



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 (sandrammuxel@usp.br)

Monitores:

MSc. Brisa Moreira Gomes (brisamoreira@usp.br)
Camile Penha de Freitas (camile.penha@usp.br)

Servidores não-docentes:

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

Créditos: 4

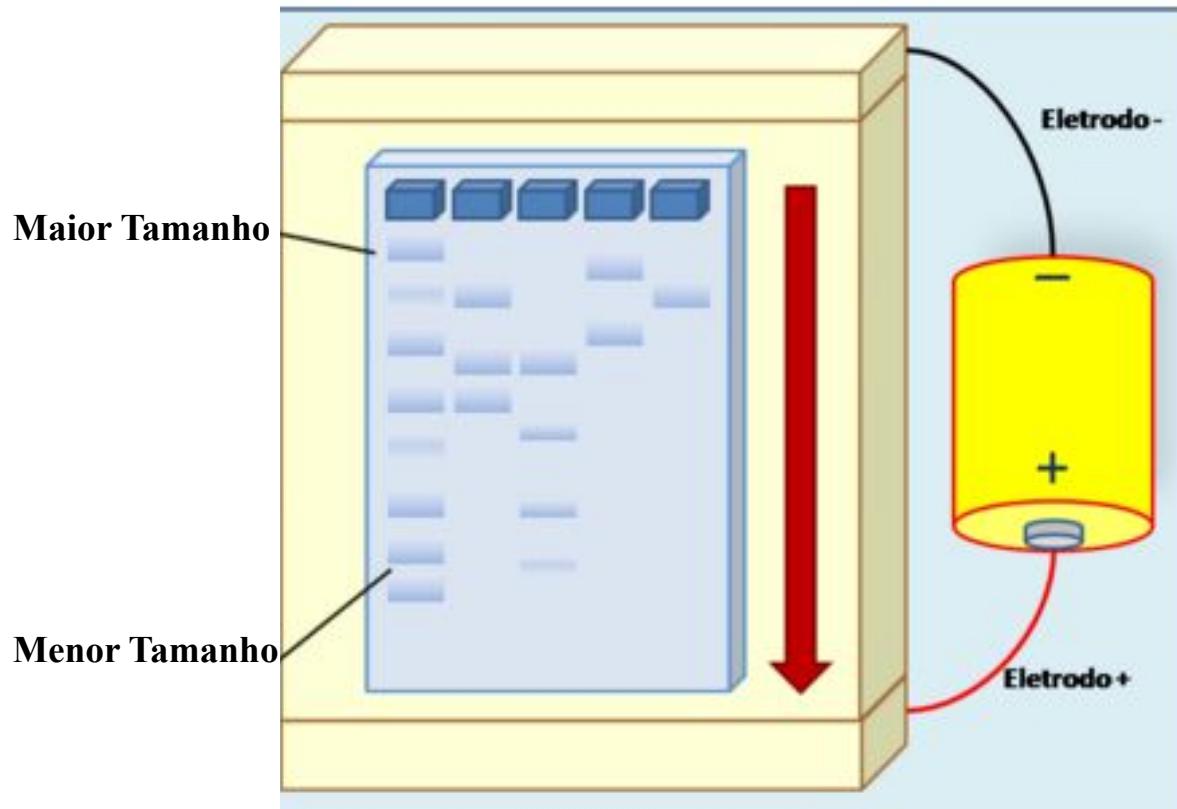
Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

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 peptídos

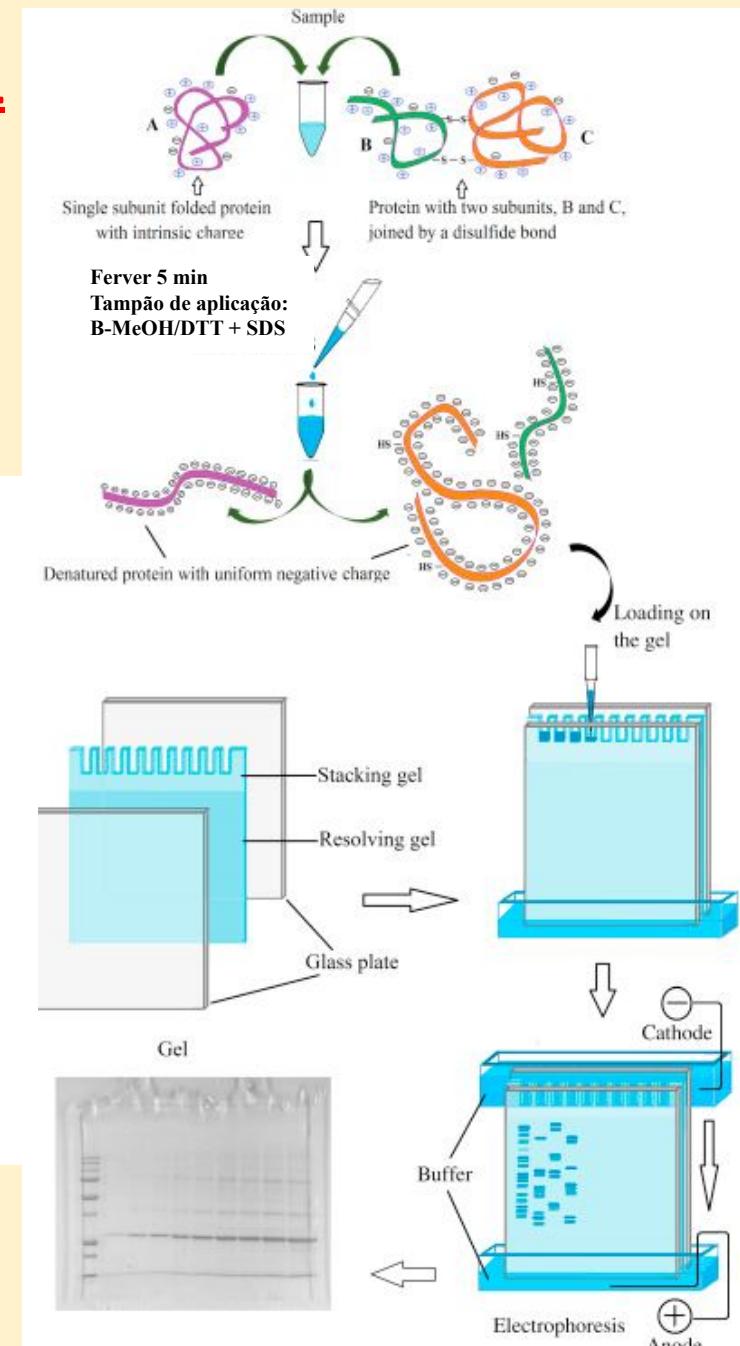
- Eletroforese em papel (acetato de celulose, uso: separar aminoácidos e peptídos).
- Eletroforese em gel acrilamida:bisacrilamida.
- Eletroforese bidimensional (separação por: ponto isoelétrico e peso molecular).

Para separar DNA

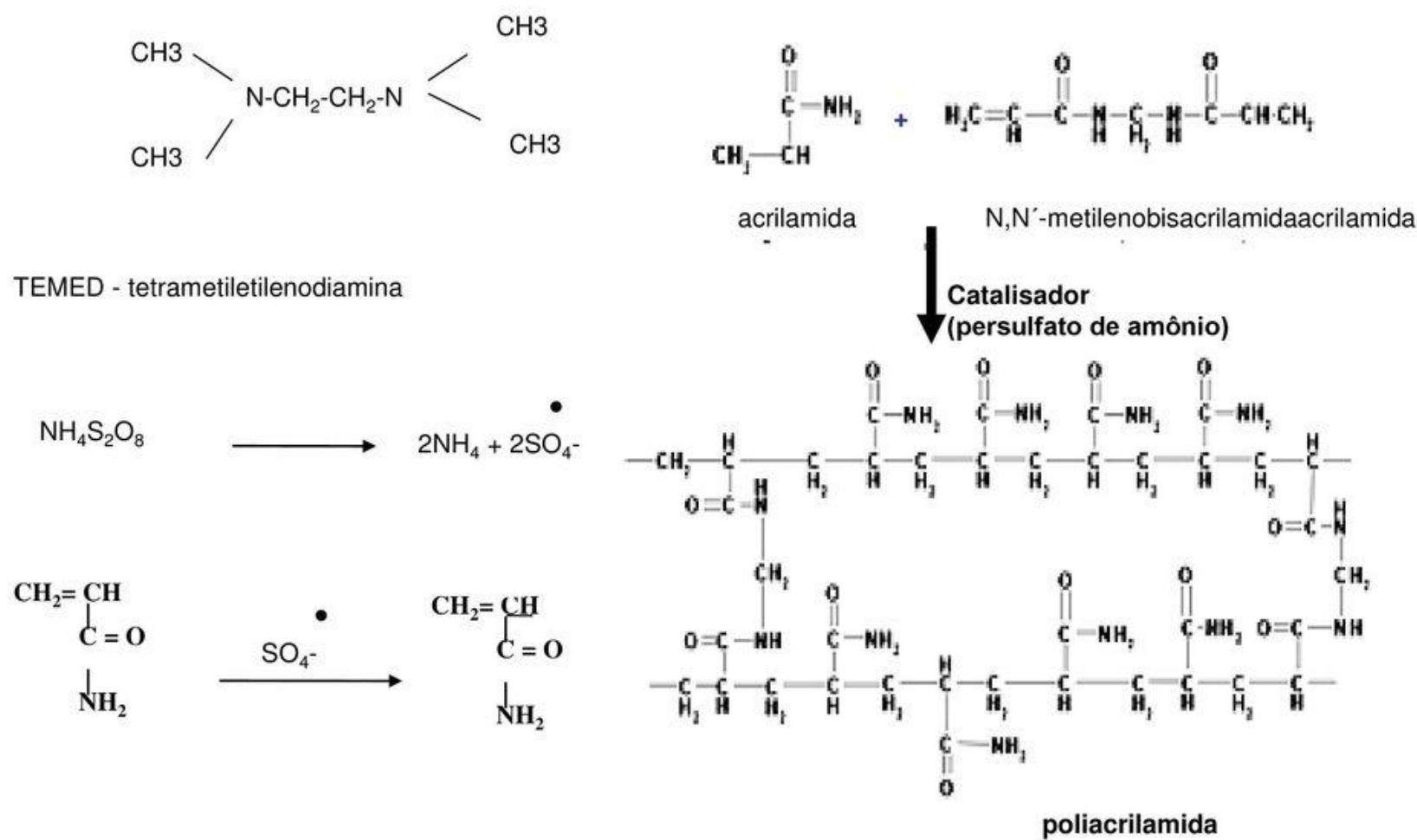
- Eletroforese em gel de agarose.
- Eletroforese capilar (sequenciamento de DNA, utiliza-se capilares de sílica fundida a potenciais elevados 20 a 30 kV em um campo de 400 a 500 v/cm refrigerados por ar).
- Eletroforese de campo pulsado (separa grandes moléculas (até 600kb), cromossomos inteiros , utiliza-se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

SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

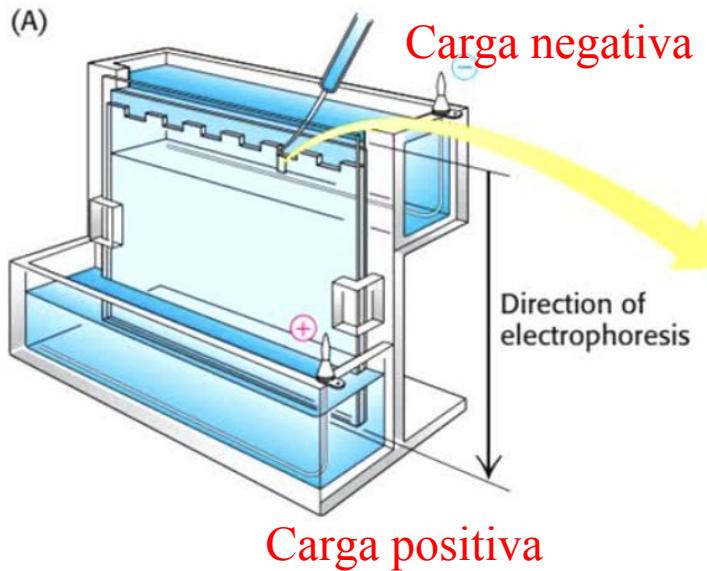
Eletroforese de proteínas: SDS-PAGE



- O **suporte** mais utilizado para conduzir a eletroforese de proteínas é o gel de poliacrilamida, em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE)



