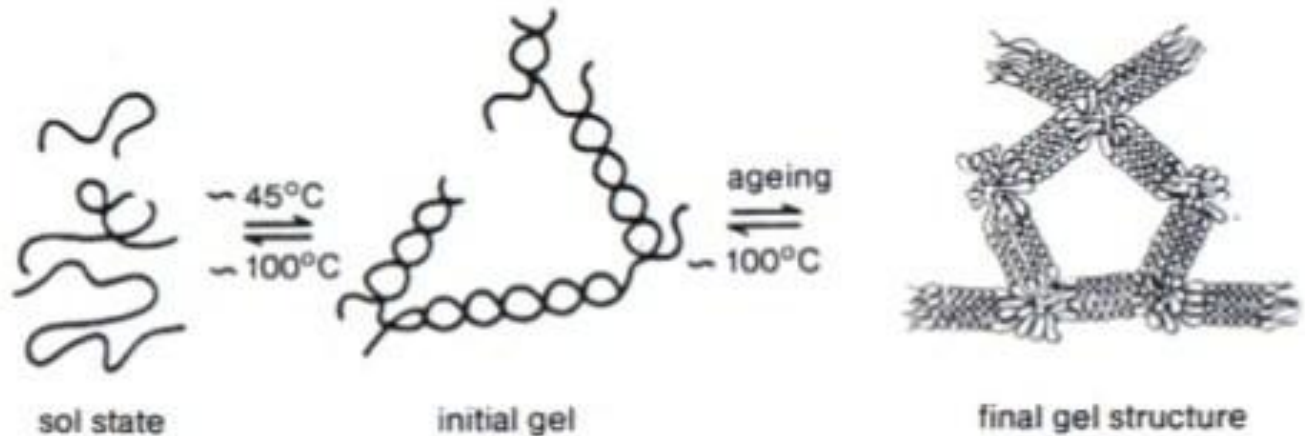


Gel de Agarose

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

Agarose gelifica - não há polimerização!

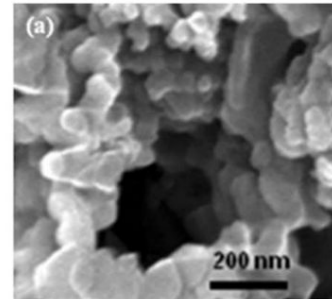
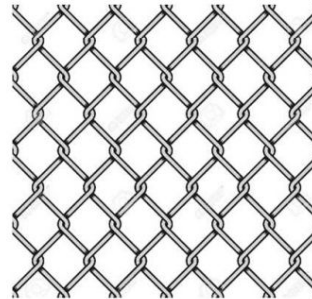
% de agarose
no gel varia
com a amostra
em análise



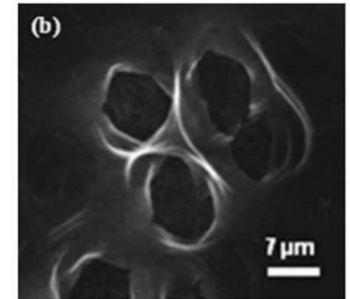
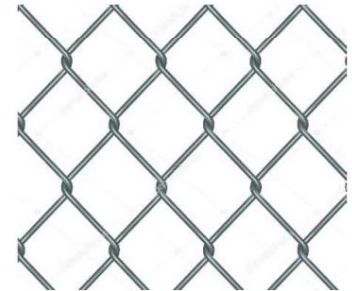
Gel de Agarose

Concentração do gel (w/v %)	Faixa de separação de DNA (kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

Sambrook et al., "Molecular Cloning" 3 ed - 2000

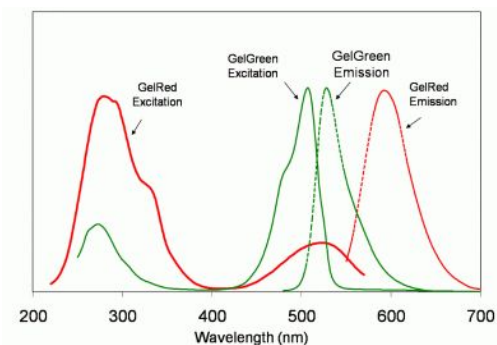
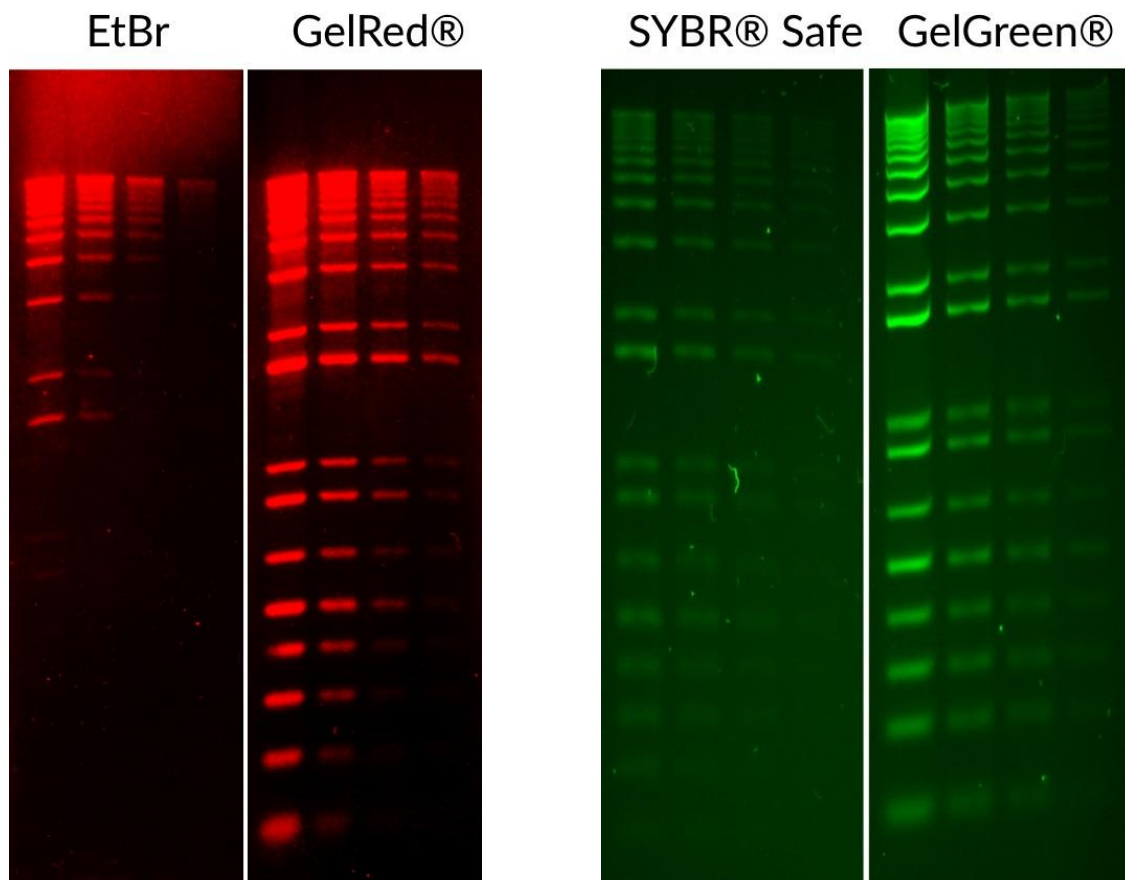


