

## **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

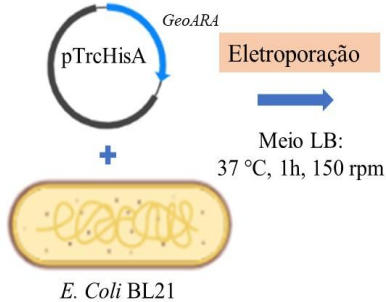
**USP - 2025**

# **Atividade de Proteína recombinante**

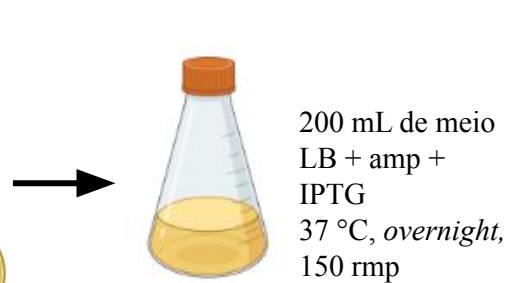
- 1. Atividade Enzima Catalase (CAT)**
- 2. Determinação de atividade enzimática por Zimograma - Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**
- 3. Immunodeteção de Proteínas: Transferência à membrana**

# Expressão, purificação e atividade de Proteína recombinante

## 1 Transformação e Seleção



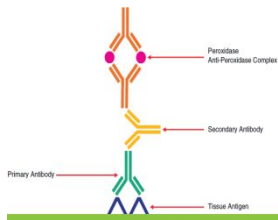
## 2 Produção da Proteína



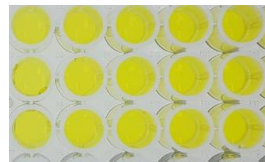
## 3 Lise celular



## 6 Análise de atividade

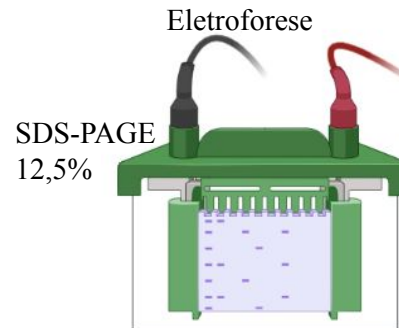


Western Blot



Enzimática

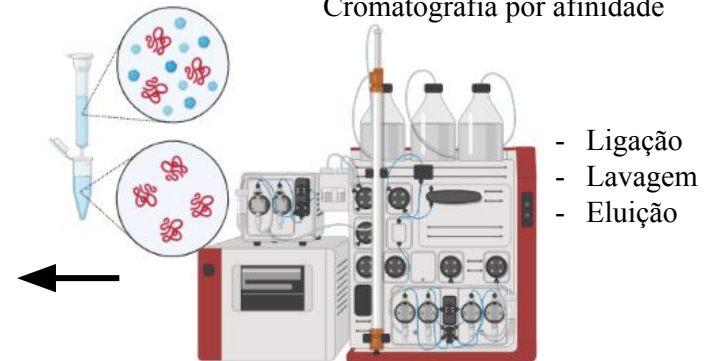
## 5 Análise da purificação



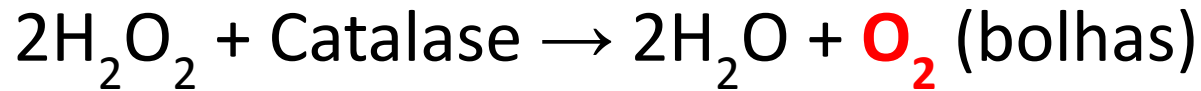
SDS-PAGE  
12,5%

## 4 Purificação

Cromatografia por afinidade

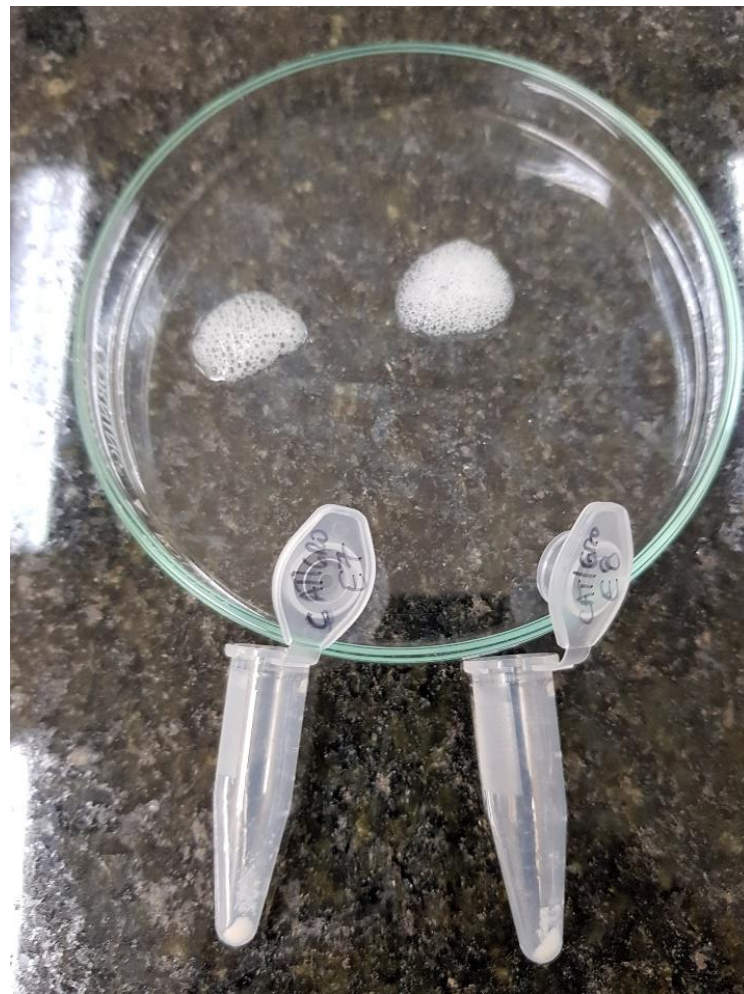


# 1. Atividade Enzima Catalase



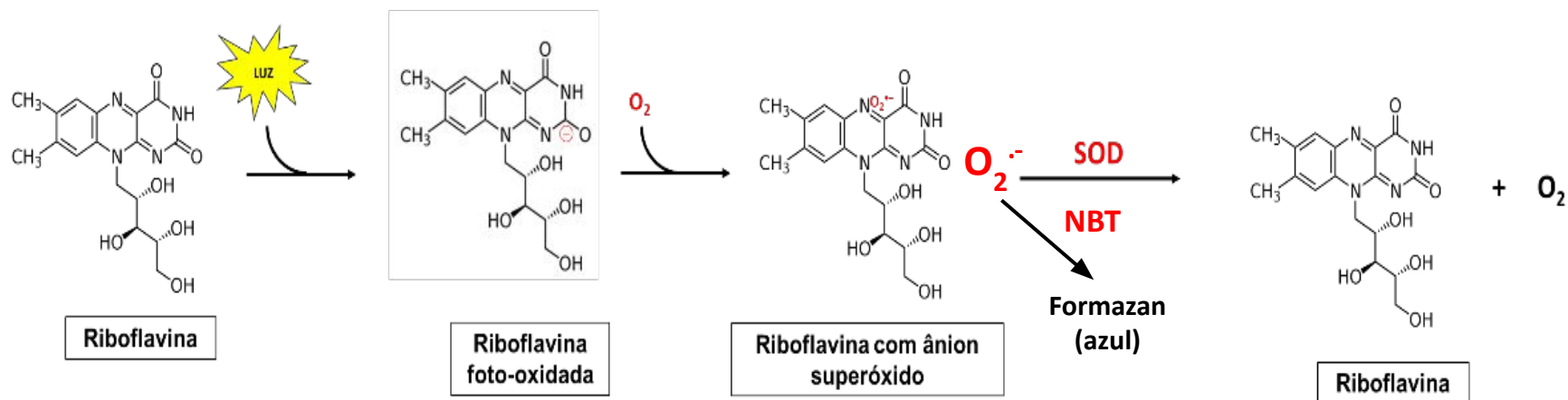
## Procedimento:

1. Em uma lâmina de vidro, aplique 25 uL de uma solução 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
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.