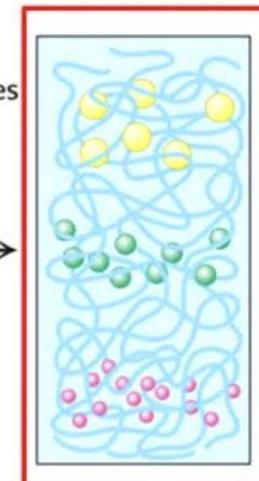
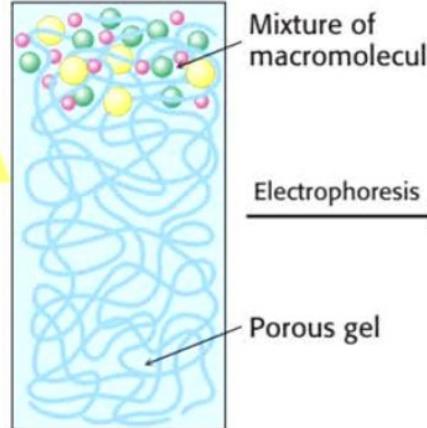
SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

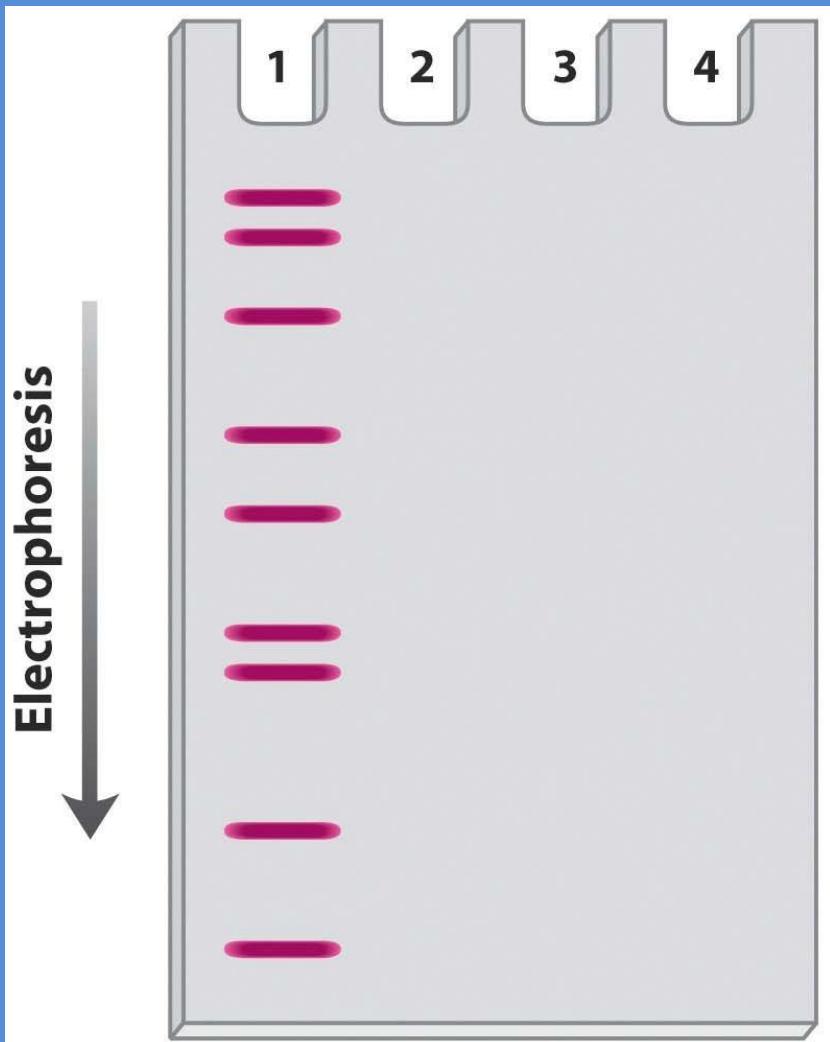
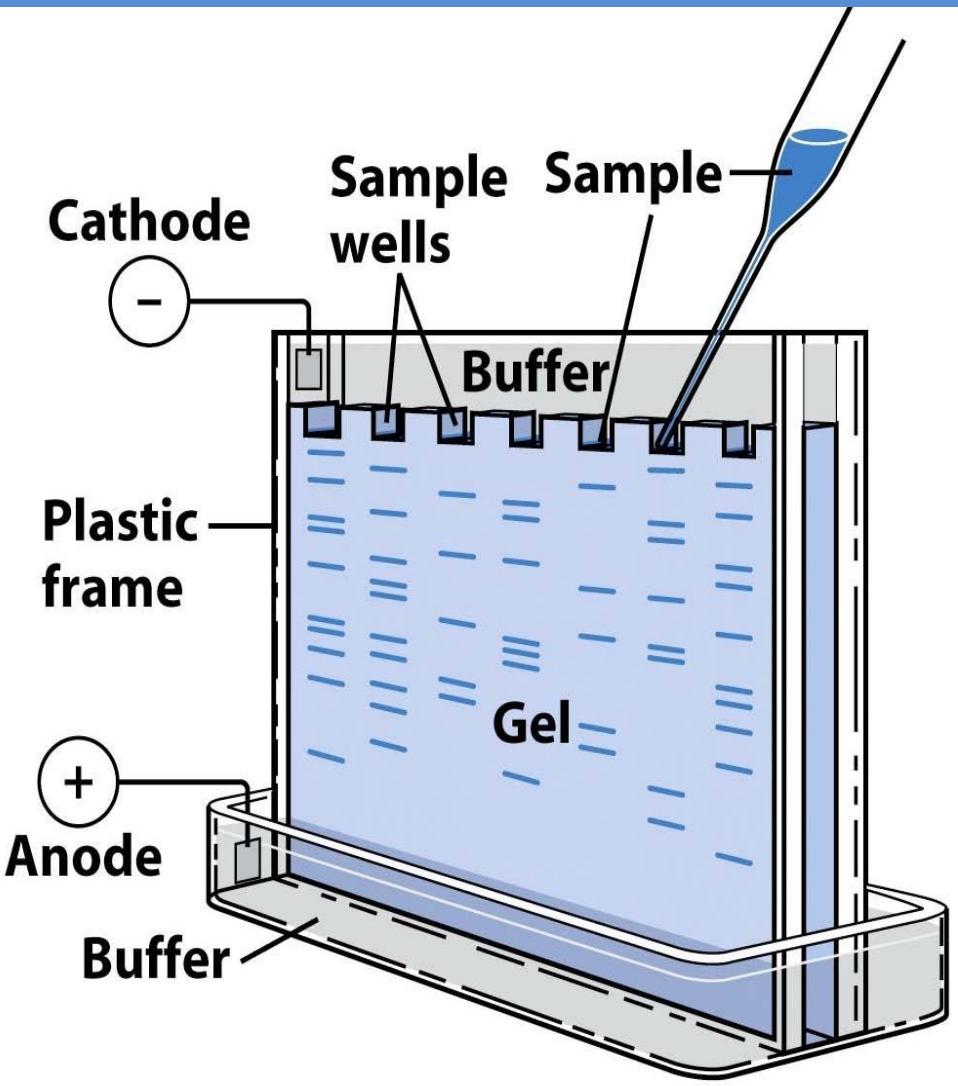


(B)

Eletroforese em gel de acrilamida.

Separação de moléculas por carga.

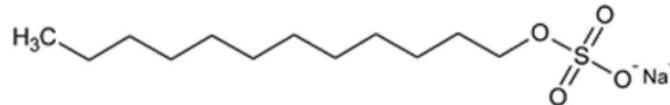




ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

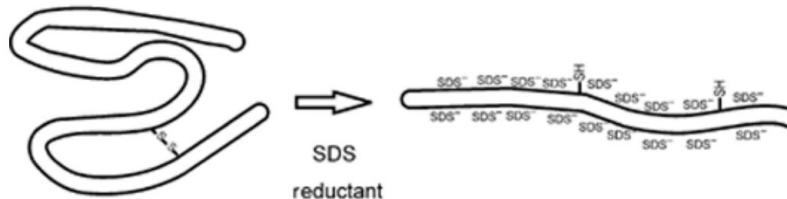
ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

A



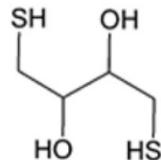
sodium dodecyl sulfate

B



SDS
reductant

C



dithiothreitol

D



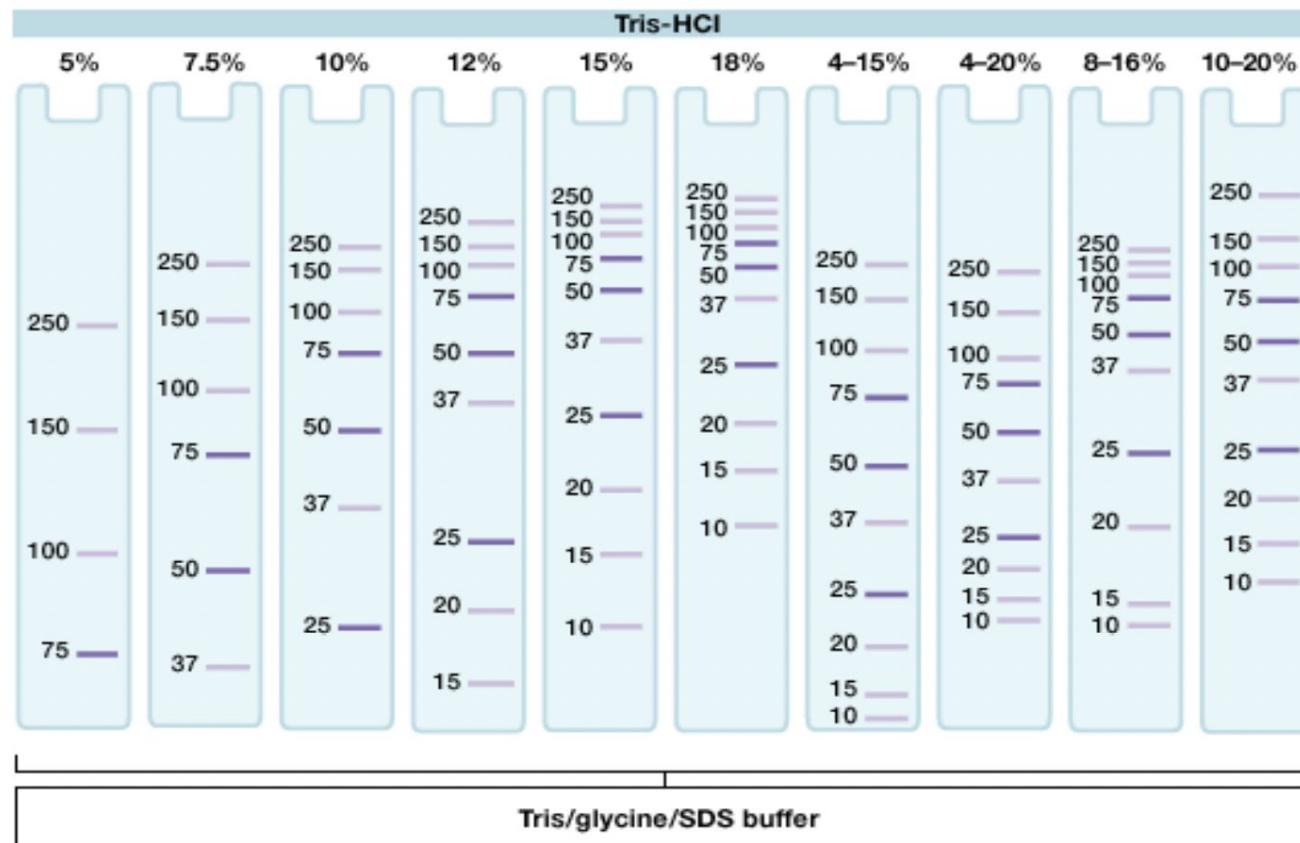
2-mercaptopropanoic acid

- Permite análise direta da **MASSA** em função do **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