1%



0,3%

Corante de DNA SYBR



Comparação de brometo de etídio (EtBr), GelRed, SYBR Safe, GelGreen na coloração em gel de agarose a 1% em tampão TBE. Diluições seriadas duplas de DNA Ladder Plus de 1 kb (Invitrogen) foram adicionadas nas quantidades de 200 ng, 100 ng, 50 ng e 25 ng. Os géis foram imageados usando um transiluminador de 300 nm para EtBr ou LED-azul (470 nm)

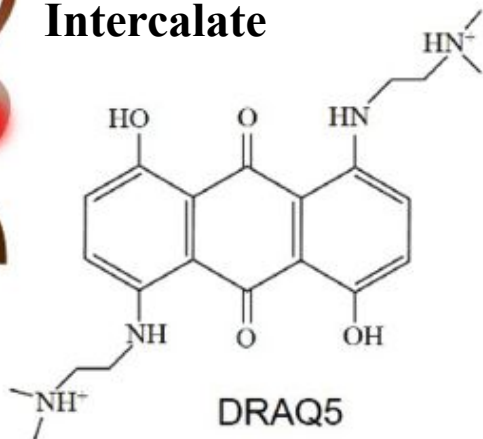
Espectros de excitação e emissão de GelRed® e GelGreen® com DNA

Corante de DNA SYBR

A



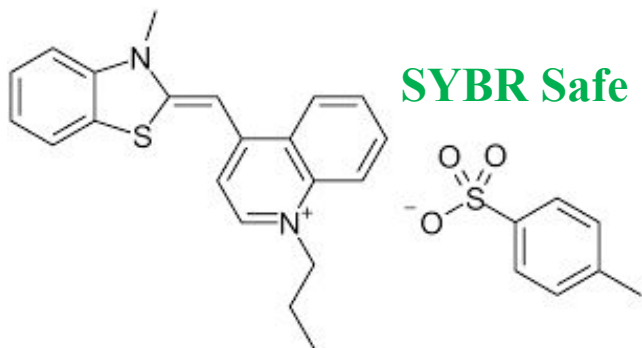
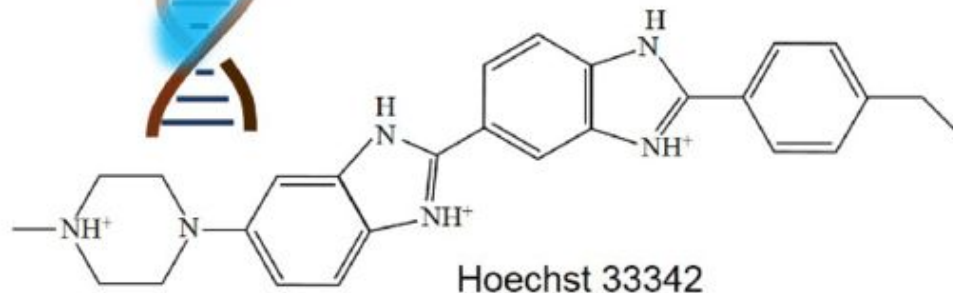
Intercalate



B



**Groove binding
Sulco do DNA**

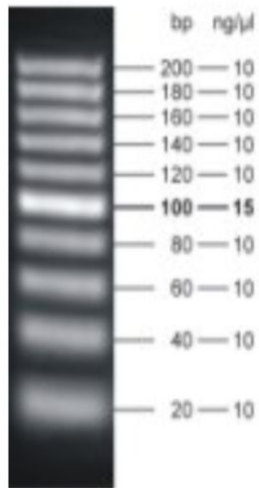


Os intercalantes são moléculas que possuem anéis planares, e essa estrutura permite que se encaixem no espaço entre os pares de bases empilhados da dupla hélice do DNA