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

### Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

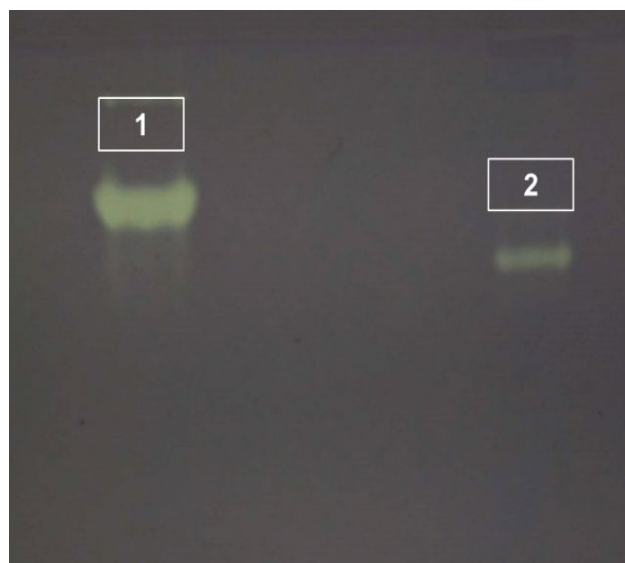


#### Amostra

- Não SDS
- Não  $\beta$ -MeOH
- Não ferve

#### Gel e Tampão

- Não SDS



# Determinação de atividade enzimática em gel não desnaturante - Zimograma

## Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

### Procedimento:

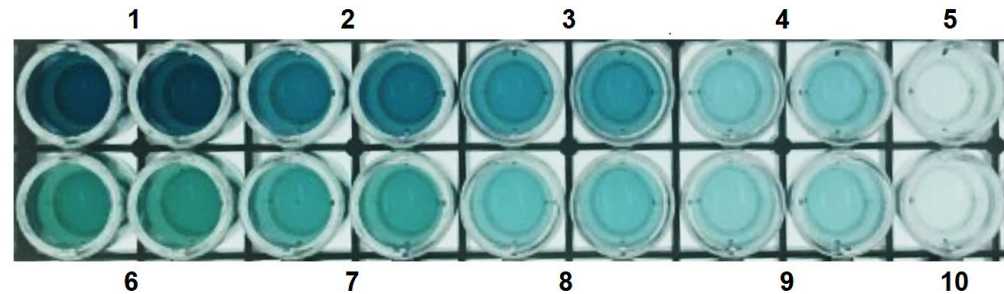
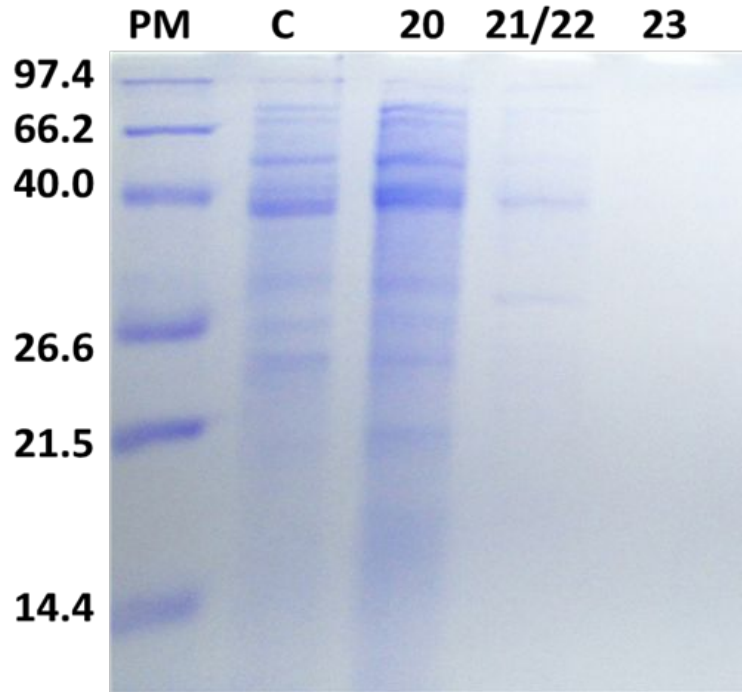
1. Preparar sistema PAGE não desnaturante 15% e tampão de corrida não desnaturante (Trizma base 3,02 g/glicina 14,4 g por litro).
2. Aplicar 50 µL de solução de enzima SOD em tampão de amostra não desnaturante (glicerol 87%; azul de bromofenol 0,1%; tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8).
3. Separar as proteínas 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.



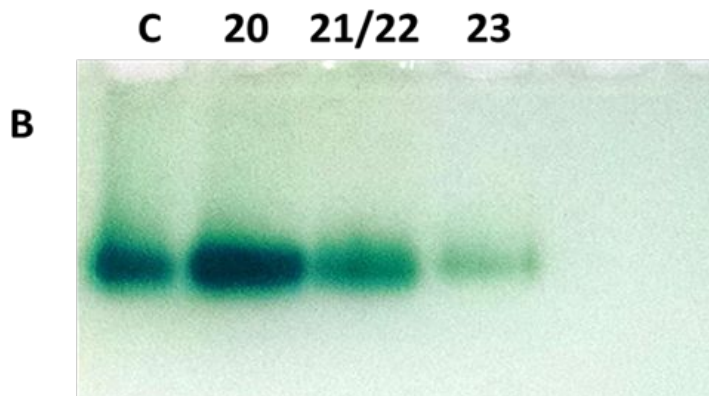


# Identificação de enzimas Oxidases

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



Determinação da atividade enzimática com diferentes concentrações de enzima





### 3. Imunodeteção de Proteínas: Transferência à membrana

**Hibridização** de ácido nucleico: pareamento de bases de fitas simples de DNA ou RNA de duas fontes diferentes para dar uma dupla hélice híbrida

-**Southern blot**: um procedimento de hibridização onde o DNA está no gel e a sonda é RNA ou DNA

-**Northern blot**: RNA está no gel

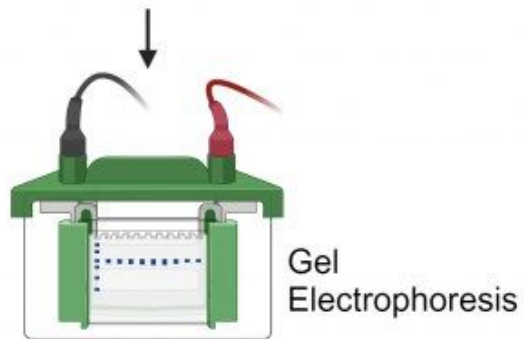
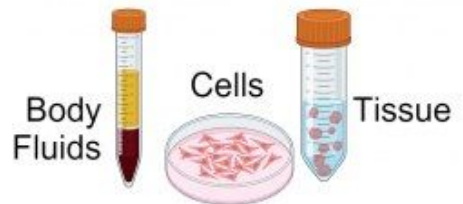
-**Western blot**: proteína está no gel

# Imunodeteção de proteínas (Western Blotting)

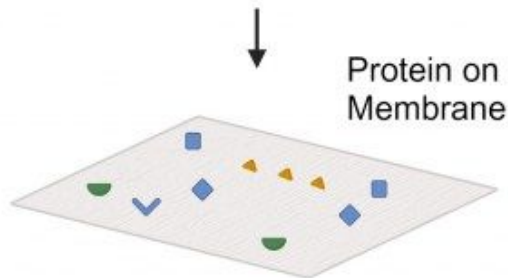
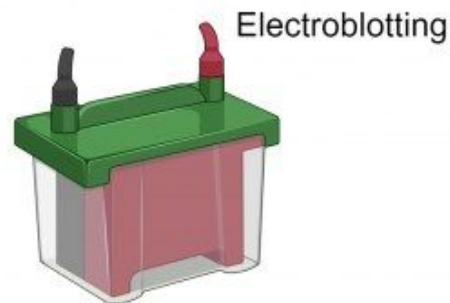
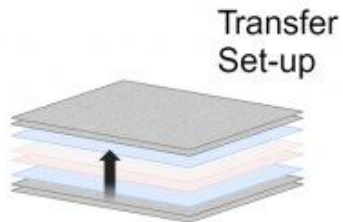
- técnica importante utilizada em biologia celular e molecular.
- identificar proteínas específicas em uma mistura complexa de proteínas extraídas de células.

A técnica utiliza três elementos para realizar essa tarefa: (1) separação por tamanho, (2) transferência para um suporte sólido e (3) marcação da proteína alvo utilizando um anticorpo primário e um anticorpo secundário apropriados para visualização.

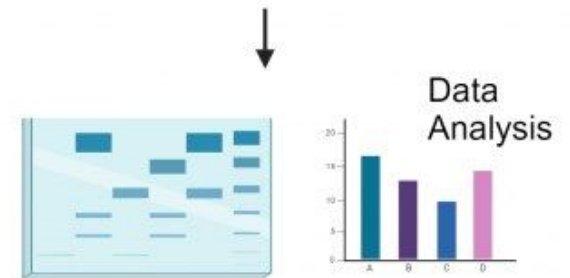
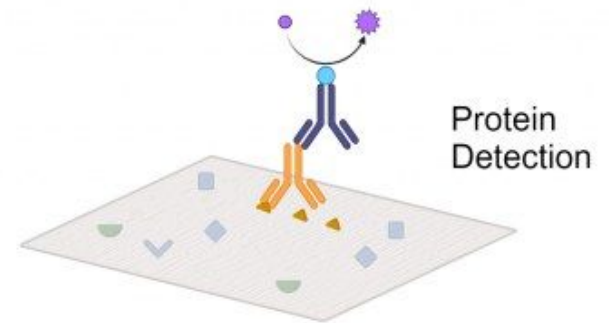
## PolyAcrylamide Gel Electrophoresis



## Western Blotting



## Detection and Analysis



# **Seis passos para Western blotting**

**Etapa 1: Eletroforese em gel**

**Etapa 2: Transferência através da membrana**

Etapa 3: Bloqueio

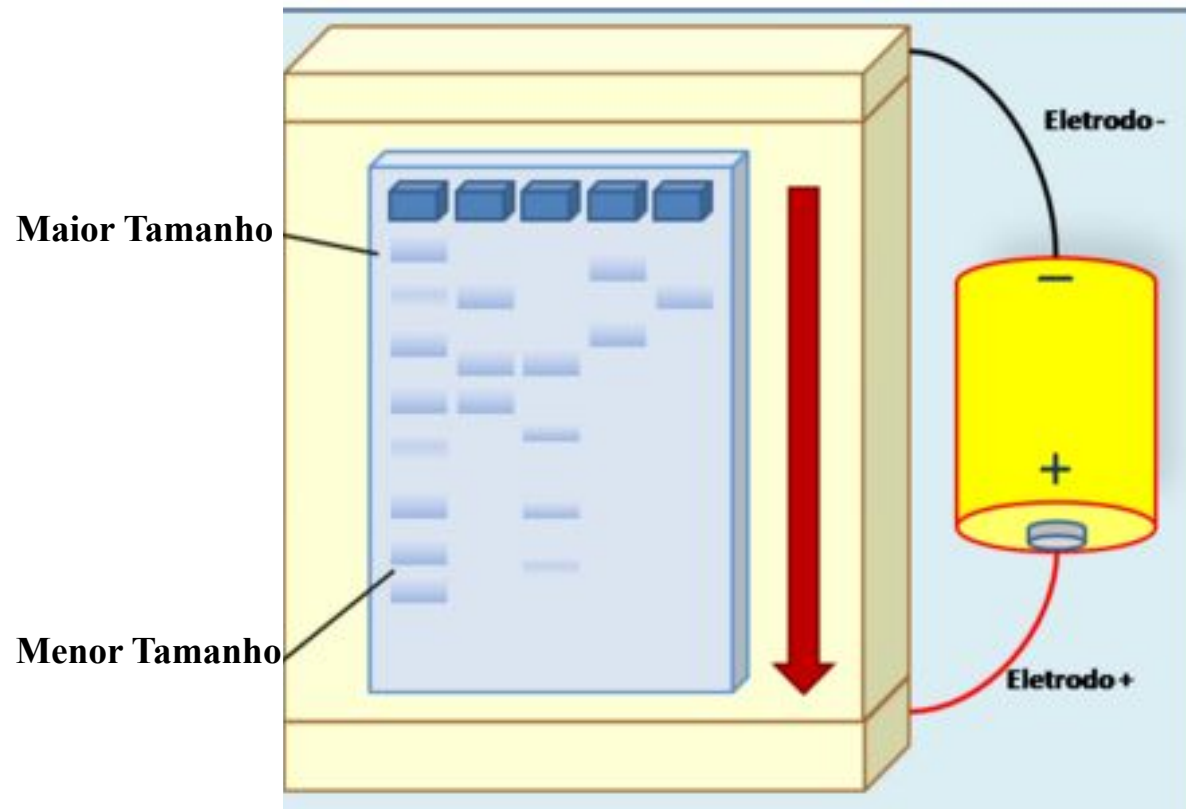
Etapa 4: Incubação com o anticorpo primário