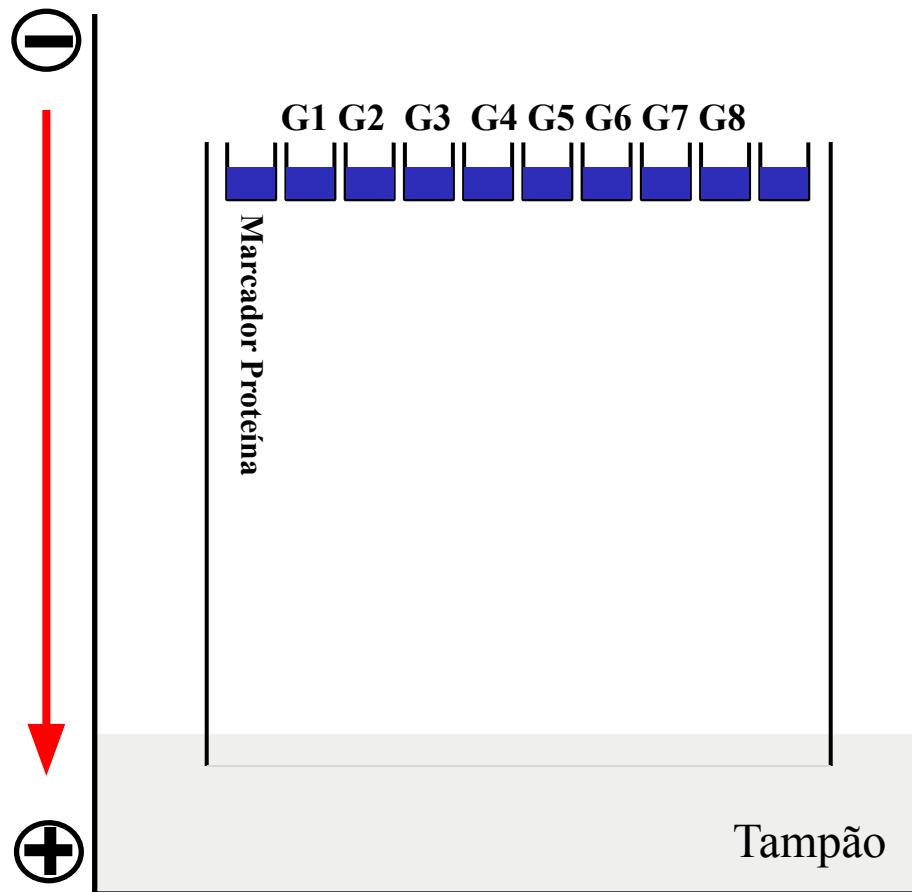


Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE

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 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

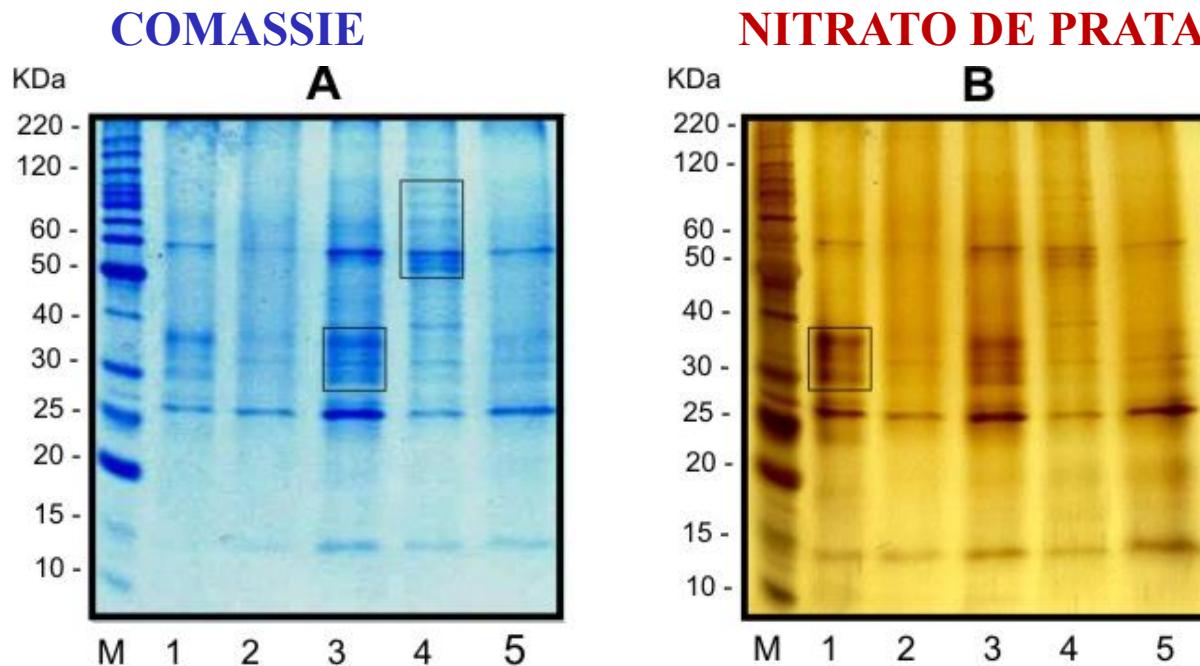
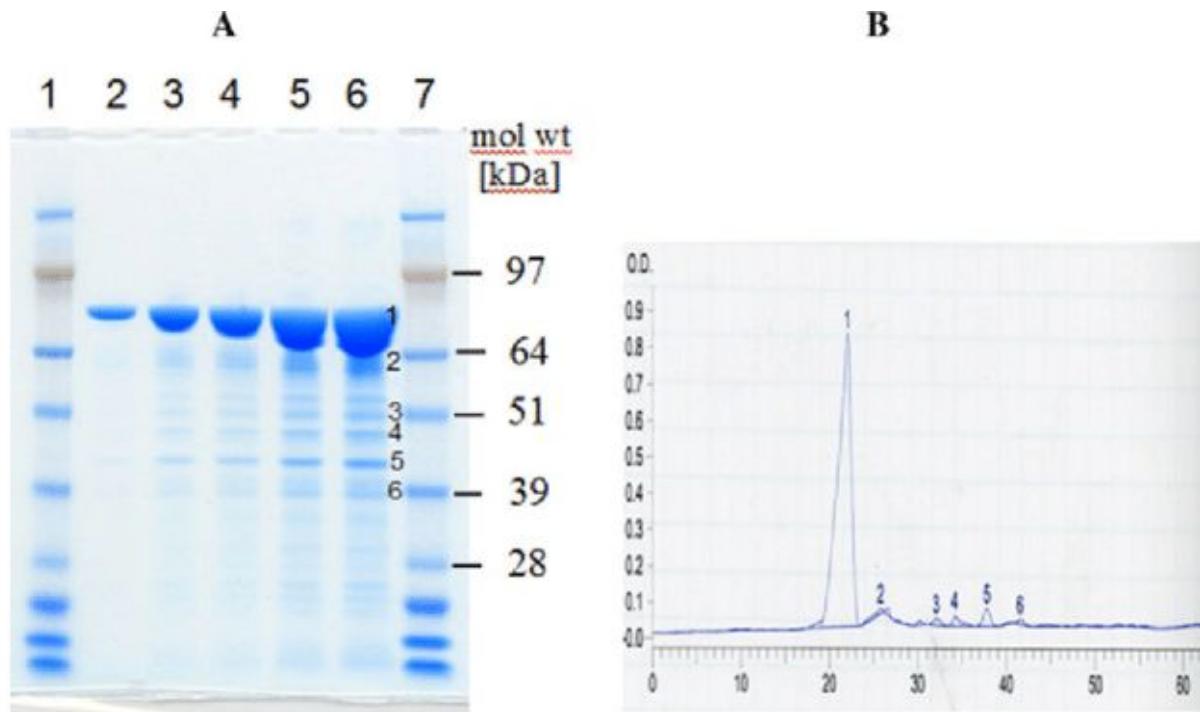


Figura 6 - Análise eletroforética (SDS-PAGE) de extratos protéicos (3 µg) de raízes de *P. tuberculatum* Jacq. Em A, coloração com azul de Coomassie, em B, coloração com nitrato de prata. M- Marcador molecular (KDa), 1 – Extrato protéico obtido com tampão salino; 2 – Extrato protéico obtido com tampão 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

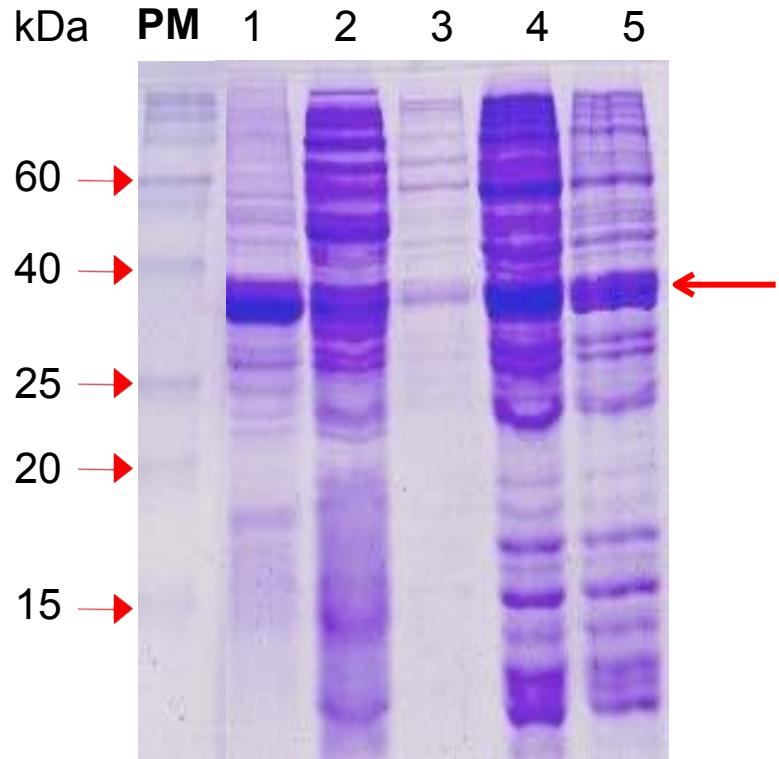


Figura 7. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10 μ L); Linha 2 – fração solúvel (10 μ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna ‘HiTrap Chelating’ carregada com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