As moléculas de groove (sulco maior e menor) binding interagem com os grupos funcionais nas bases do DNA, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals

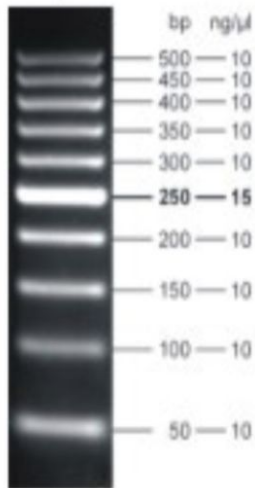
Ladder

20 pb DNA Ladder



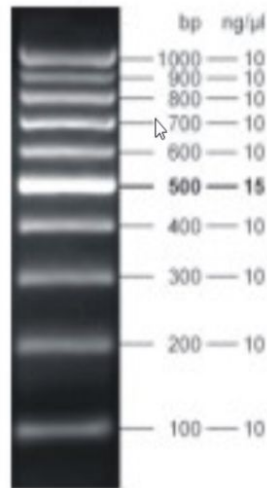
3,4 %
Agarose

50 pb DNA Ladder



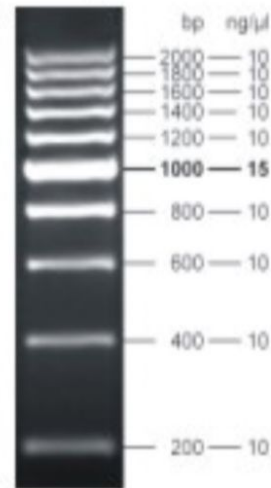
3,0%

100 pb DNA Ladder



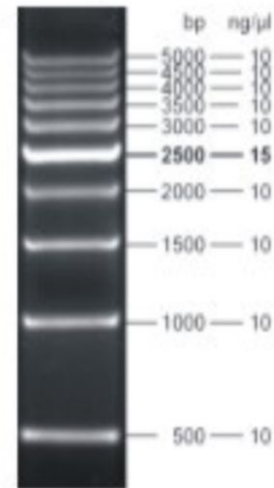
2,4%

200 pb DNA Ladder



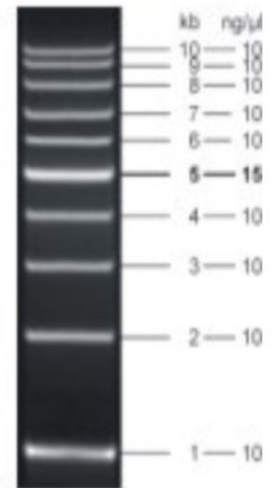
1,8%

500 pb DNA Ladder



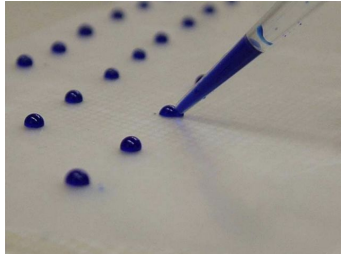
1,2%

1 Kb pb DNA Ladder