Etapa 5: Incubação com anticorpo secundário

Etapa 6: Análise de Western Blot

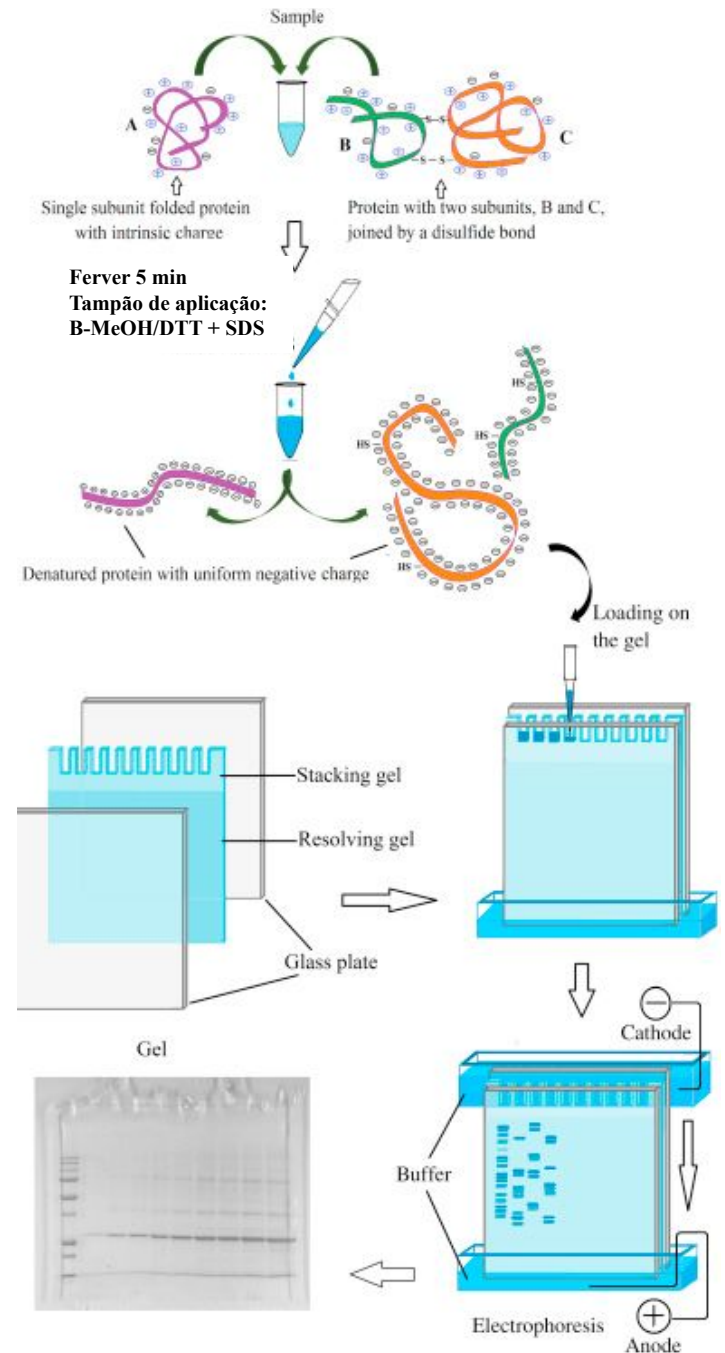
# Eletroforese de Proteínas

Separação de proteínas, sob ação de um campo elétrico, é feita de acordo com o tamanho e carga elétrica das moléculas.



# SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

## Eletroforese de proteínas: SDS-PAGE



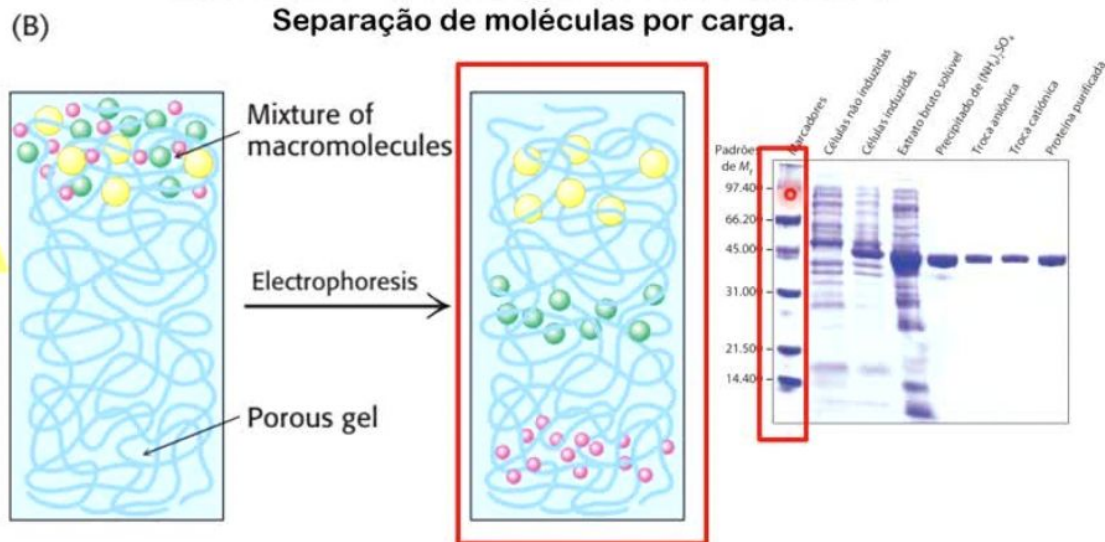
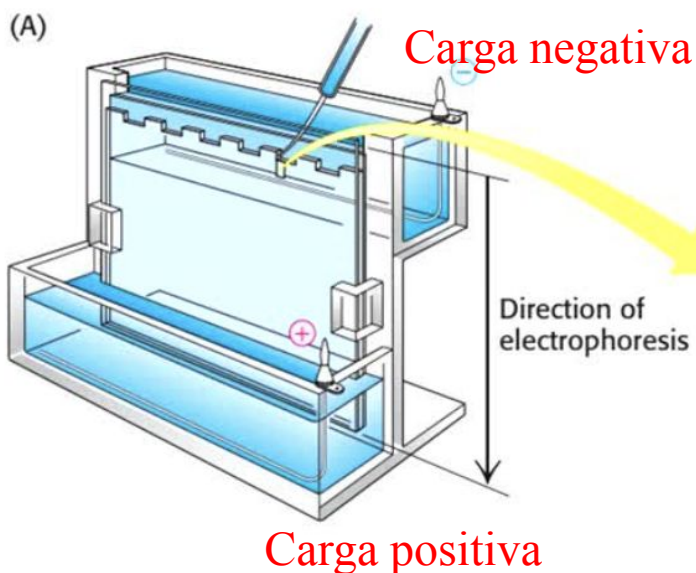


# ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

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

### **Eletroforese em gel de acrilamida.**

Separação de moléculas por carga.



# Eletofóreses 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.

**Representative picture of Prestained Protein Molecular Weight Marker**  
ThermoScientific cat. 26612

	Protein	Source
~120	$\beta$ -galactosidase	<i>E.coli</i>
~85	Bovine serum albumin	bovine plasma
~50	Ovalbumin	chicken egg white
~35	Carbonic anhydrase	bovine erythrocytes
~25	$\beta$ -lactoglobulin	bovine milk
~20	Lysozyme	chicken egg white

**8-16% Tris-glycine SDS-PAGE**

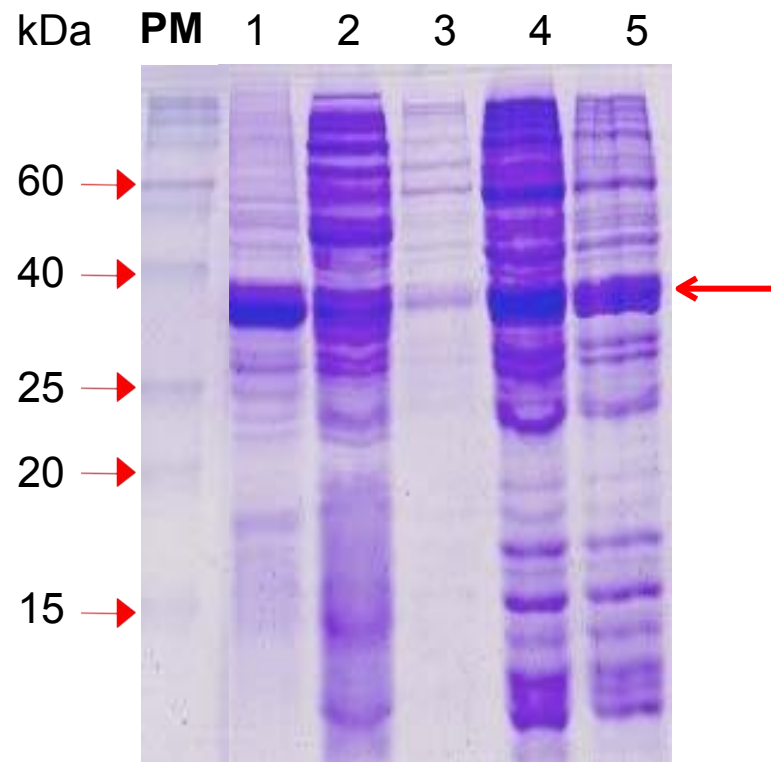
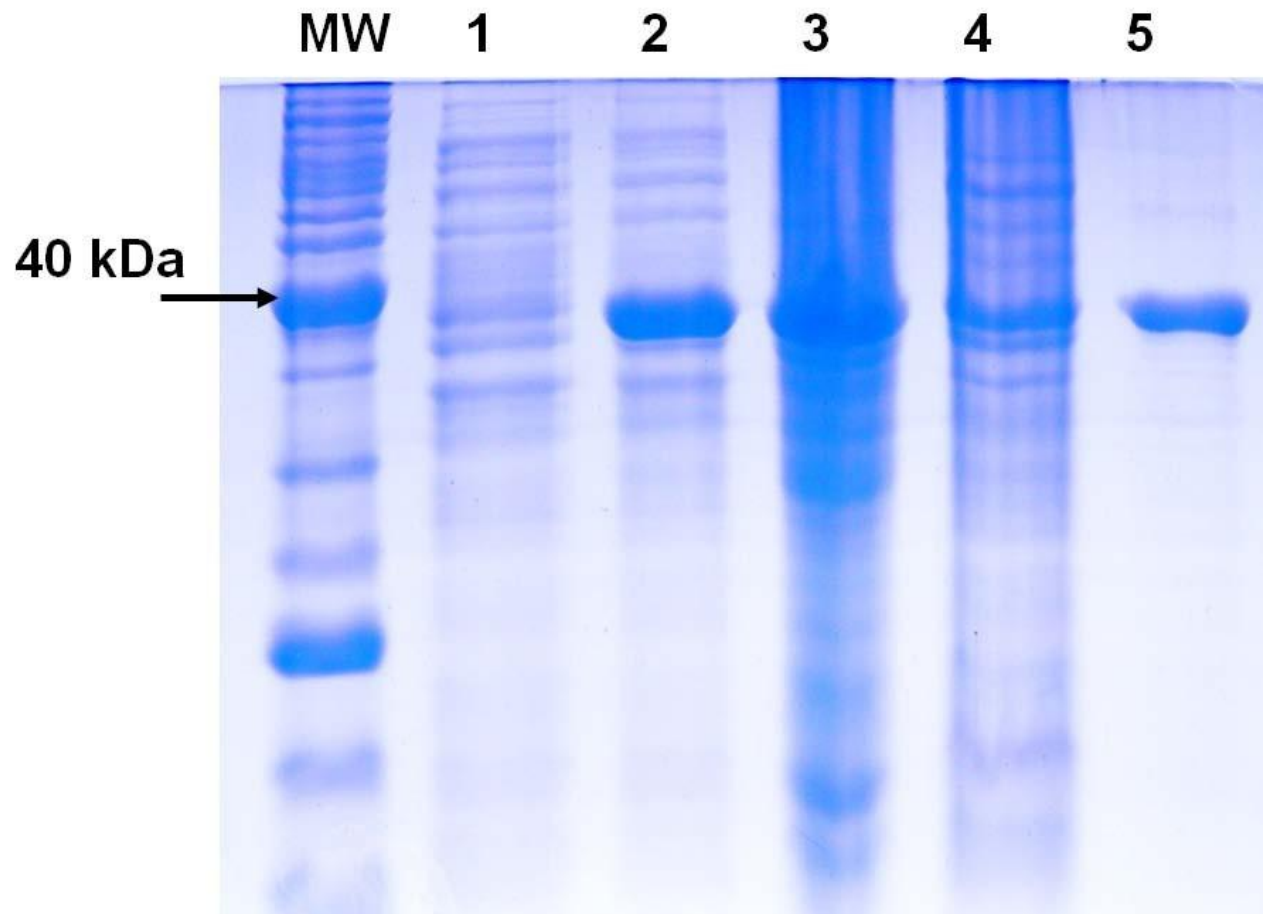