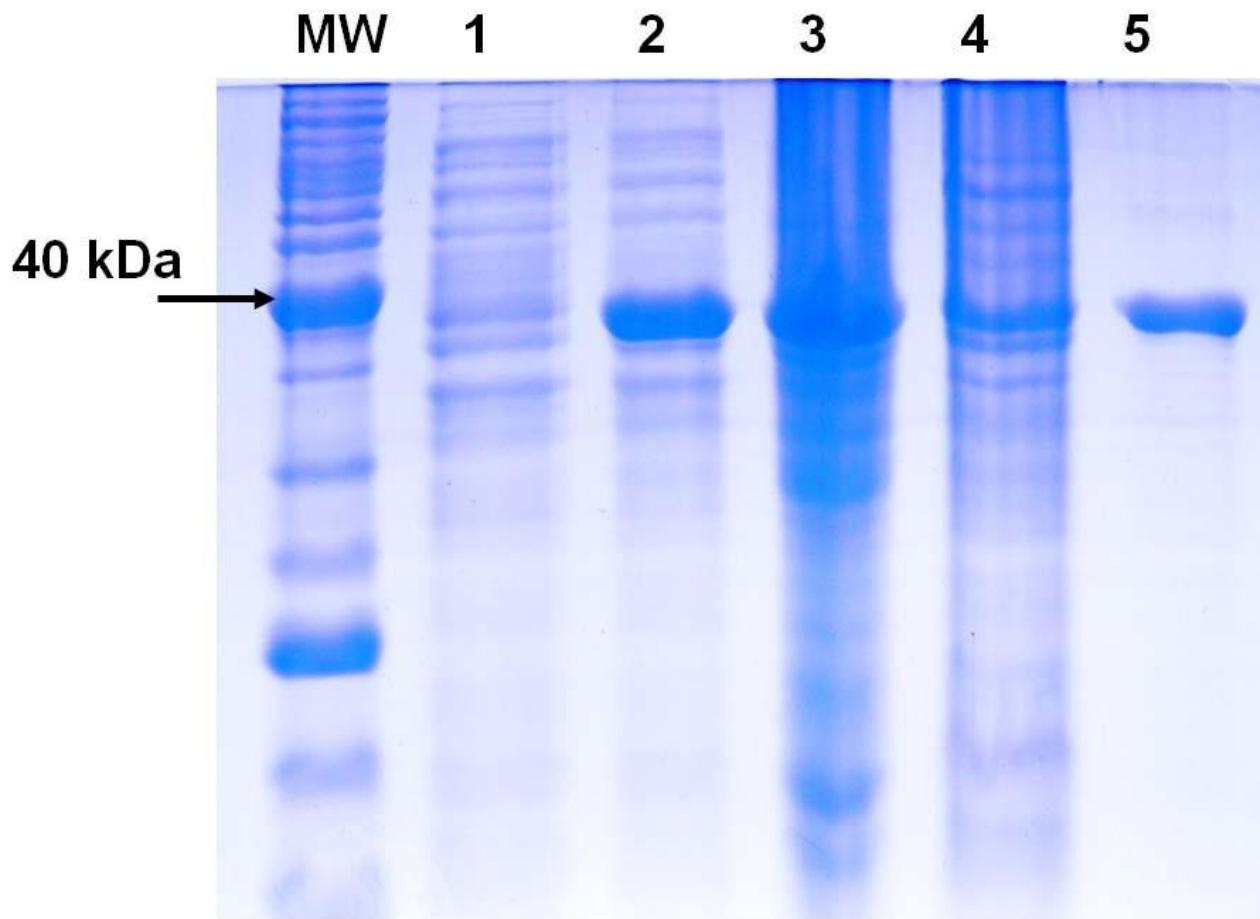


Figura 8 – Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína recombinante TrEH2, em *E. coli* BL21. (1) Amostra de 20 µL da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20 µL da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20 µL do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel); (4) Amostra de 20 µL do sobrenadante do lisado bacteriano (solúvel); (5) Amostra de 20 µL das frações coletadas após a purificação. (PM) peso molecular BenchMark protein ladder (Invitrogen).

Eletroforeses 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

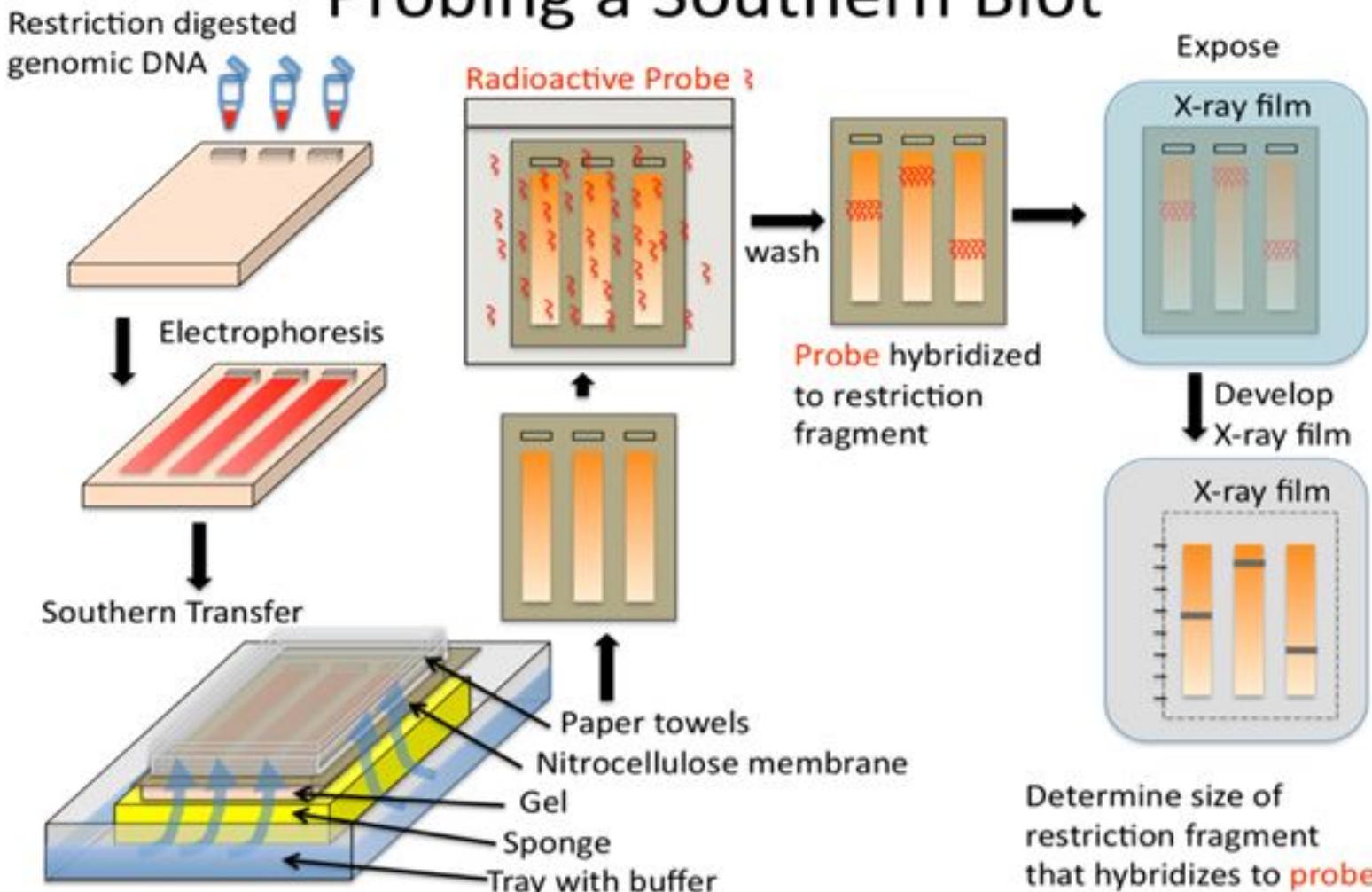
Southern Blot - DNA

Northern Blot - RNA

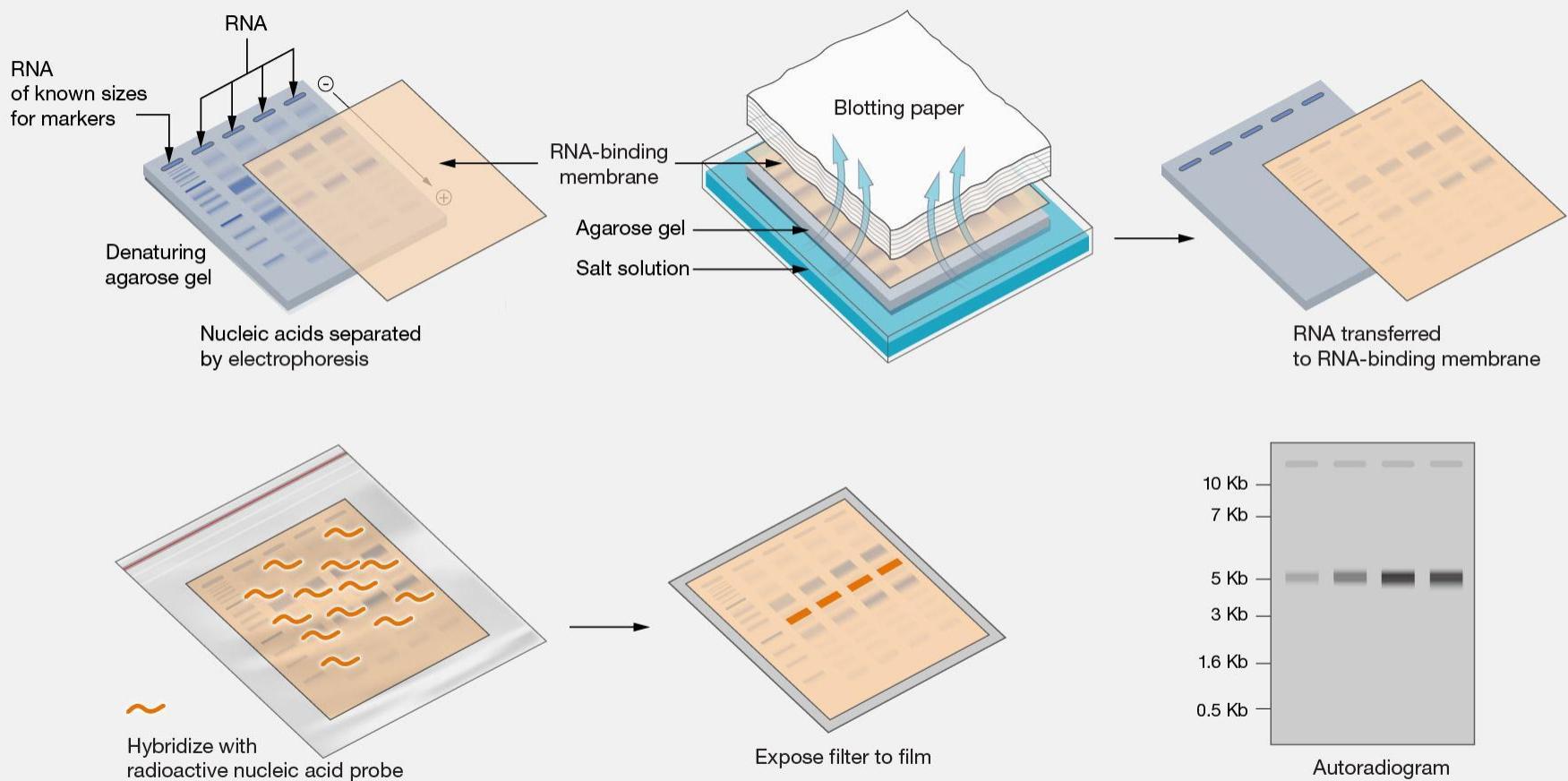
Western Blot - Proteínas

Southern blot

Probing a Southern Blot

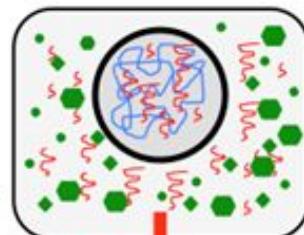


Northern blot



Cell with DNA, RNA, & Protein

(DNA)

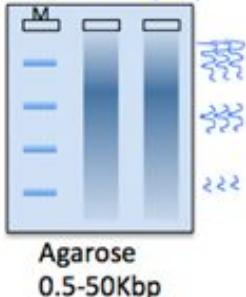


(RNA)

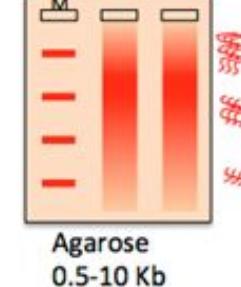
(Protein)

Southern Blot (Restriction Enzyme)

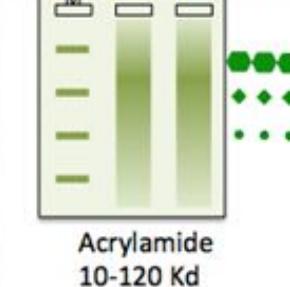
Gel
Electro-
phoresis



Northern Blot (Single stranded)



Western Blot (Deanatured polypeptides)



Transfer separated samples to membrane

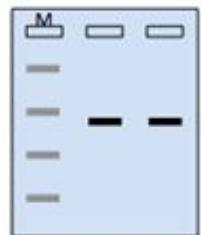
Probe
Mem-
brane:

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

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

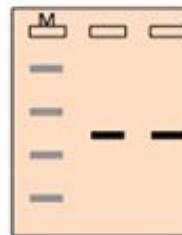
Primary antibody
to specific polypeptide
Use Secondary antibody
to detect/amplify

Results:



Sample contains specific
DNA restriction fragment

Can measure fragment size
and amount (single vs. repeated)



Sample contains specific
RNA transcript (e.g. mRNA)