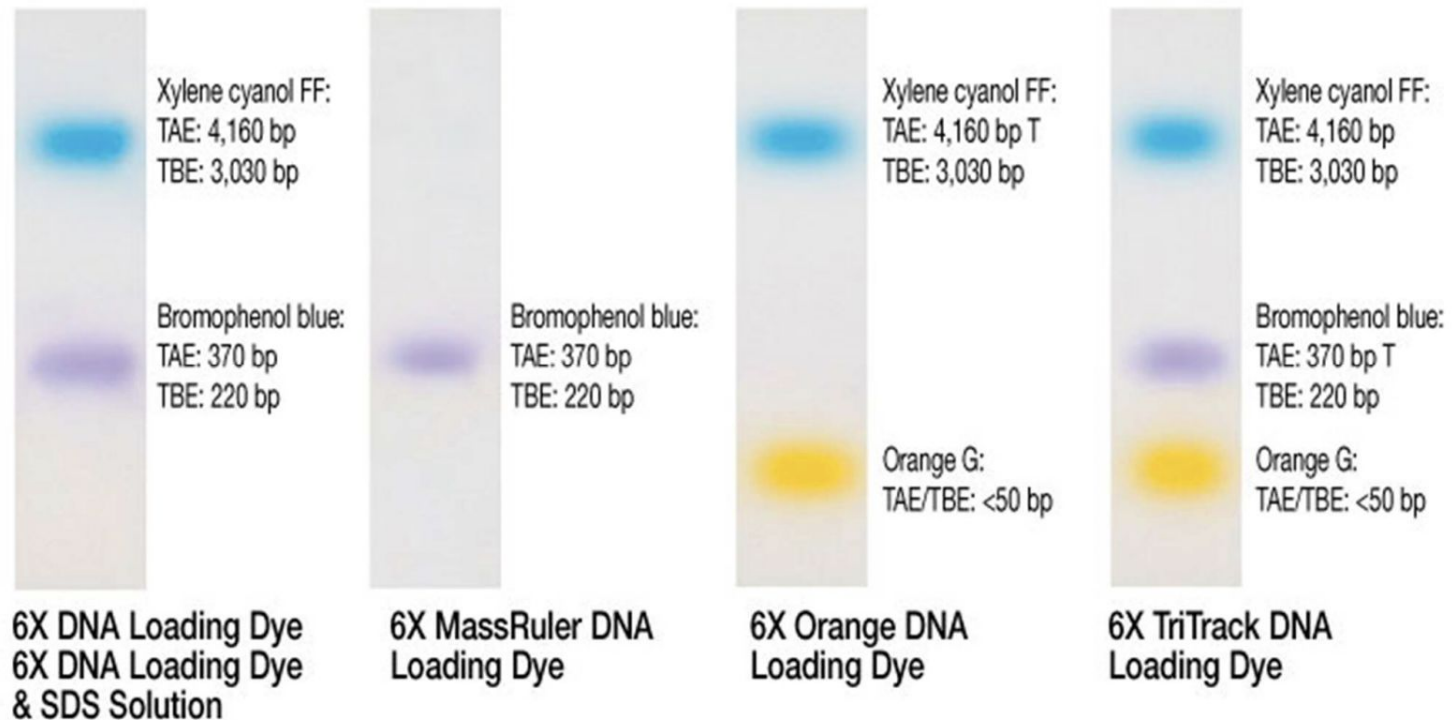


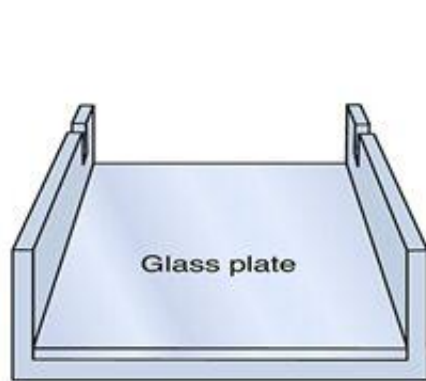
0,8%

Gel Loading buffer

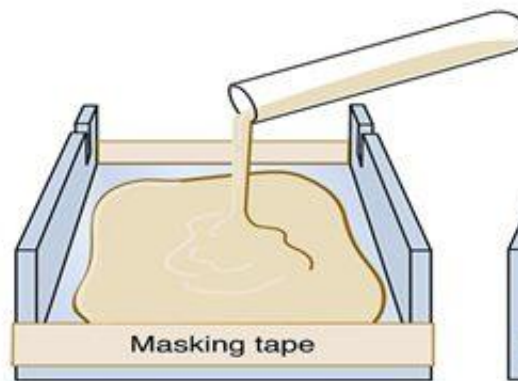


□ usado para aumentar a densidade da amostra (Glicerol) e dar cor a amostra: Azul de Bromofenol (migra mais rápido), Xileno, Cianol

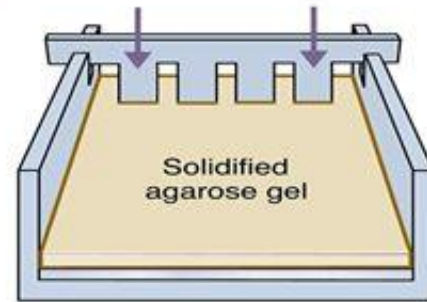




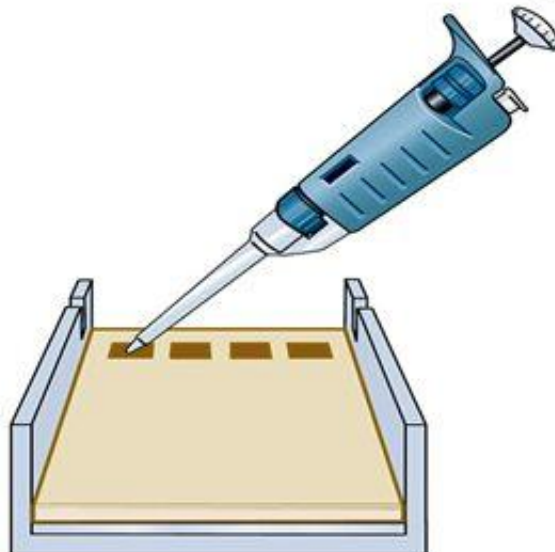
A. Casting tray



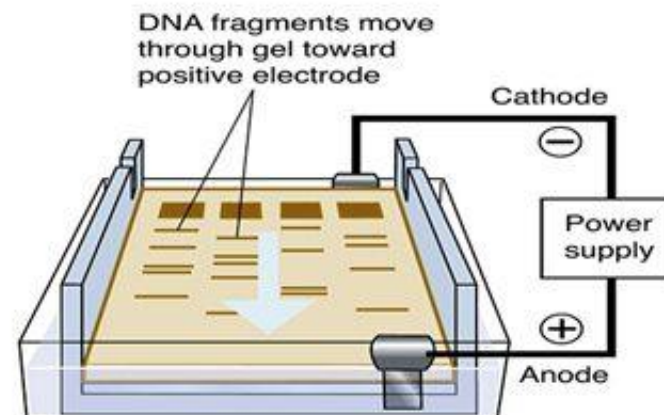
B. Pouring agarose solution onto glass plate



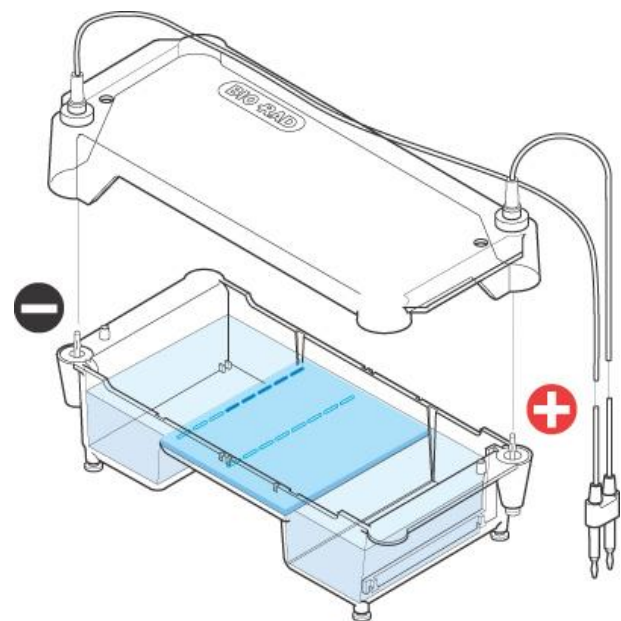
C. Comb is pushed down into gel to form wells