Figura 7. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10  $\mu$ L); Linha 2 – fração solúvel (10  $\mu$ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna 'HiTrap Chelating' carregada com Ni<sup>2+</sup> (10  $\mu$ 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  $\mu$ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20  $\mu$ L da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20  $\mu$ L do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel); (4) Amostra de 20  $\mu$ L do sobrenadante do lisado bacteriano (solúvel); (5) Amostra de 20  $\mu$ L das frações coletadas após a purificação. (PM) peso molecular BenchMark protein ladder (Invitrogen).

# **Seis passos para Western blotting**

Etapa 1: Eletroforese em gel

**Etapa 2: Transferência através da membrana**

Etapa 3: Bloqueio

Etapa 4: Incubação com o anticorpo primário

Etapa 5: Incubação com anticorpo secundário

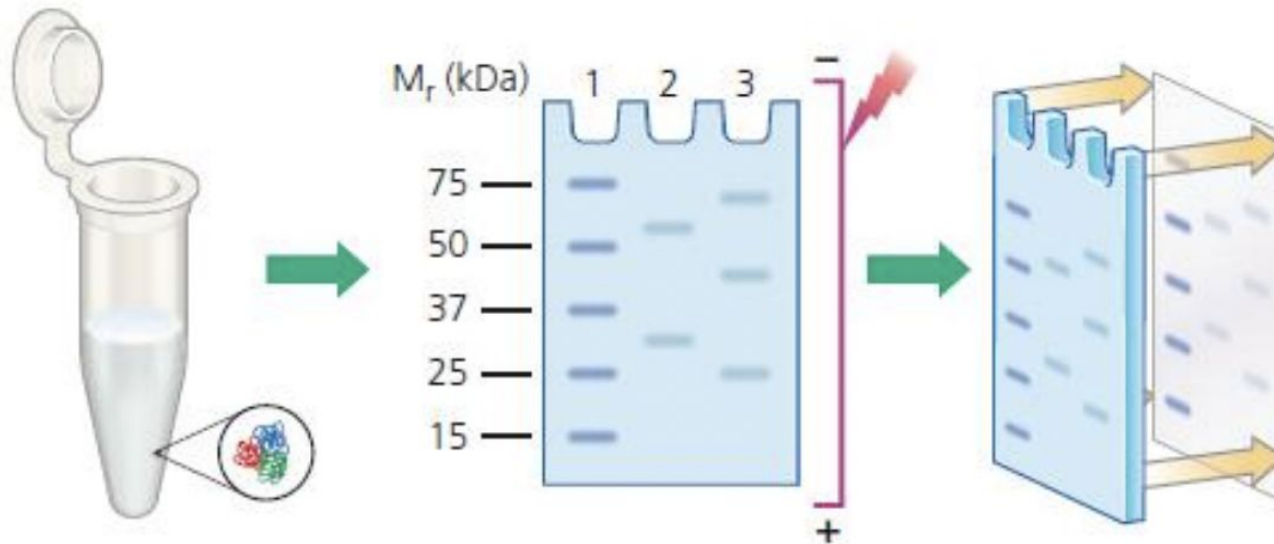
Etapa 6: Análise de Western Blot

# TRANSFERÊNCIA

## Procedimento:

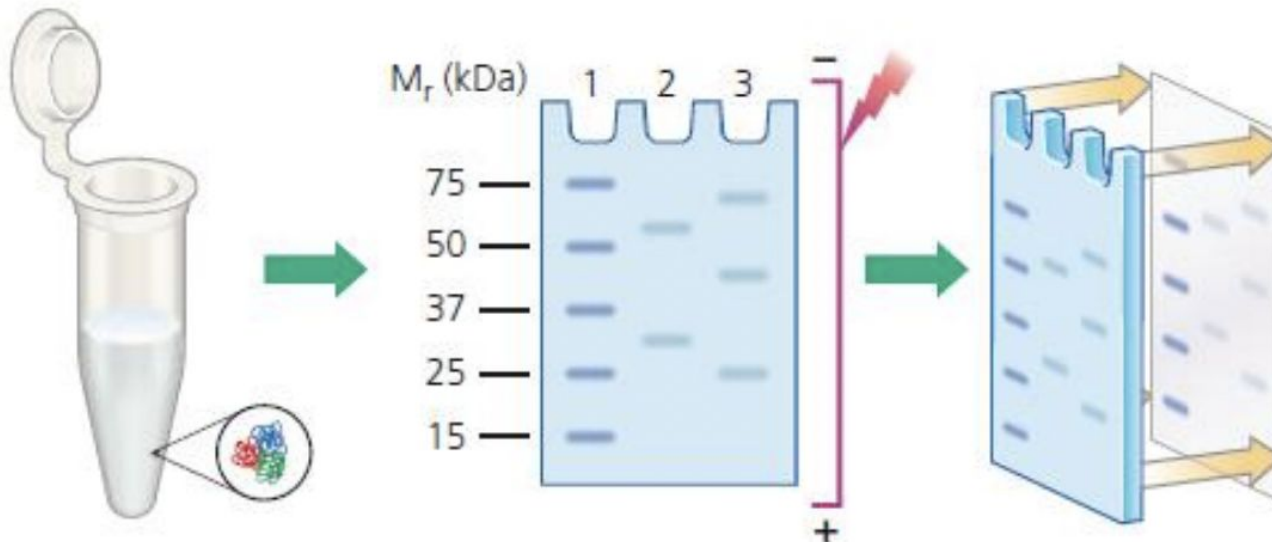
1. Após a separação das proteínas (Antígeno) presentes em gel de poliacrilamida/SDS , realizar a transferência para uma membrana de PVDF , sob corrente elétrica à 300 mA, por 30 min, utilizando tampão de transferência (g/L: glicina 2,9/Trizma base 5,8/metanol 20%)
2. Após o período, verificar pelo marcador de peso se a transferência foi efetiva na membrana e, então, corar a membrana com corante Ponceau S 0,2%, por 5 minutos, agitar no shaker 150 rpm
3. Ao visualizar a presença das bandas (proteínas), remover o corante e lavar com água Milli-Q. Utilizar as referências do marcador para identificar a massa molecular das bandas.
4. Na sequência a membrana de nitrocelulose será utilizada no ensaio de Immunoblot.

# Porque transferir a proteína do gel para membrana?



# Porque transferir a proteína do gel para membrana?

- pequenas moléculas (corante Comassie) se difunde através do gel poliacrilamida, mas grande moléculas (anticorpos) não permeiam o gel
- transferir a proteína para membrana permite a imunodeteccção; anticorpos podem alcançar e se ligar às proteínas na superfície da membrana

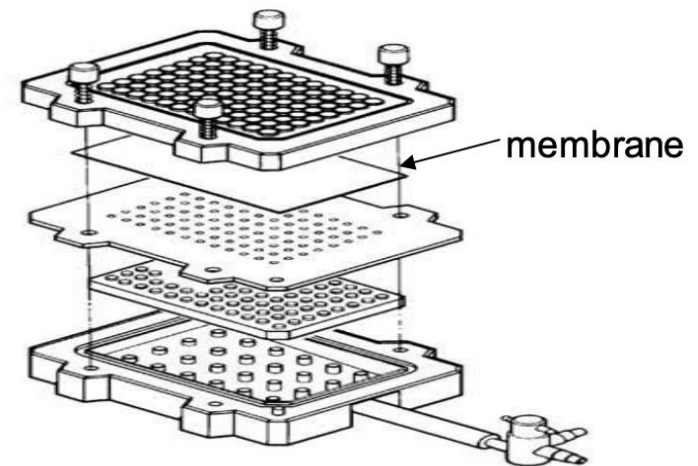
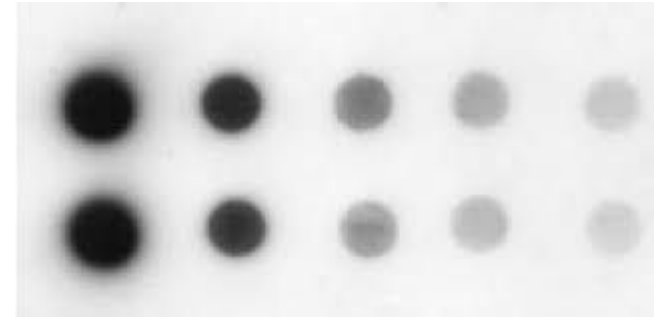