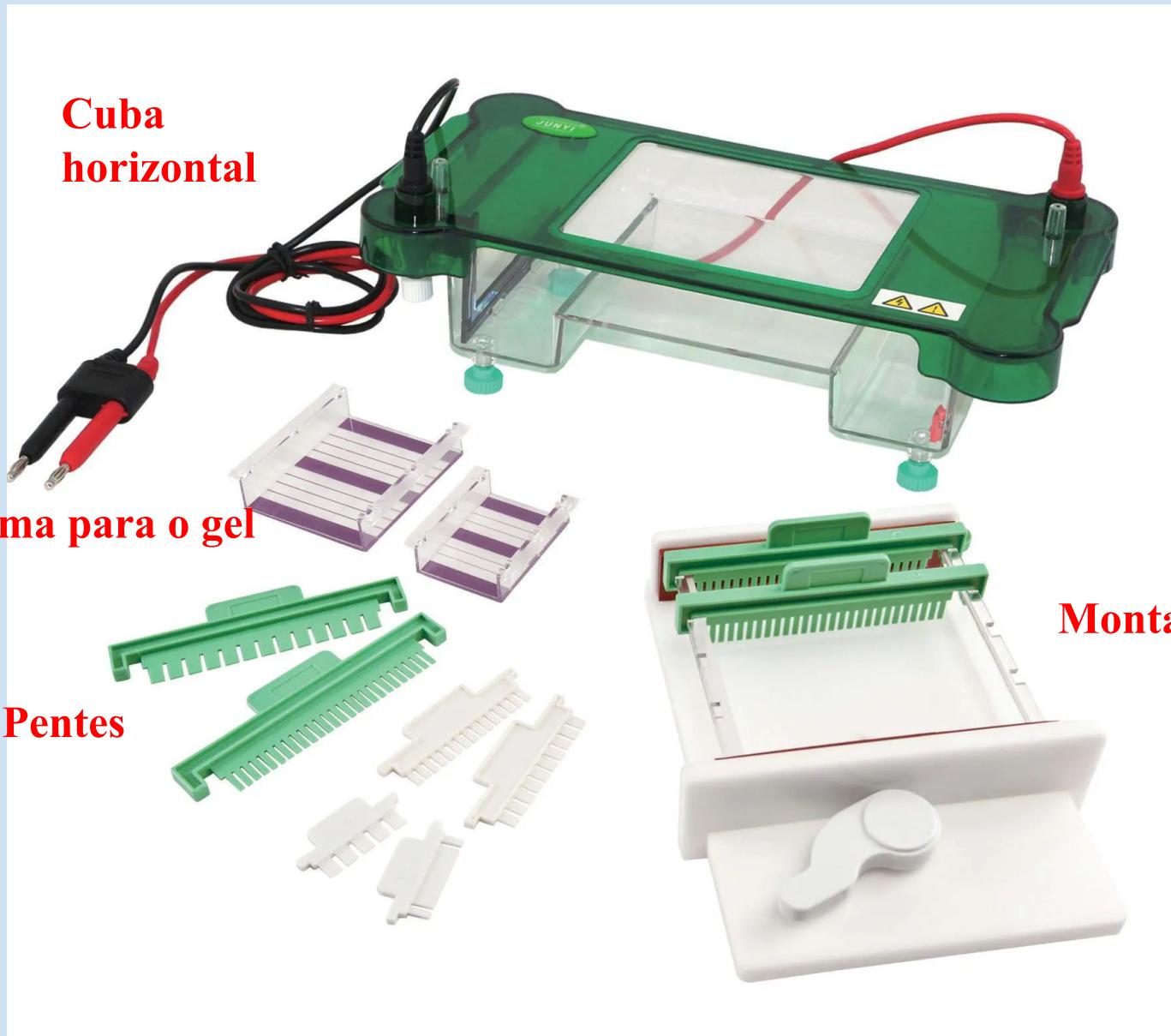
Can measure fragment size
and amount (level of expression)



Sample contains specific
Polypeptide

Can measure polypeptide size
and amount (level of expression)

SISTEMA DE ELETROFORESE HORIZONTAL

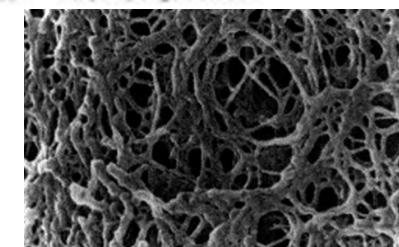
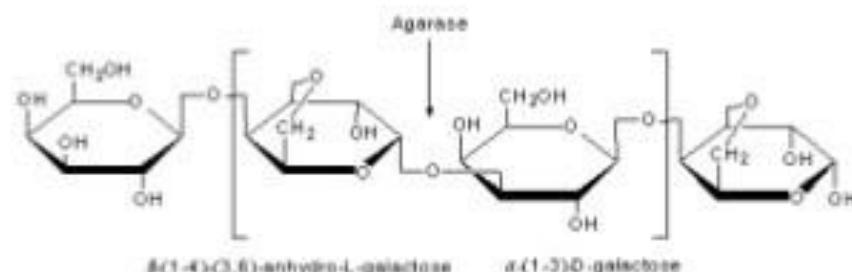
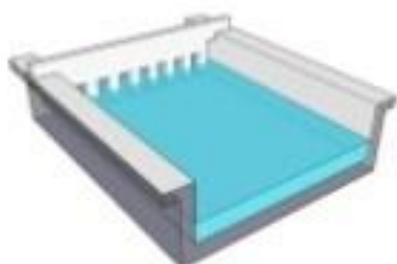
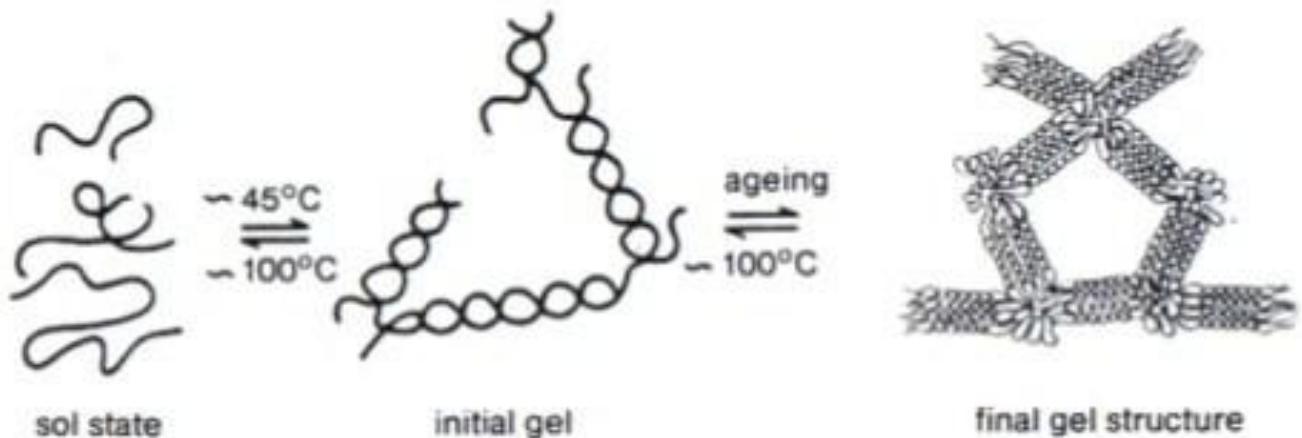


Gel de Agarose

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

Agarose gelifica - não há polimerização!

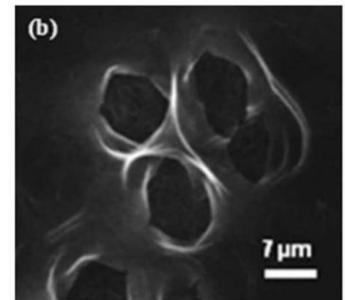
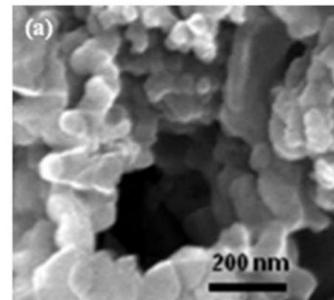
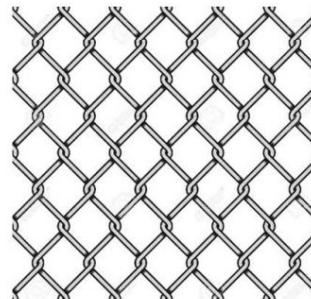
% de agarose
no gel varia
com a amostra
em análise



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

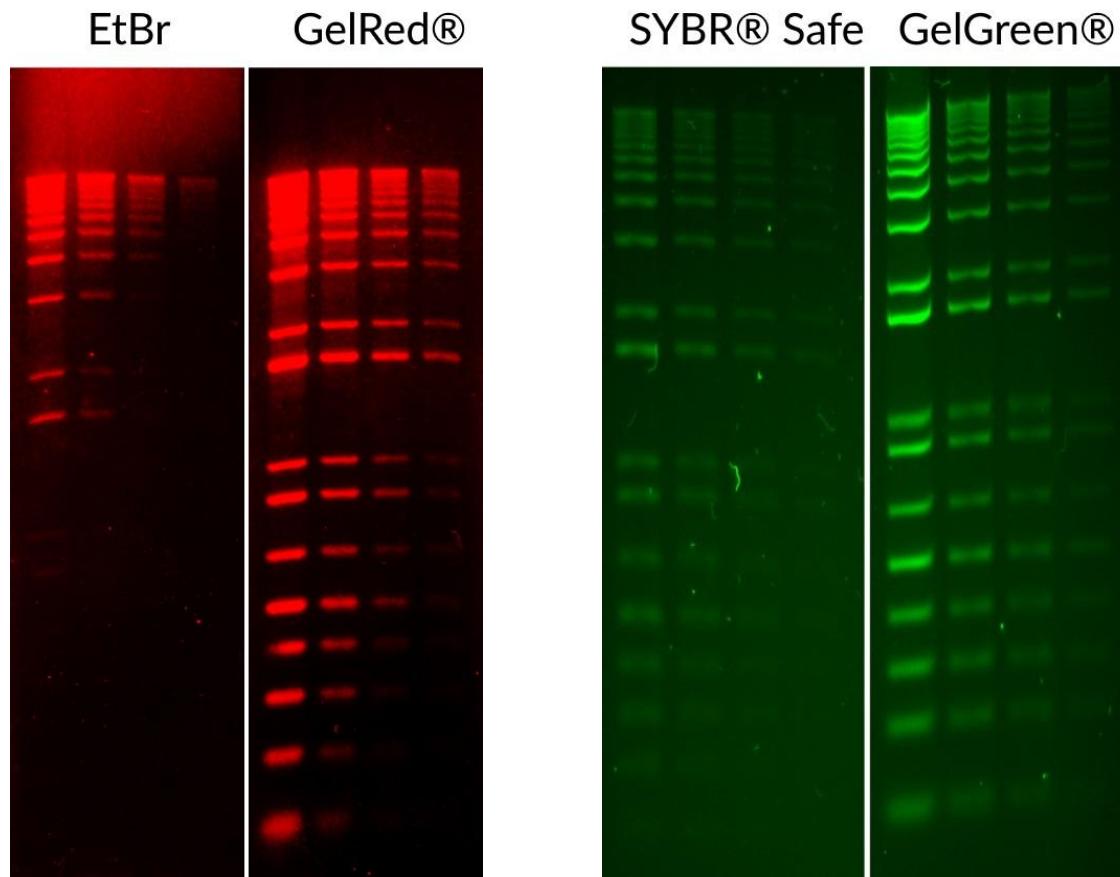
Sambrook et al., "Molecular Cloning" 3 ed - 2000



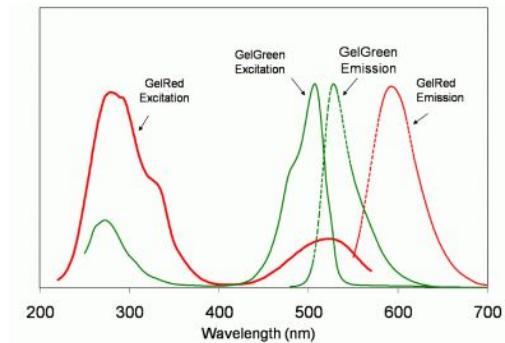
1%

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)