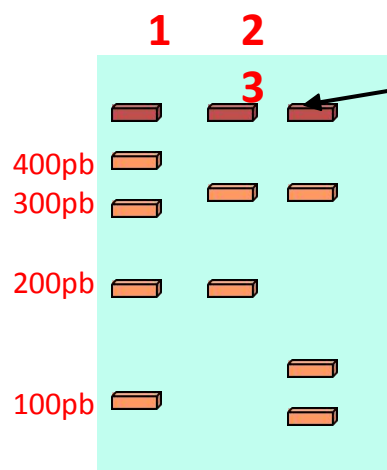
D. DNA segments loaded into wells with micropipette



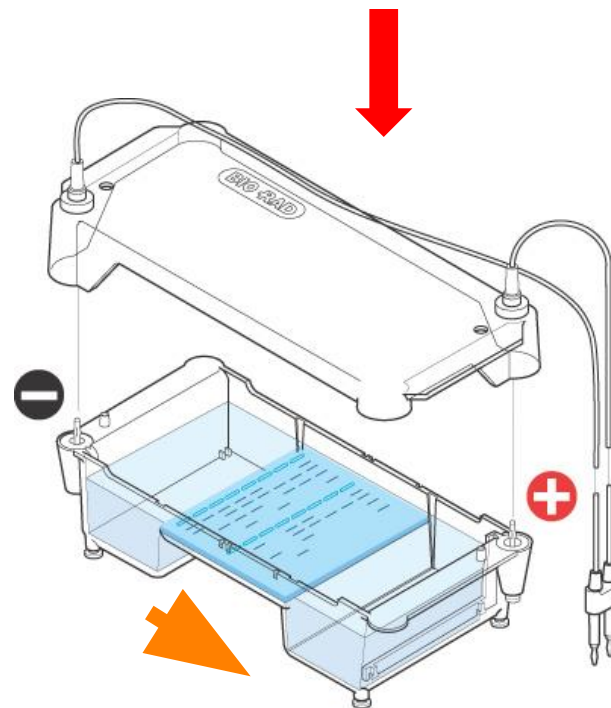
E. Gel plate immersed in charged buffer solution



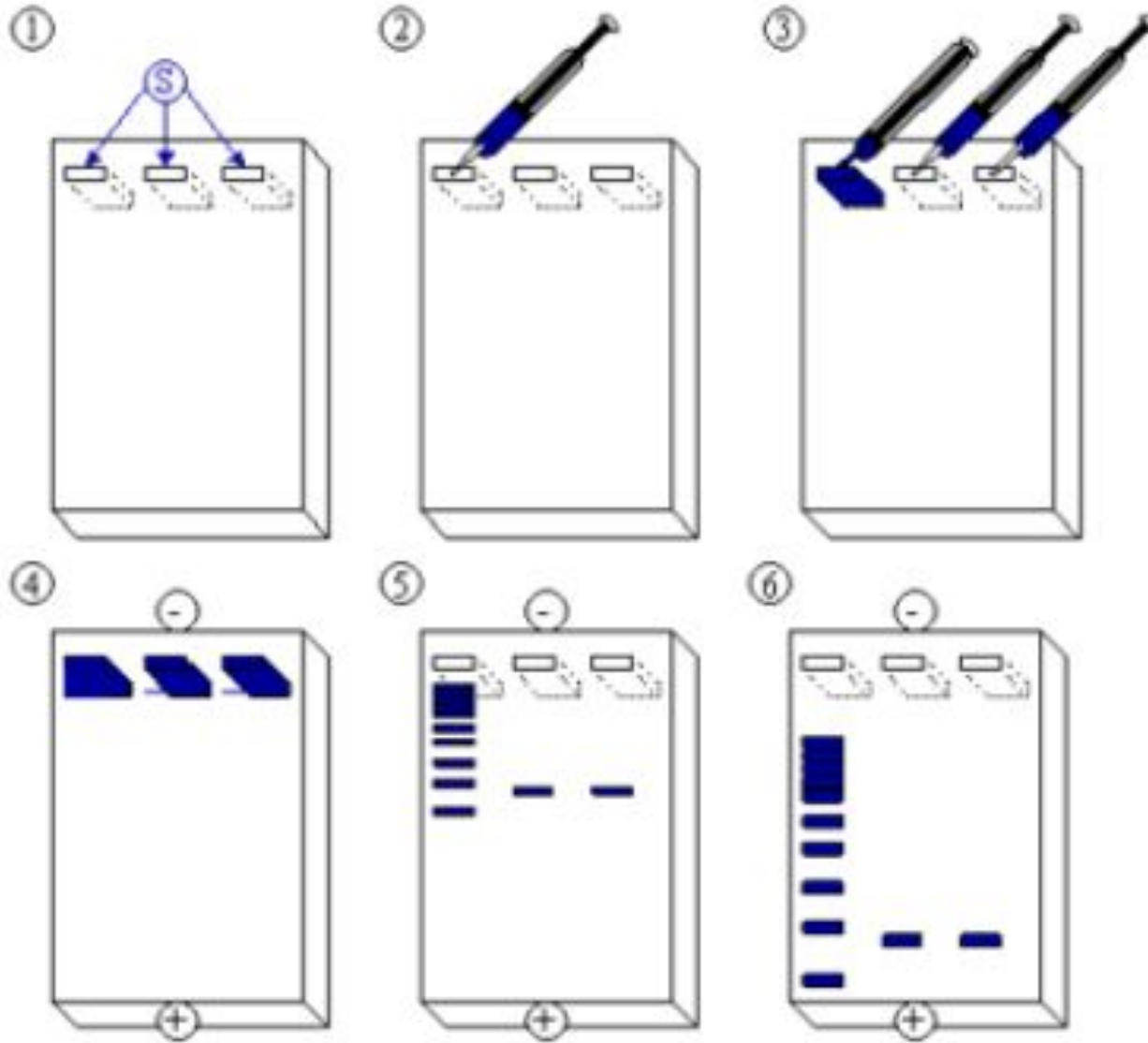
Poços para aplicação das amostras de DNA