# Técnicas de Transferência

## Dot-blotting: microfiltração

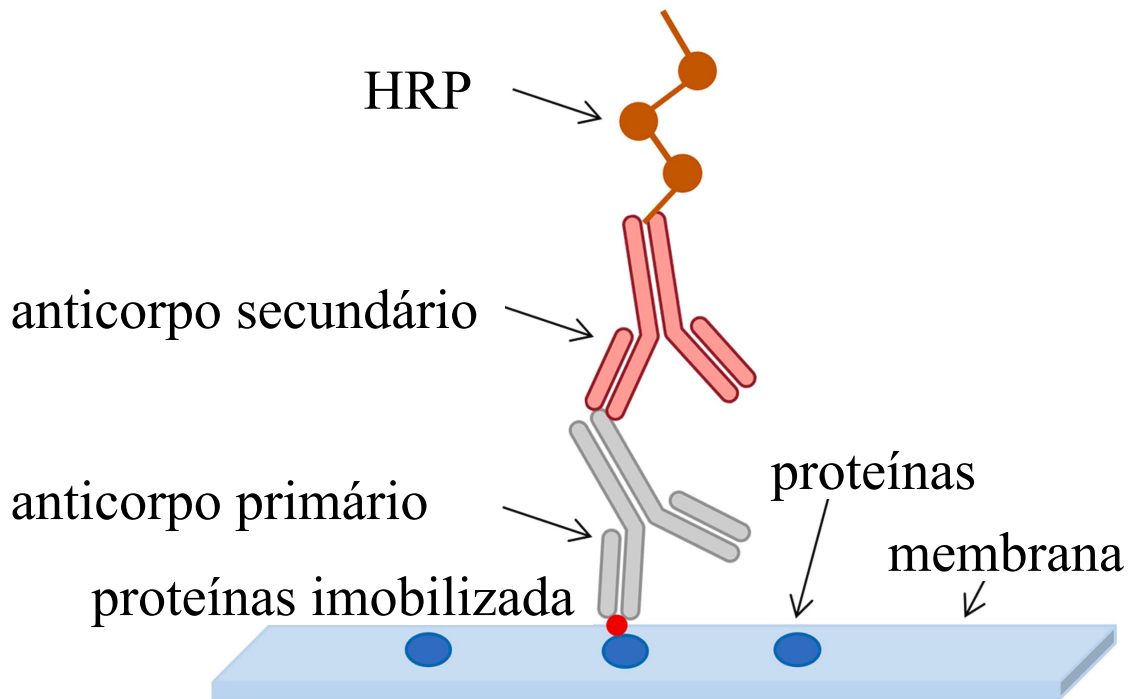
- Proteína aplicada manualmente na membrana
- volumes pequenos ou grandes
- o formato de 96 poços permite a triagem de grande número de amostras
- Não há separação de proteínas por peso molecular.



# Técnicas de Transferência

## Dot-blotting: microfiltração

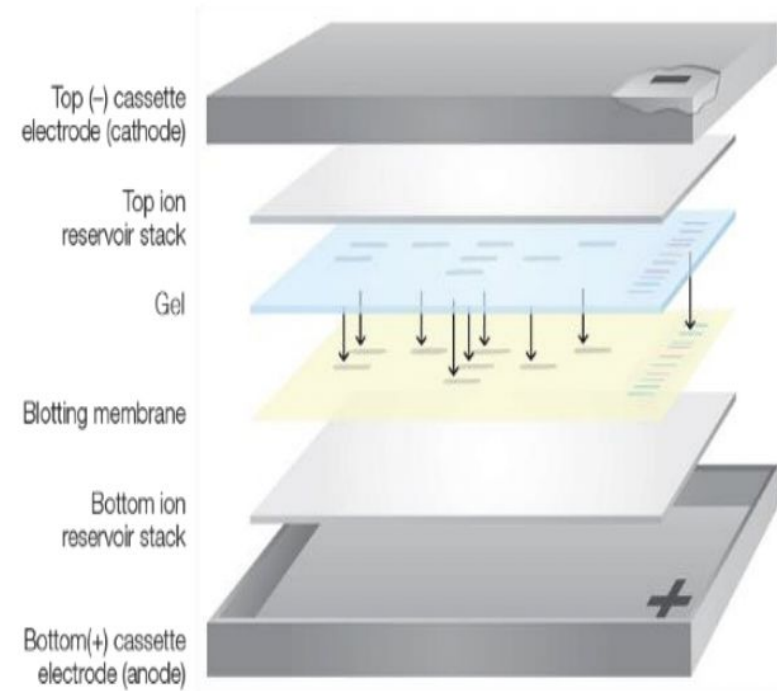
- Proteína aplicada manualmente na membrana.



# Técnicas de Transferência

## Transferência Eletroforética:

- Utilizada para Western blotting
- A voltagem aplicada causa a migração da proteína do gel para a membrana
- Métodos de tanque semi-seco (semi-dry) ou úmido (wet tank)



# Técnicas de Transferência

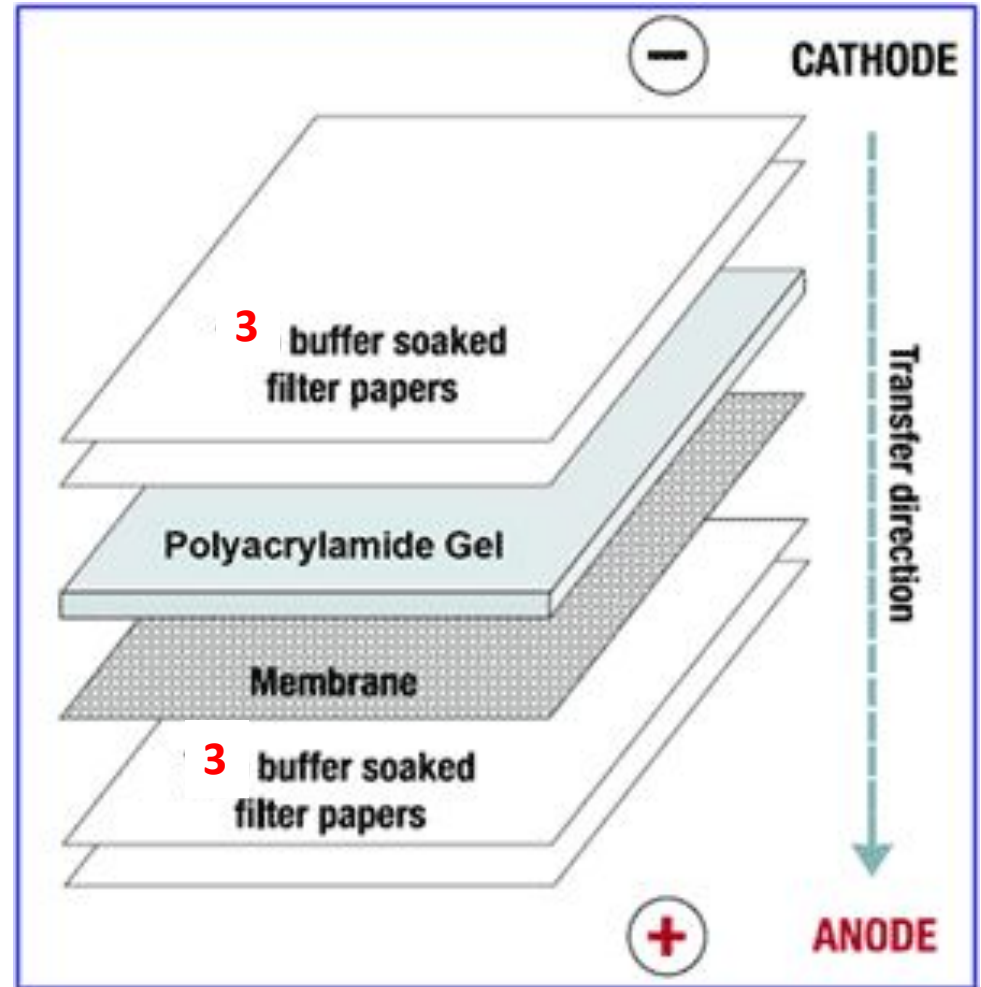
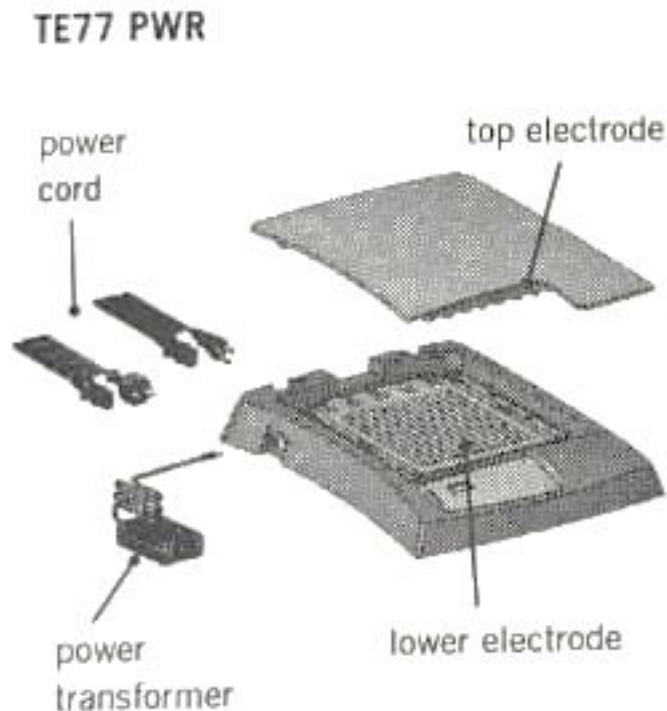
## Transferência semi-seca:

- A pilha de transferência está em contato direto com os eletrodos da placa.
- Alta taxa de transferência, ideal para alto rendimento
- Utiliza uma quantidade mínima de buffer de transferência
- Pode sobreaquecer devido à dissipação de calor limitada



# Transferência de Proteínas para uma membrana de nitrocelulose: SEMI-DRY BLOTTER

300 mA/1 h



## Tampão de Transferência:

Tris-sal/Tween 20 0,1% (TBS-Tween) pH 7.6 (8 g NaCl/20 mL Tris HCl 1 M, pH 7.6/Tween 20 0,1%/ 1 L de água)