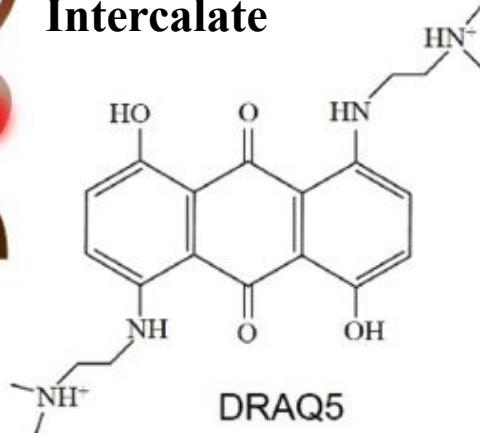
Espectros de excitação e emissão de GelRed® e GelGreen® com DNA

Corante de DNA SYBR

A



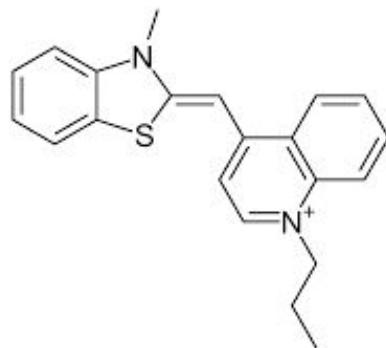
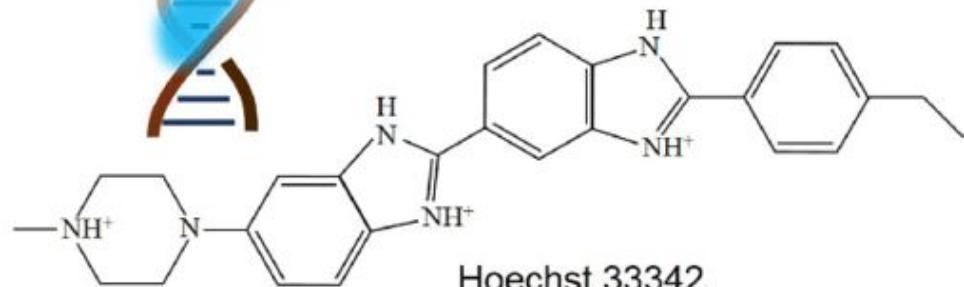
Intercalate



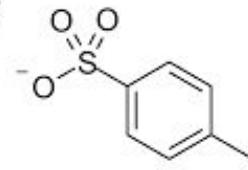
B



Groove binding
Sulco do DNA



SYBR Safe

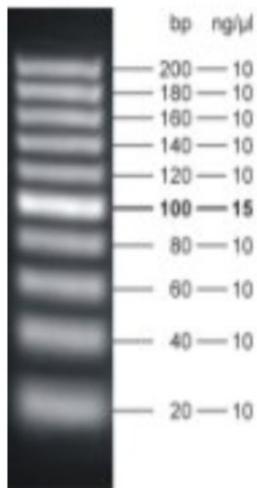


Os intercalantes são moléculas que possuem anéis planares, e essa estrutura permite que se encaixem no espaço entre os pares de bases empilhados da dupla hélice do DNA

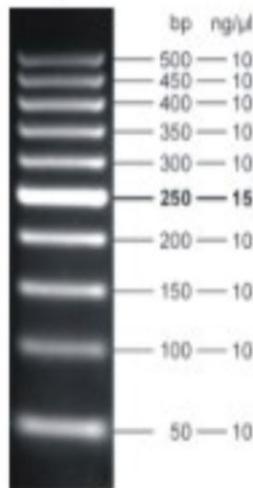
As moléculas de groove (sulco maior e menor)binding interagem com os grupos funcionais nas bases do DNA, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals

Ladder

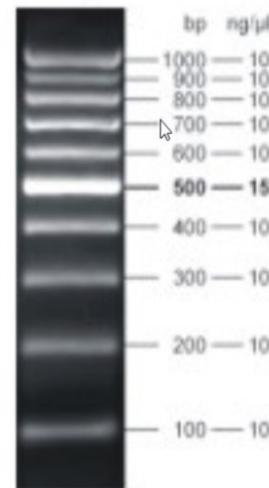
20 pb DNA Ladder



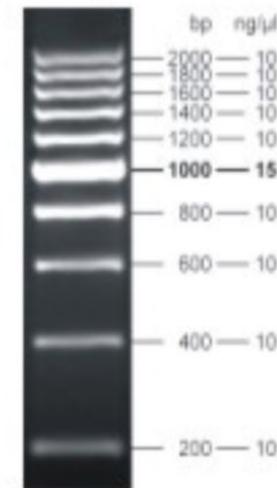
50 pb DNA Ladder



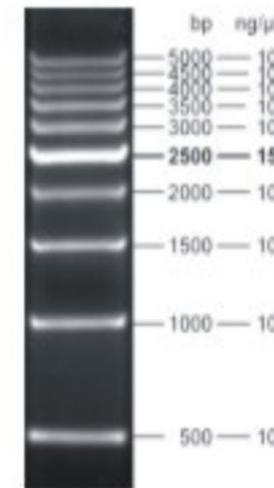
100 pb DNA Ladder



200 pb DNA Ladder



500 pb DNA Ladder



1 Kb pb DNA Ladder



3,4 %
Agarose

3,0%

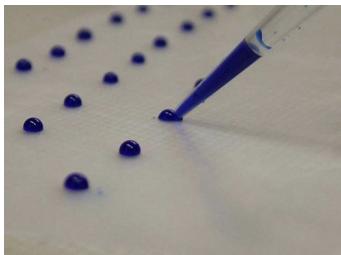
2,4%

1,8%

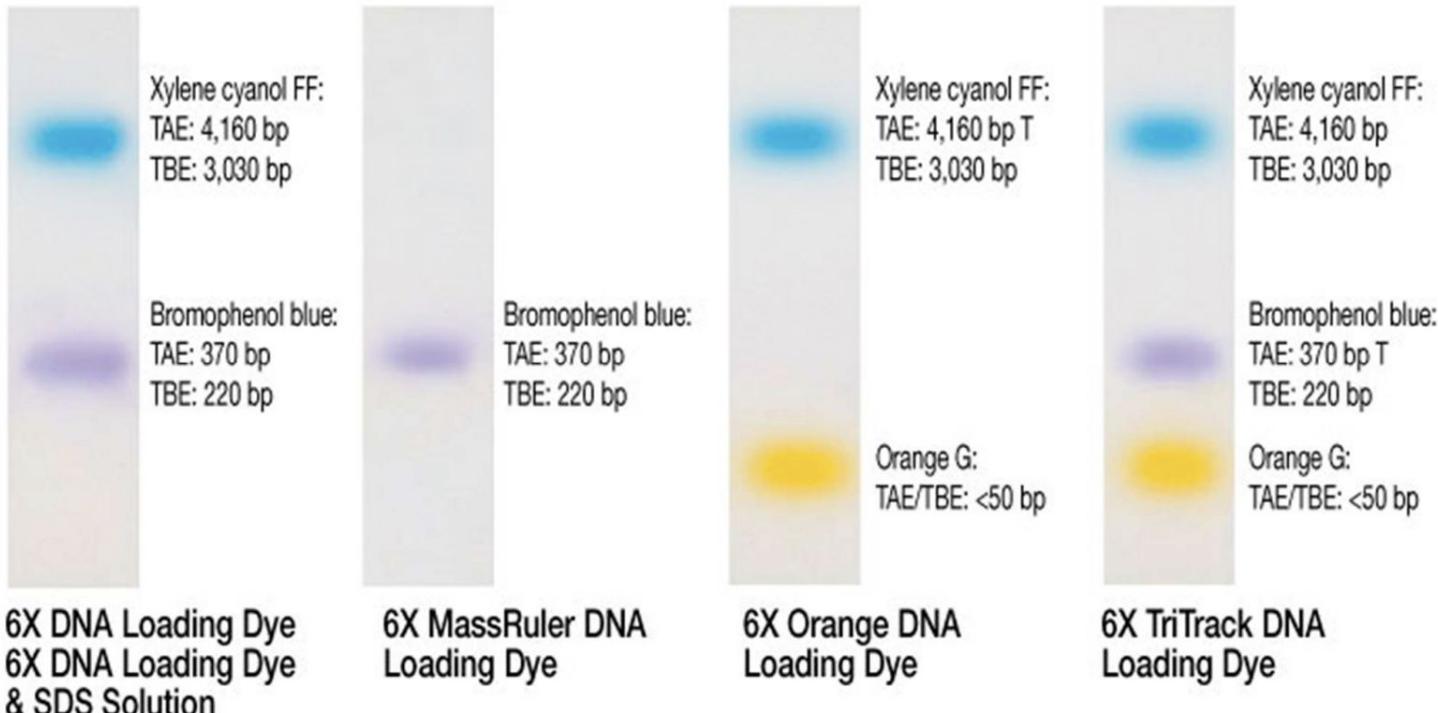
1,2%

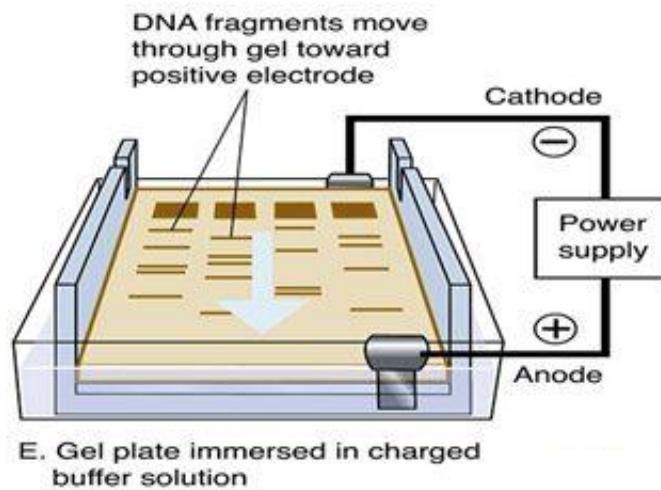
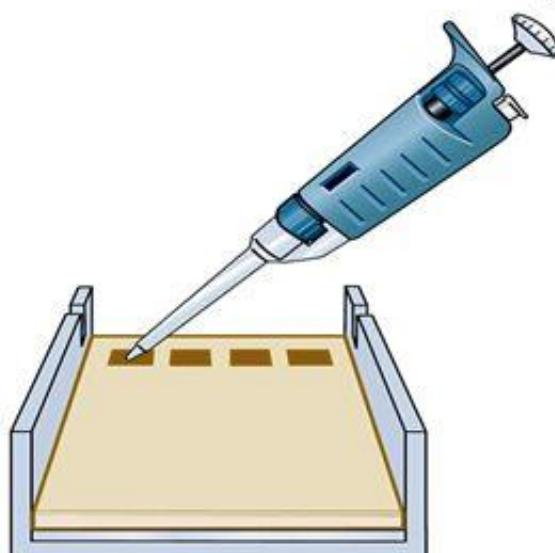
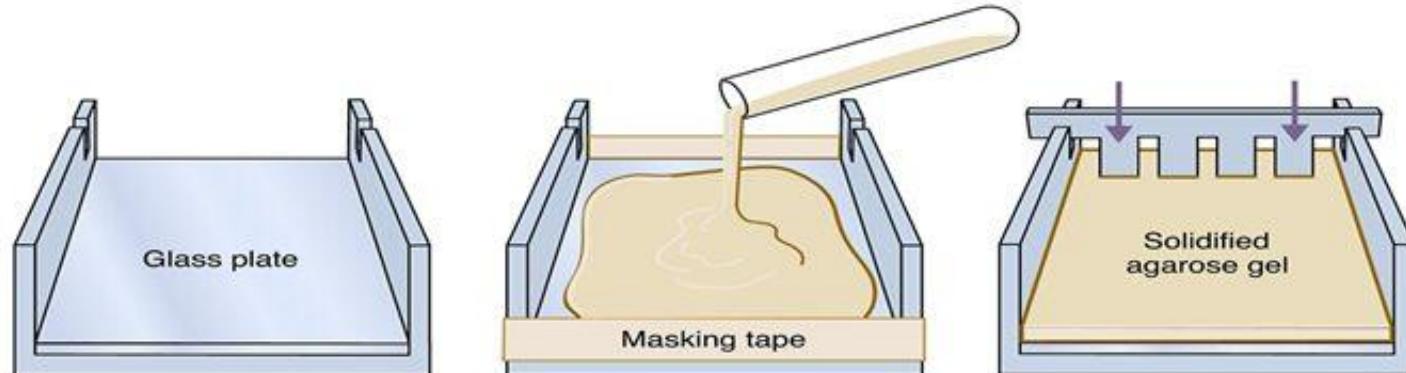
0,8%