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



Aplicação das amostras de DNA

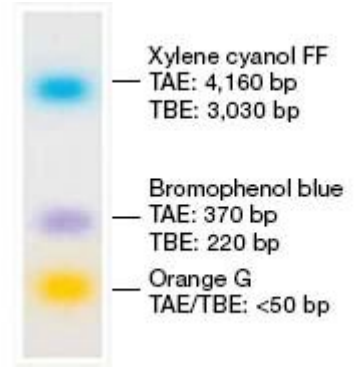


Eletroforeses de DNA

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 ~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.

Eleetroforeses de DNA



Grupo 1:

PCR-gDNA-2
PCR-gDNA-2
PCR-pDNA-2
PCR-pDNA-1
DNA plasmidial-2
DNA plasmidial-1
gDNA Bacteria-2
gDNA Bacteria-1
Marcador DNA

Grupo 2:

PCR-gDNA-2
PCR-gDNA-2
PCR-pDNA-2
PCR-pDNA-1
DNA plasmidial-2
DNA plasmidial-1
gDNA Bacteria-2
gDNA Bacteria-1
Marcador DNA

Corante de DNA SYBR

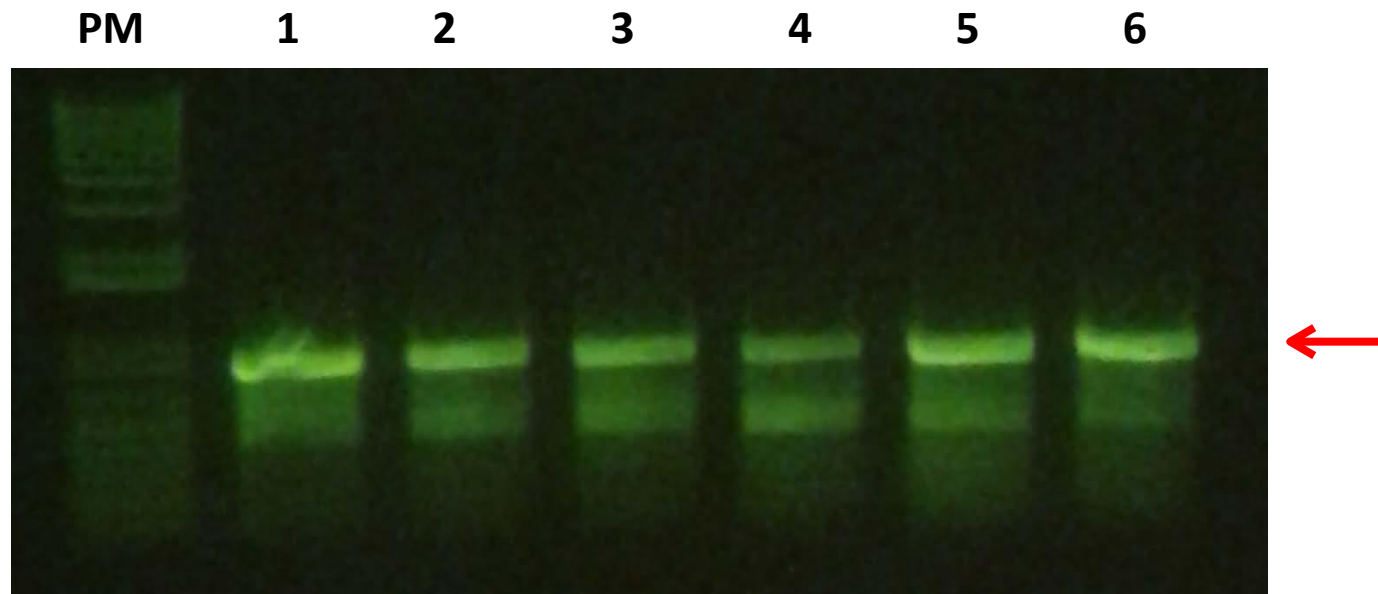
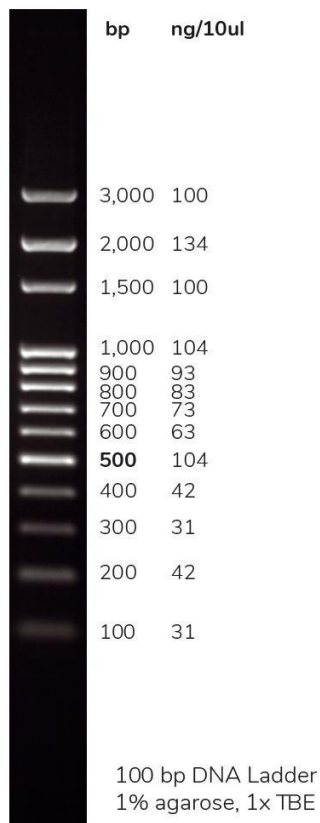


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR do gene ApoB apartir de ghDNA obtido de mucosa oral.