# Técnicas de Transferência

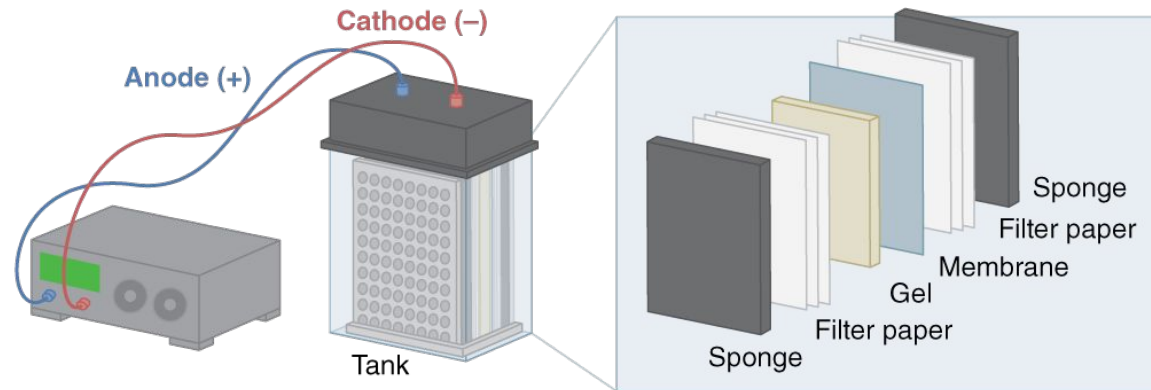
- **Transferência em tanque úmido (wet tank):**
- A pilha de transferência é submersa em tampão
- Papéis de filtro, gel e membrana precisam ser colocados entre esponjas e mantidos em uma cassete plástica
- Taxa de transferência mais lenta
- Voltagem e tempo flexíveis
- Confiável para transferência de proteínas de alto peso molecular
- Utiliza grande volume de tampão de transferência
- Melhor resfriamento (bloco de gelo ou caixa com gelo)



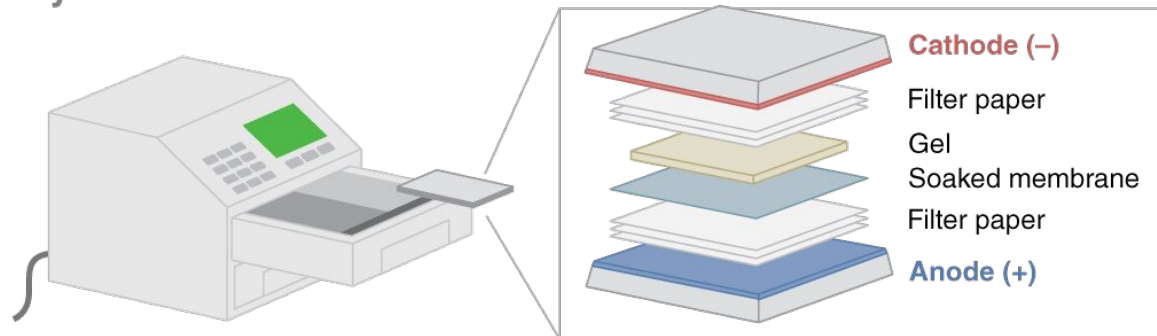
# Técnicas de Transferência

- **Transferência SECA (Dry)**
- instrumentos com fontes de alimentação integradas são pareados com conjuntos de transferência que contêm matrizes de gel superior e inferior com tampão de transferência incorporado.
- Seu gel de proteína é colocado na parte inferior do conjunto sem a necessidade de ser equilibrado previamente em tampão de transferência.
- papel de filtro precisa ser previamente umedecido com água deionizada.
- conjunto montado deve ter os contatos elétricos alinhados com os contatos de blotting.

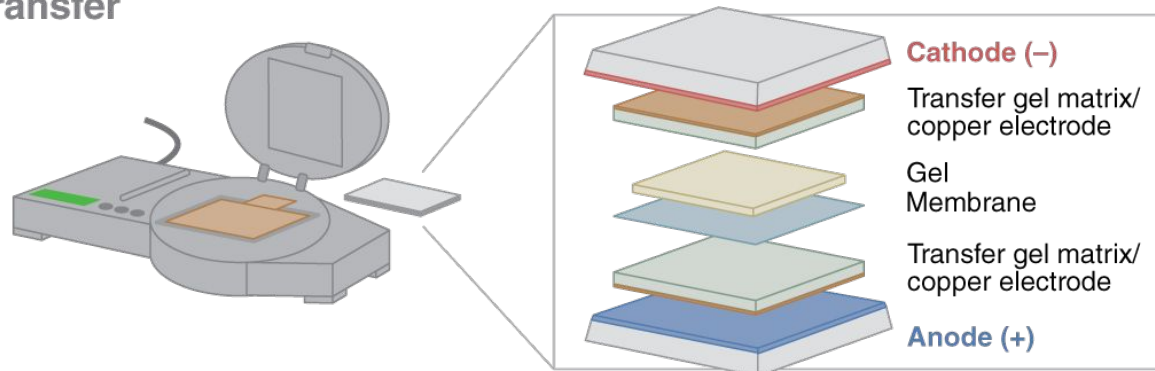
## Wet transfer



## Semi-dry transfer



## Dry transfer





# Membrana: Nitrocelulose

**As técnicas iniciais de Western blotting utilizavam membrana de nitrocelulose**

**(nitrato de celulose - primeiro fibroso)**

- Facilmente umedecida por soluções tampão aquosas para facilitar a montagem do sanduíche
- Alta capacidade de ligação: 80-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- Disponível em tamanhos de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 0,22  $\mu\text{m}$ .

Use o tamanho de poro menor para proteínas pequenas (< 15 kDa)

- métodos de detecção como coloração, fluorescência, quimioluminescência e radiomarcagem
- Funciona bem para sinais fluorescentes no vermelho distante e infravermelho próximo (700-800 nm)



# Membrana: PVDF

O fluoreto de polivinilideno (PVDF) possui uma capacidade de ligação a proteínas superior ( $150\text{-}200\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) à da nitrocelulose.

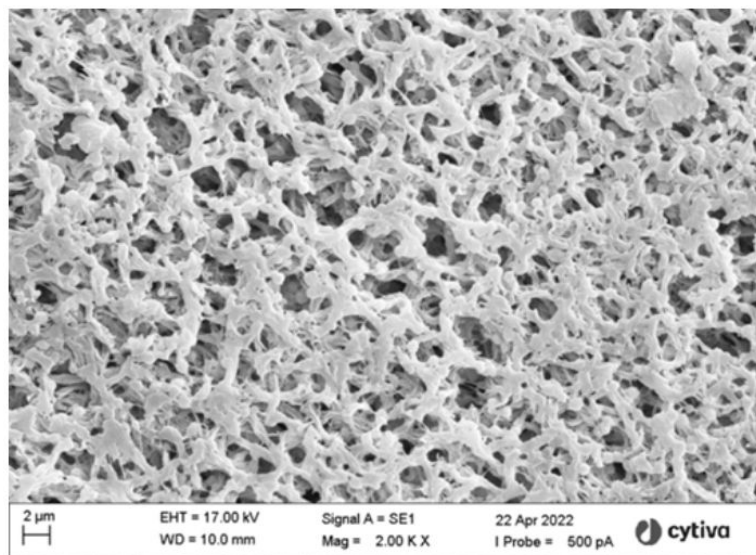
- O PVDF pode fornecer um sinal quimioluminescente forte.
- Deve ser umedecido previamente com solvente orgânico (MeOH) antes da montagem da membrana de transferência.
- Disponível também com poros de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ,  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  e  $0,1\text{ }\mu\text{m}$ .
- As proteínas transferidas para o PVDF podem ser diretamente microsequenciadas (Matsudaira 1987).

O metanol no tampão de transferência promove de forma confiável a dissociação do SDS das proteínas do gel, melhorando sua adsorção às membranas.

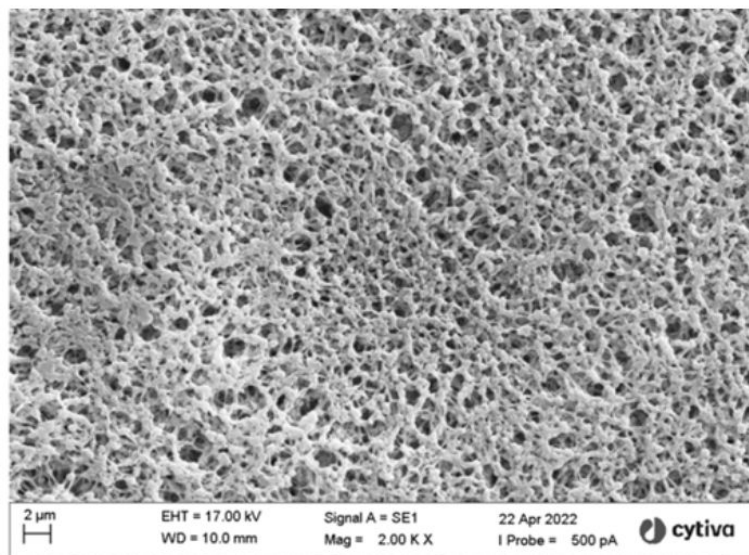
# Membrana: LF-PVDF

- Recomenda-se PVDF de baixa fluorescência (Low-fluorescence - LF) para blots fluorescentes
- Também apresenta bom desempenho para detecção quimioluminescente
- O PVDF de baixa fluorescência é recomendado para aplicações sem manchas
- Baixa autofluorescência/dispersão de luz para baixo ruído de fundo
- O PVDF comum apresenta alto ruído de fundo fluorescente