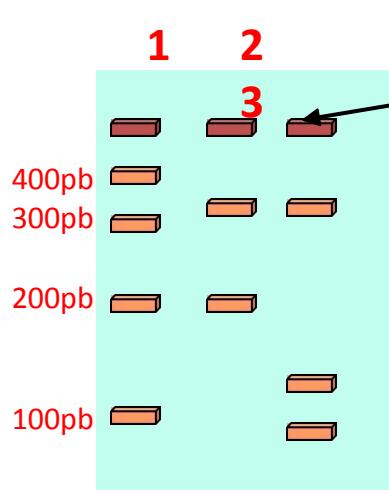
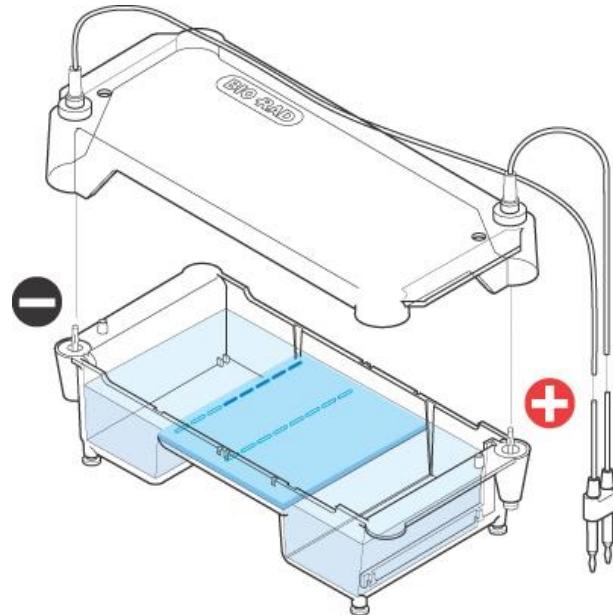
Gel Loading buffer



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

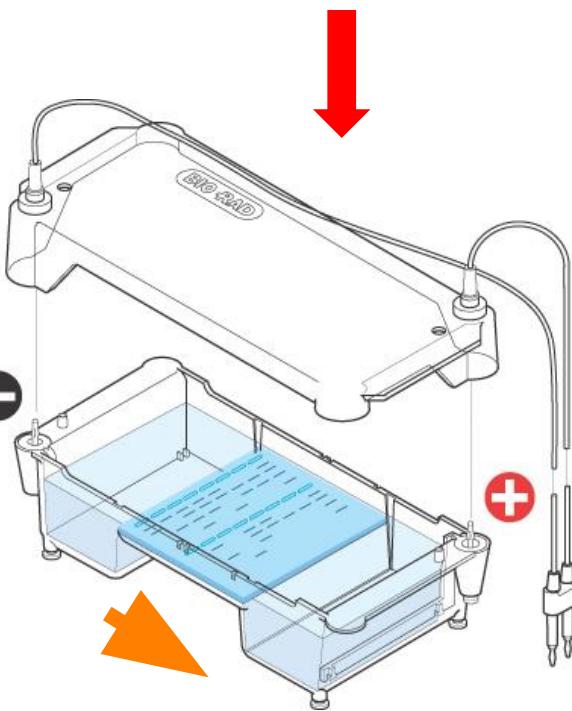




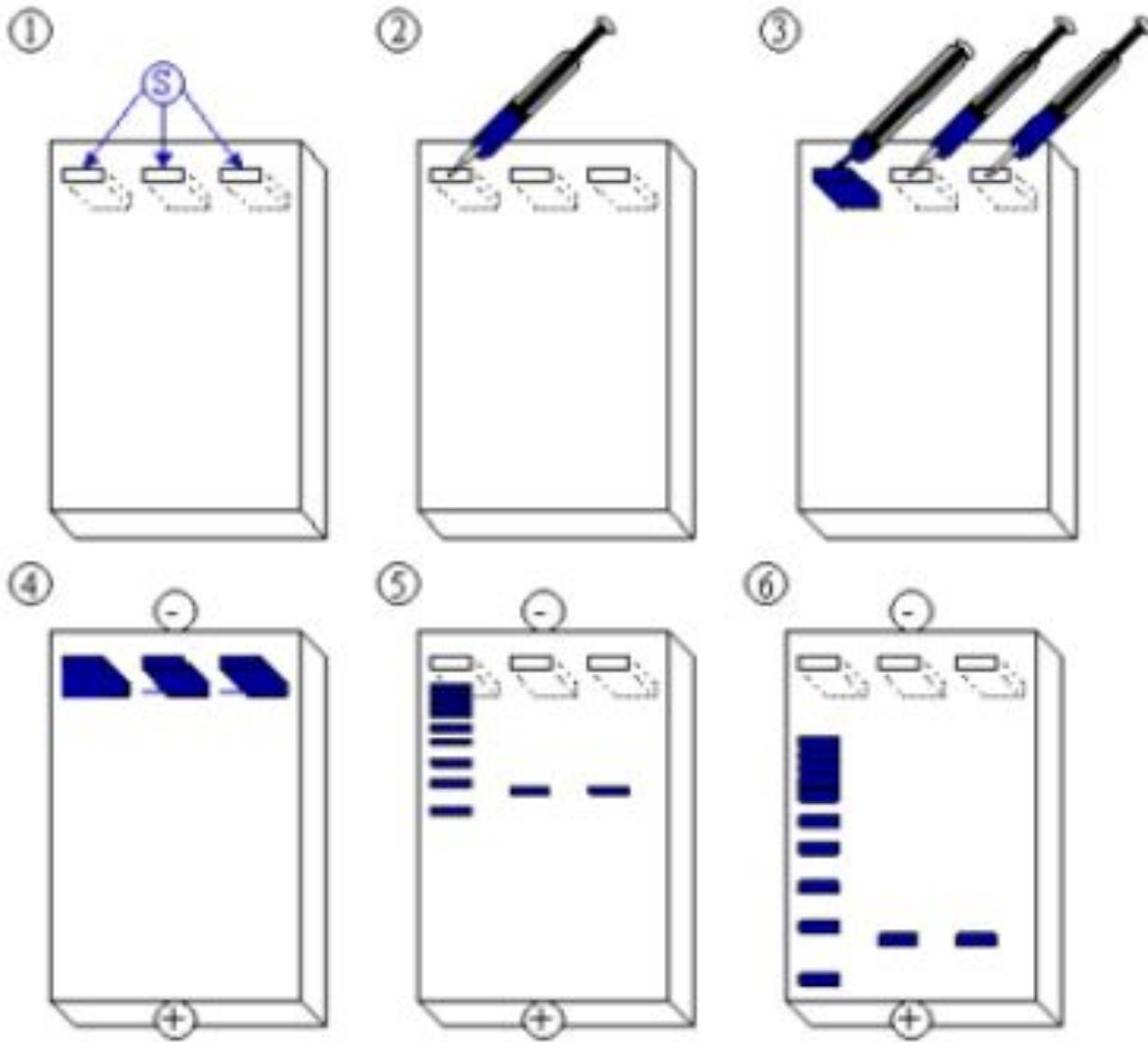


Poços para aplicação
das amostras de DNA

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



Aplicação das amostras de DNA



Eletroforeses de DNA

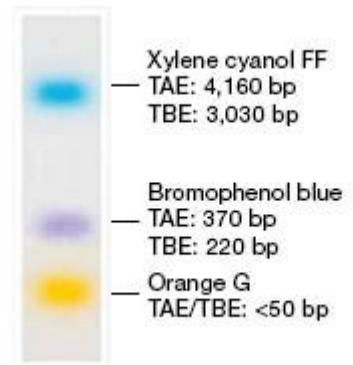
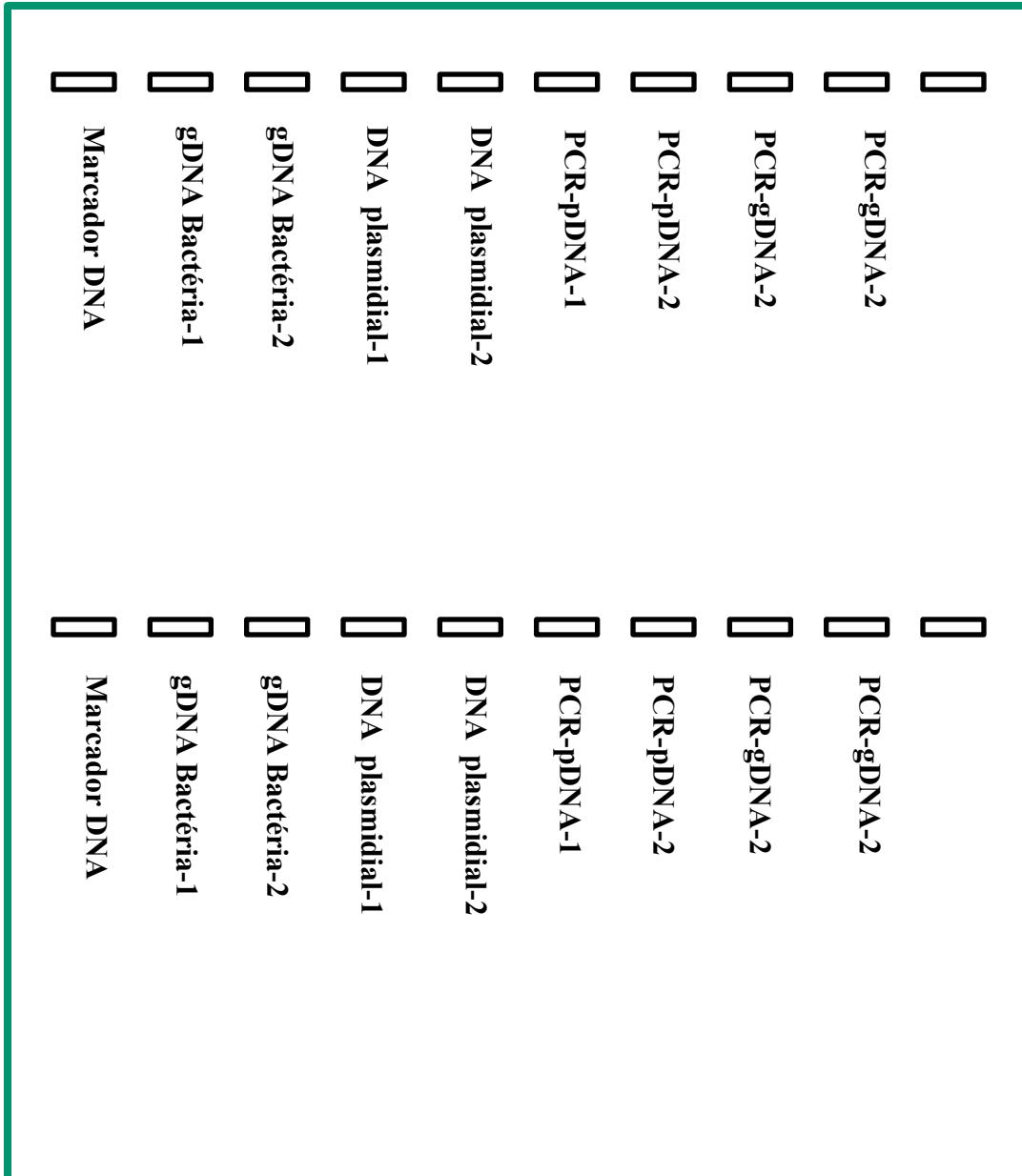
Procedimento:

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.