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.

100 BP DNA LADDER



Solis BIODYNE cat 07-11-00050

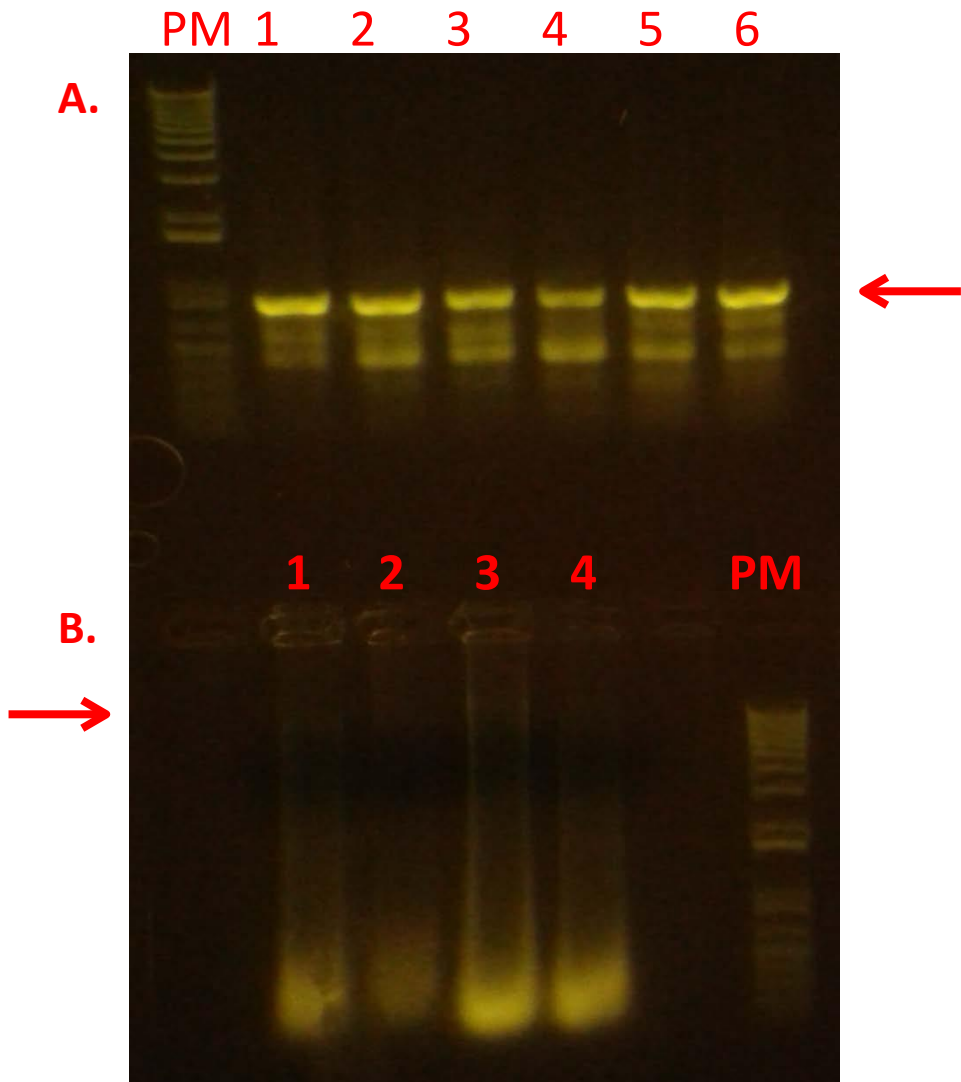


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de hDNA. A. PCR do gene APO a partir de DNA obtido de mucosa oral. Linha 1: amostra # 1; linha 2: amostra # 2; linha 3: amostra # 4; linha 4: amostra # 5; linha 5: amostra # 7; linha 6: amostra # 8. Aplicados 5 uL de ghDNA + 5 uL de tampão de corrida, corante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

Eletroforeses de DNA em gel poliacrilamida

Corante: Nitrato de prata



Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% de PCR do gene minicírculo a partir de gDNA obtido amostra de medula de paciente com suspeita de leishmaniose. Linha 1: ladder # 1; linha 2: amostra # 1; linha 3: amostra # 2; linha 4: amostra # 3; linha 5: amostra # 4; linha 6: amostra Leishmania # 5 ; linha 7: branco. Aplicados 10 uL de PCR + 5 uL de tampão de corrida, corante Nitrato de Prata