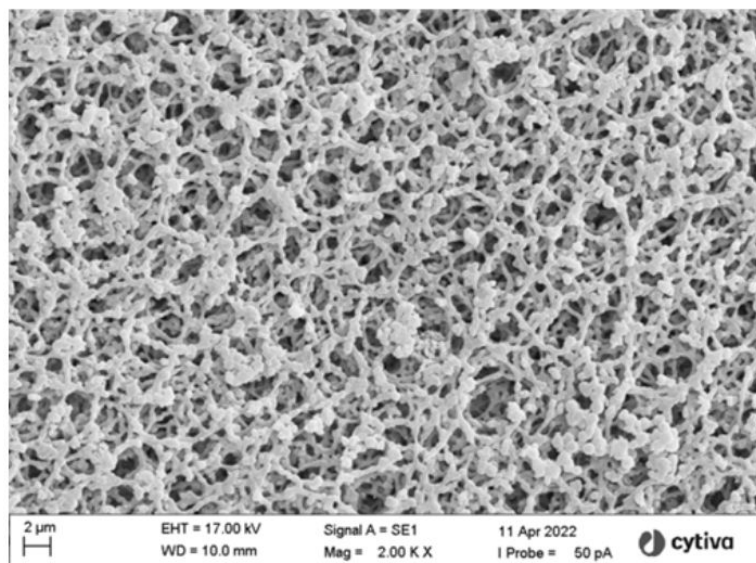
PVDF  
0.45uM



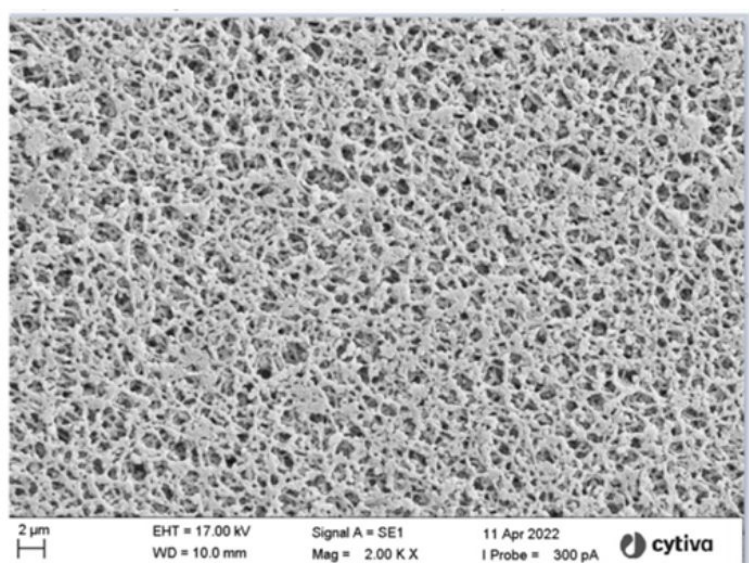
PVDF  
0.2uM



nitrocell  
0.45uM



nitrocell  
0.2uM



**Fig 1.** Electron micrographs of Western blotting membranes illustrating their 3D structure. (A) PVDF 0.2 μm, (B) PVDF 0.45 μm, (C) Nitrocellulose 0.2 μm, and (D) Nitrocellulose 0.45 μm.

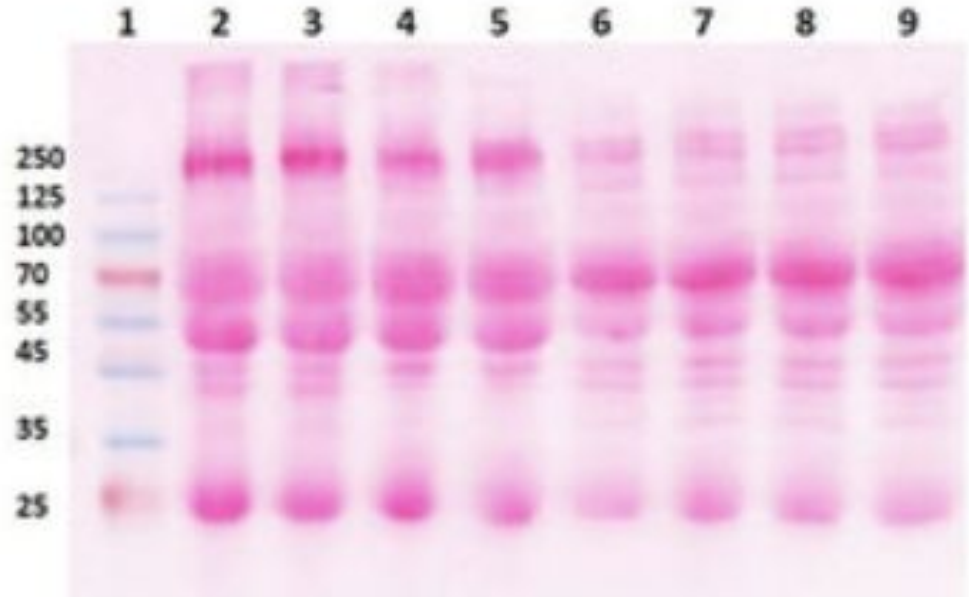
# Como conferir a transferência das proteínas para a Membrana?

- **Utilização de padrões de peso molecular pré-corados:**
  - a técnica mais popular
  - confirma a transferência eficiente apenas da faixa/área selecionada
- **Coloração de proteína total:**
  - Imagem fluorescente, colorimétrica e sem corante do blot
  - Sensibilidades e ruídos de fundo variáveis

# Transferência das proteínas: colorimétrica → Ponceau

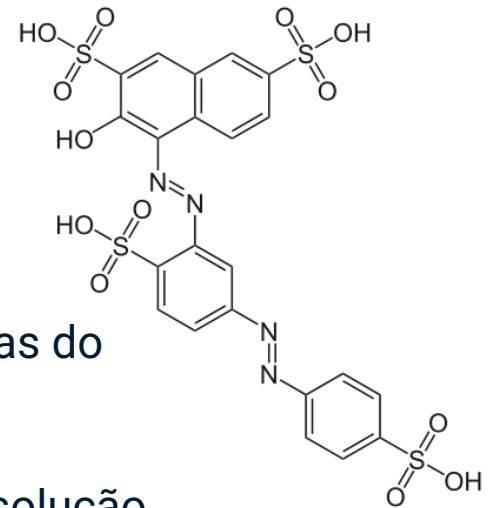
## Detecção colorimétrica

- Sensibilidade de 100 a 200 ng
- A coloração é reversível; lave a membrana antes das etapas subsequentes



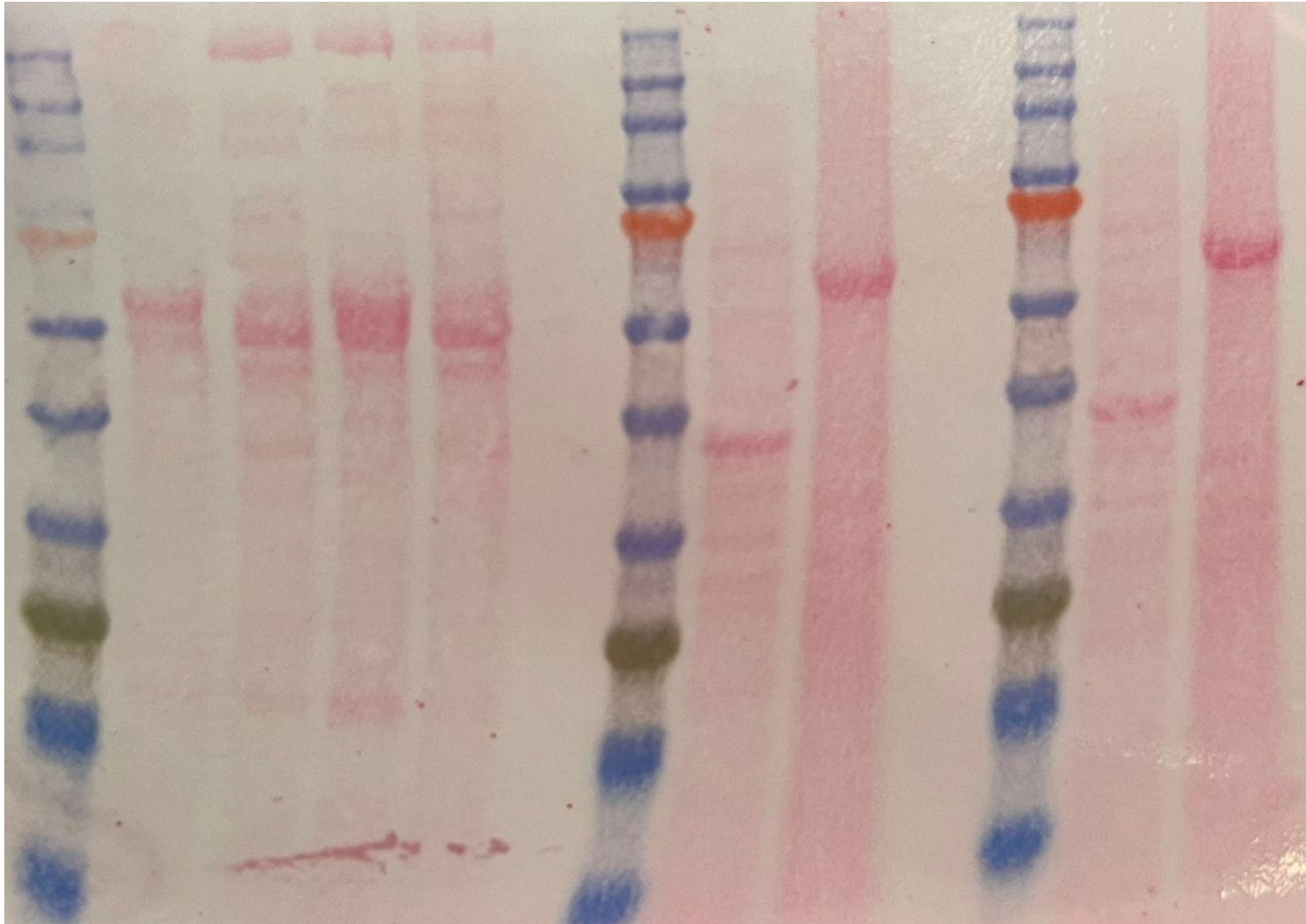
## Coloração:

1. Transferência: Após a eletroforese, transfira as proteínas do gel para a membrana (PVDF ou nitrocelulose).
2. Incubação com Ponceau S: Mergulhe a membrana na solução de coloração Ponceau S (geralmente 0,2% p/v em ácido acético a 5%) por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, sob agitação suave.
3. Lavagem: Lave a membrana com água destilada (DI) ou tampão (como TBST ou PBS-T) por 1 a 5 minutos até que o fundo claro e as bandas de proteína rosa/vermelhas fiquem visíveis.
4. Imagem: Uma imagem da membrana pode ser capturada para documentação e análise.