Eletroforeses de DNA

Grupo 1:

Grupo 2:



Corante de DNA SYBR

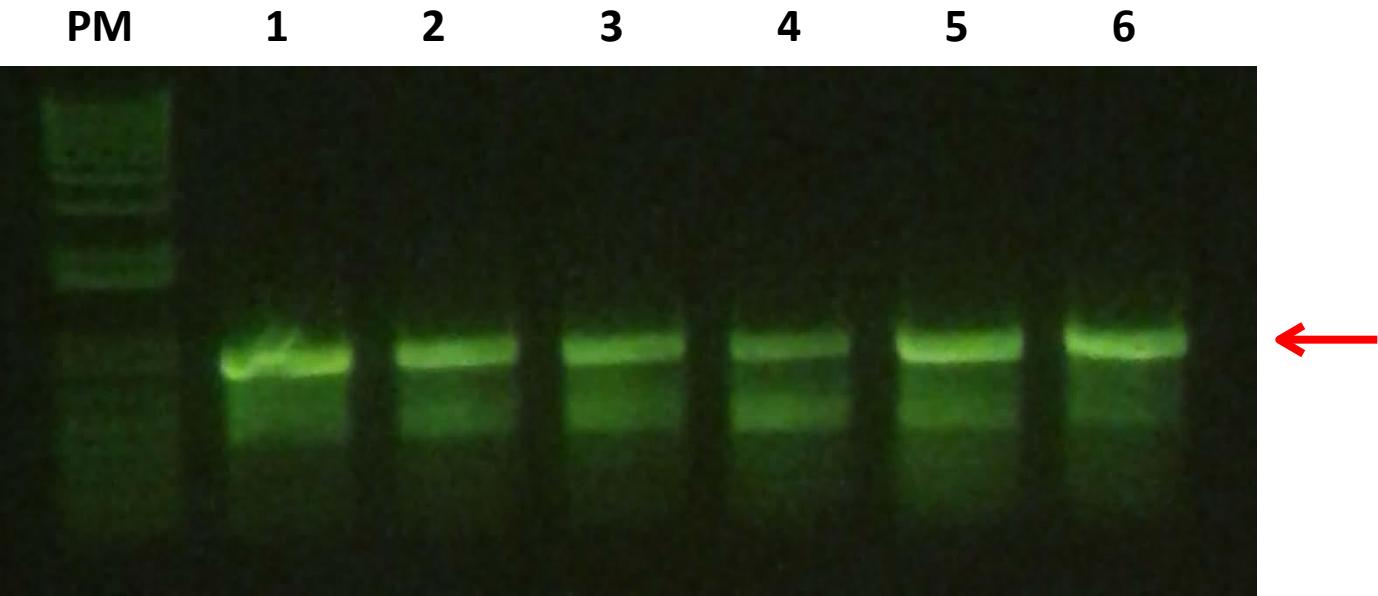


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% de PCR do gene ApoB apartir de ghDNA obtido de mucosa oral.

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.

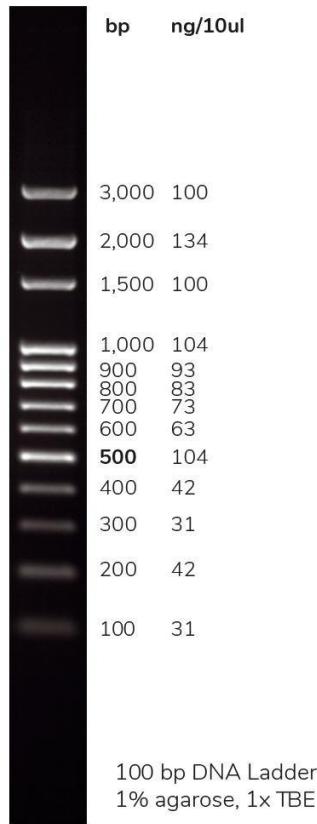
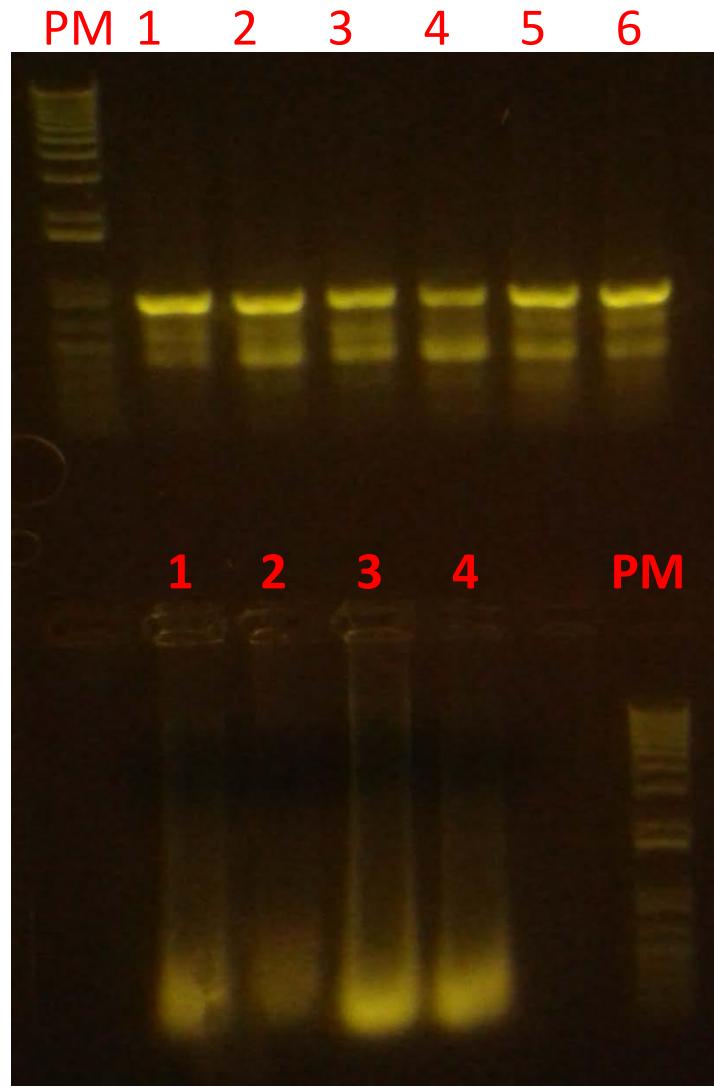
100 BP DNA LADDER**Solis BIODYNE cat 07-11-00050****A.****B.**

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

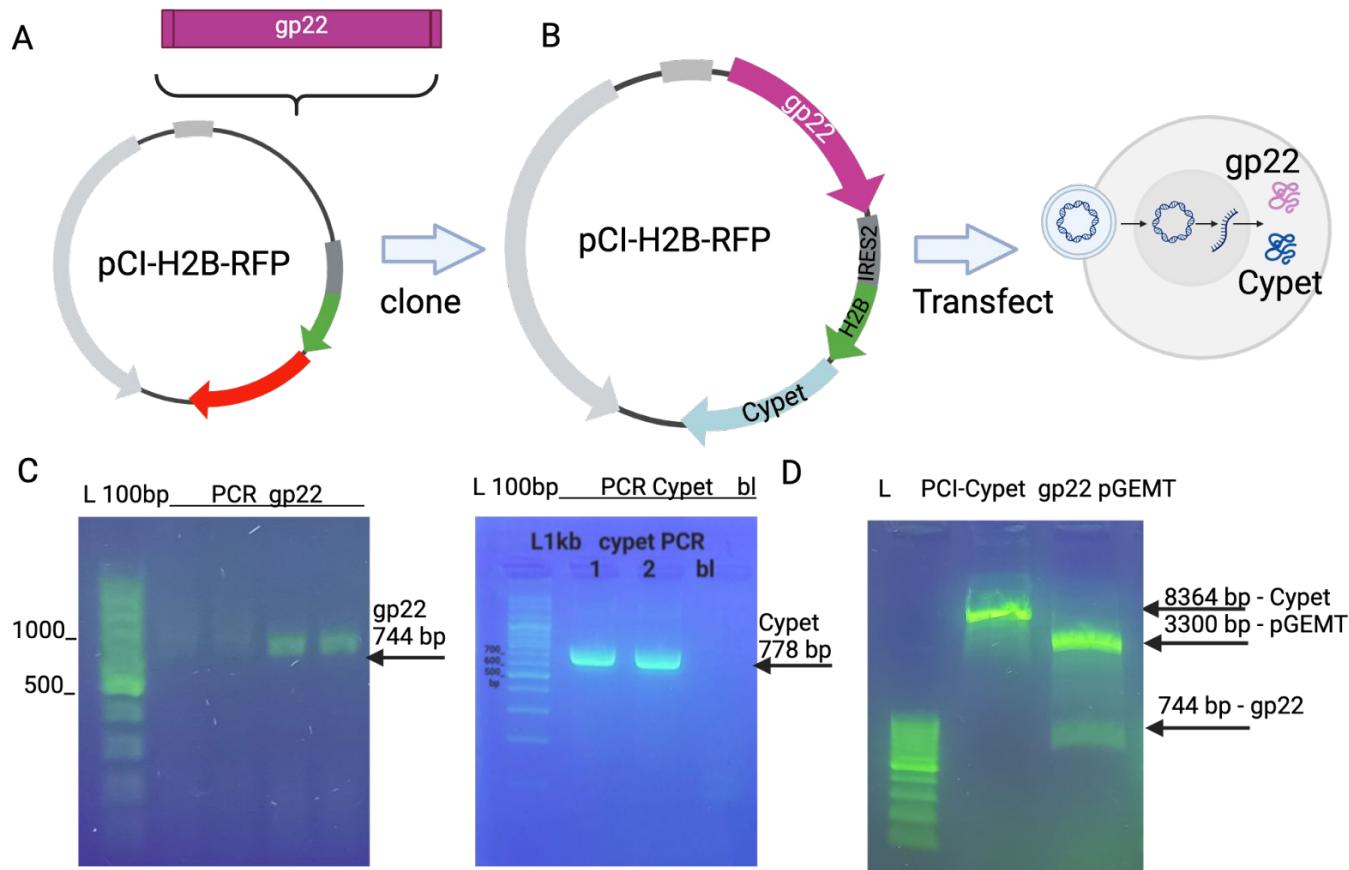


Figura 4. O tamanho do fragmento de PCR gp22/CYBA (744 pb) foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, o fragmento de PCR foi clonado em vetor pGEMT utilizando enzimas compatíveis com ligação por digestão para posterior clivagem com enzimas de restrição Ascl/Xhol para clonagem no 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

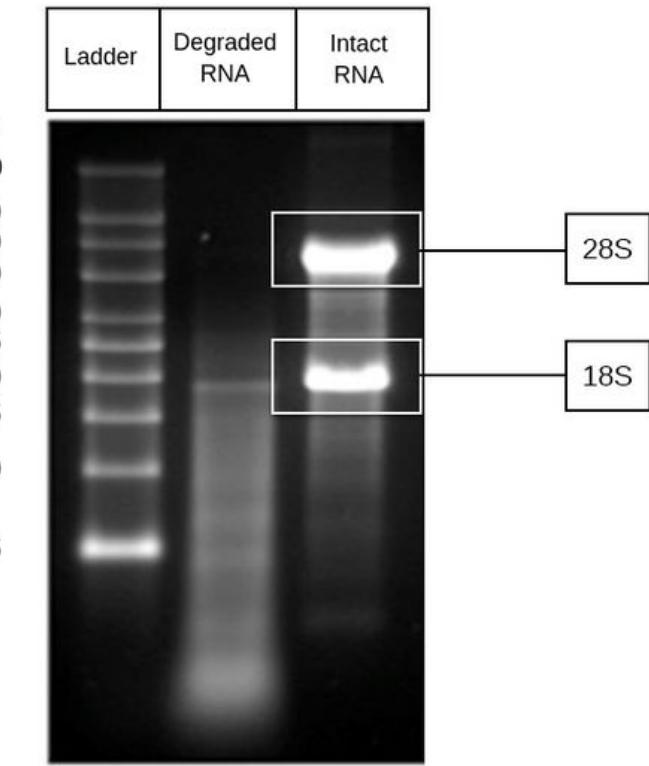


Figura 5. Análise da integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose 1%.

Linha 1:Ladder

Linha 2: RNA degradado

Linha 3: RNA íntegro