pDNA e PCR em gel agarose

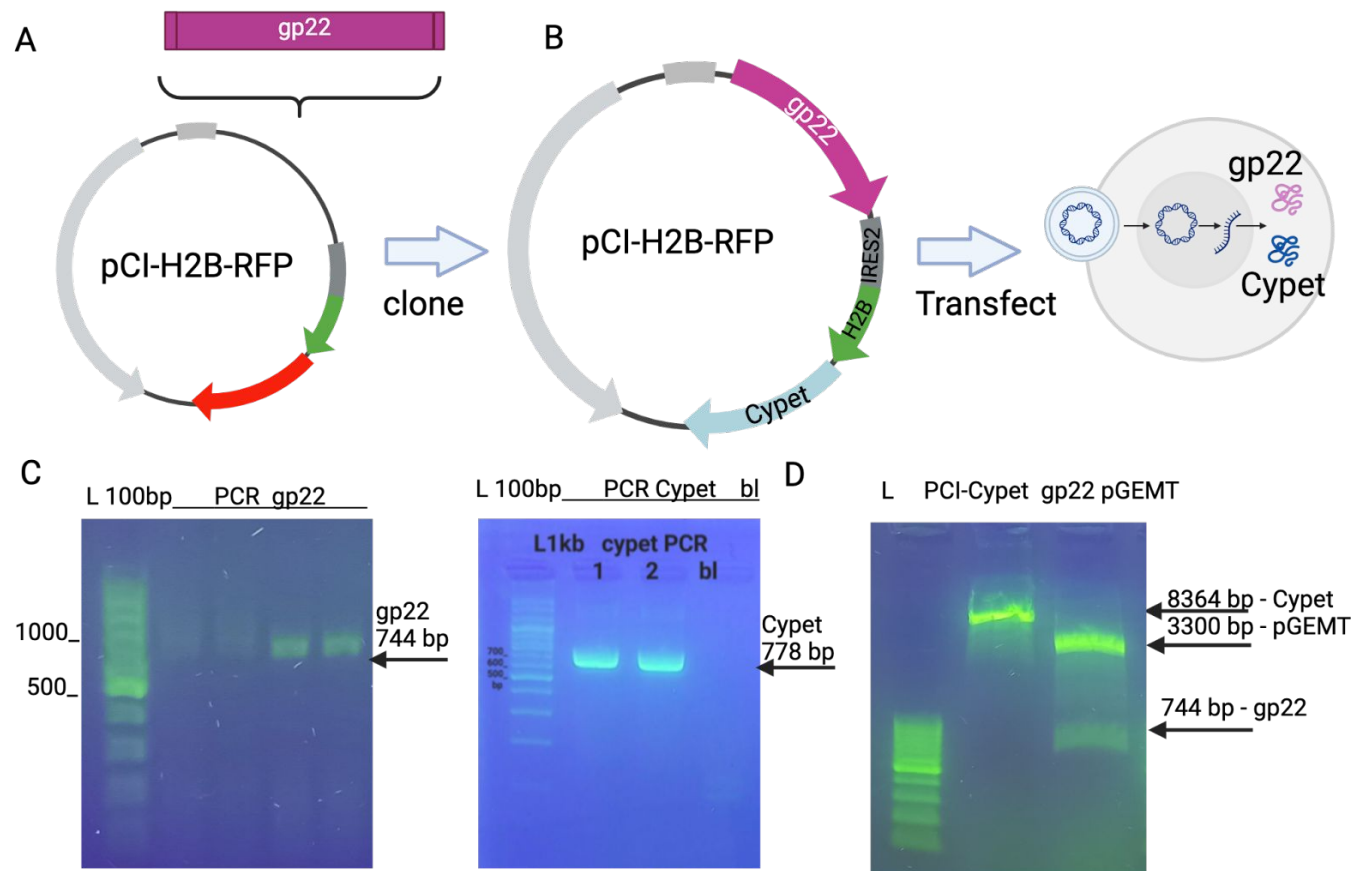


Figura 4. O tamanho do fragmento de PCR gp22/CYBA (744 pb) foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, o fragmento de PCR foi clonado em vetor pGEMT utilizando enzimas compatíveis com ligação por digestão para posterior clivagem com enzimas de restrição *AscI*/*XhoI* para clonagem no vetor pCI-H2B-Cypet. A substituição do mRFP1 por CyPet em pCI-H2B-RFP, foi realizado a partir da amplificação do Cypet oriundo do vetor H2B-Cypet

RNA em gel agarose

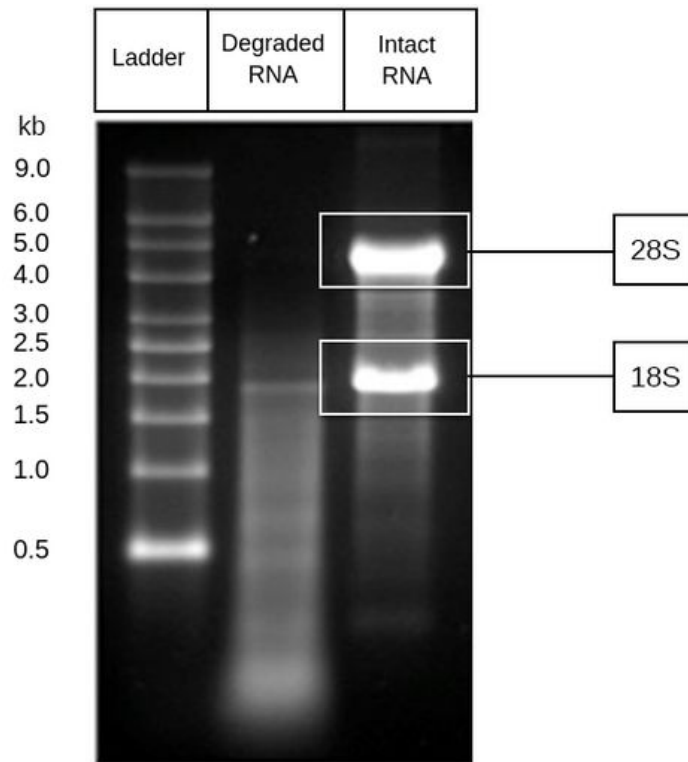


Figura 5. Análise da integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1%.

Linha 1:Ladder

Linha 2: RNA degradado

Linha 3: RNA íntegro