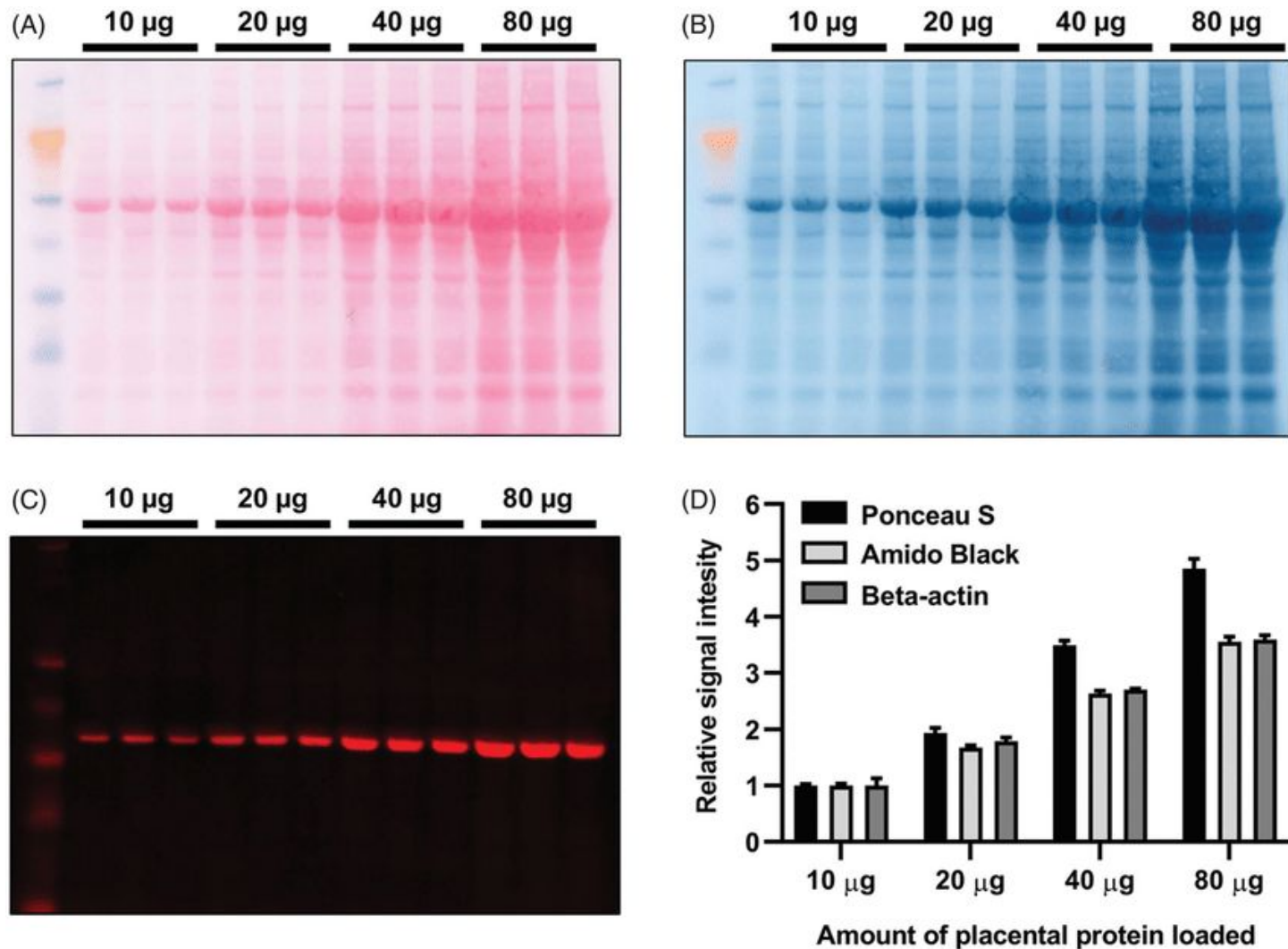




**Corar a membrana com corante Ponceau S 0,2%,**







Western blot loading control. For evaluation of loading controls, one membrane was first stained with: (A) Ponceau S; followed by (B) Amido Black; and lastly (C) the membrane was probed for beta-actin. (D) Quantification of total protein stains and beta-actin. Far left lane contained a molecular weight marker. Ponceau S displayed values closest to the expected doubling and was used as loading control for subsequent experiments. The mean values of the 10 mg protein loading signals were assigned a value of 1. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

# Transferência das proteínas: Fluorescência

## **Deteccção por fluorescência UV**

- **Sensibilidade: 2-8 ng**
- **Compatível com proteínas do Ladder**
- **Não bloqueia epítopos antigênicos**
- **Baixo ruído de fundo em membranas PVDF e nitrocelulose**
- **Ideal para normalização de proteínas totais em imunoblot**

# Transferência das proteínas: Fluorescência

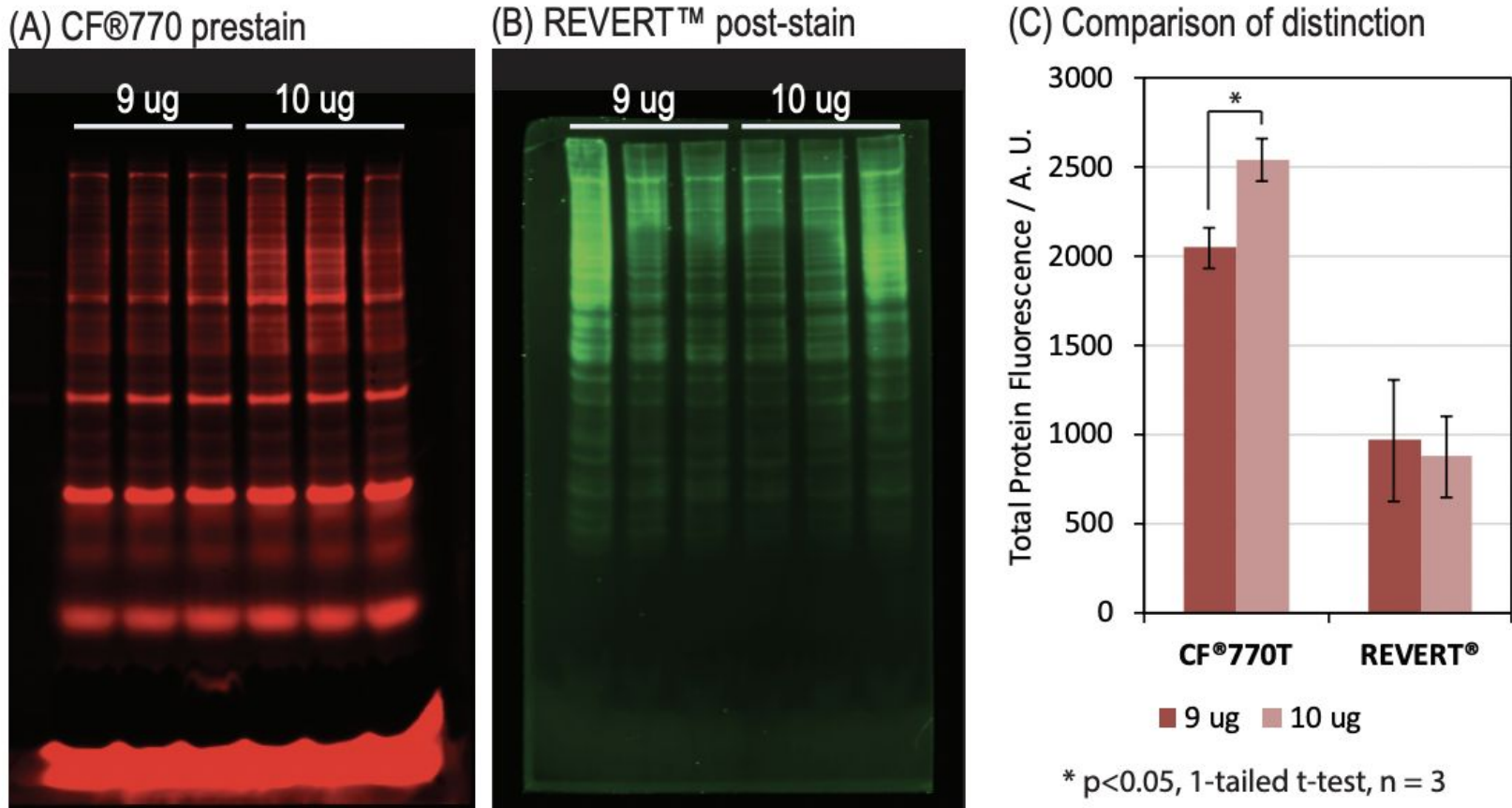
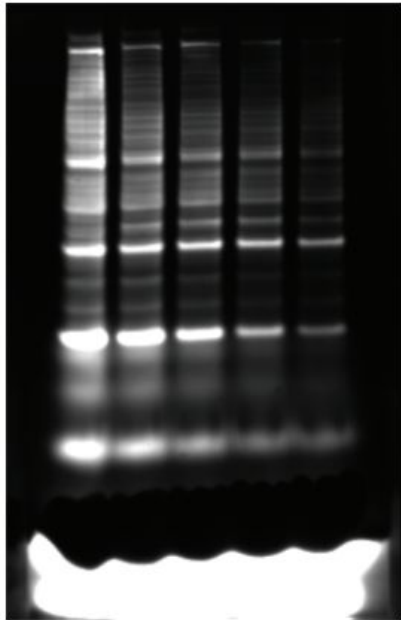


Figure 2. HeLa lysate was labeled with the VersaBlot™ CF®770T kit or left unlabeled. Lysates were loaded on SDS-PAGE gels at 9 ug or 10 ug total protein per lane and transferred to PDVF membranes. Proteins were imaged and quantitated using (A) VersaBlot™ CF®770T signal or (B) REVERT™ Total Protein Stain using an Odyssey® Infrared Imaging System. (C) CF®770T prestain demonstrated significant difference in signal while the REVERT® kit was not able to distinguish samples with 10% difference in protein content.

# Transferência das proteínas: Fluorescência

(A) CF®770 total protein prestained blot



(B) Blot after dye reversal



(C) WB signal after dye reversal



(D) Comparison of blot normalization methods

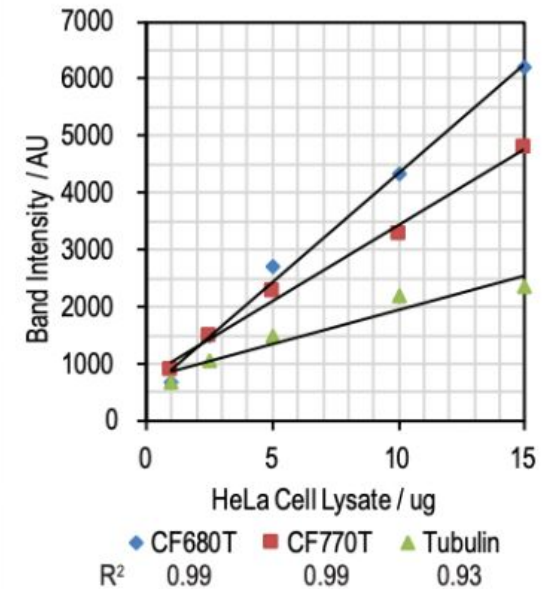
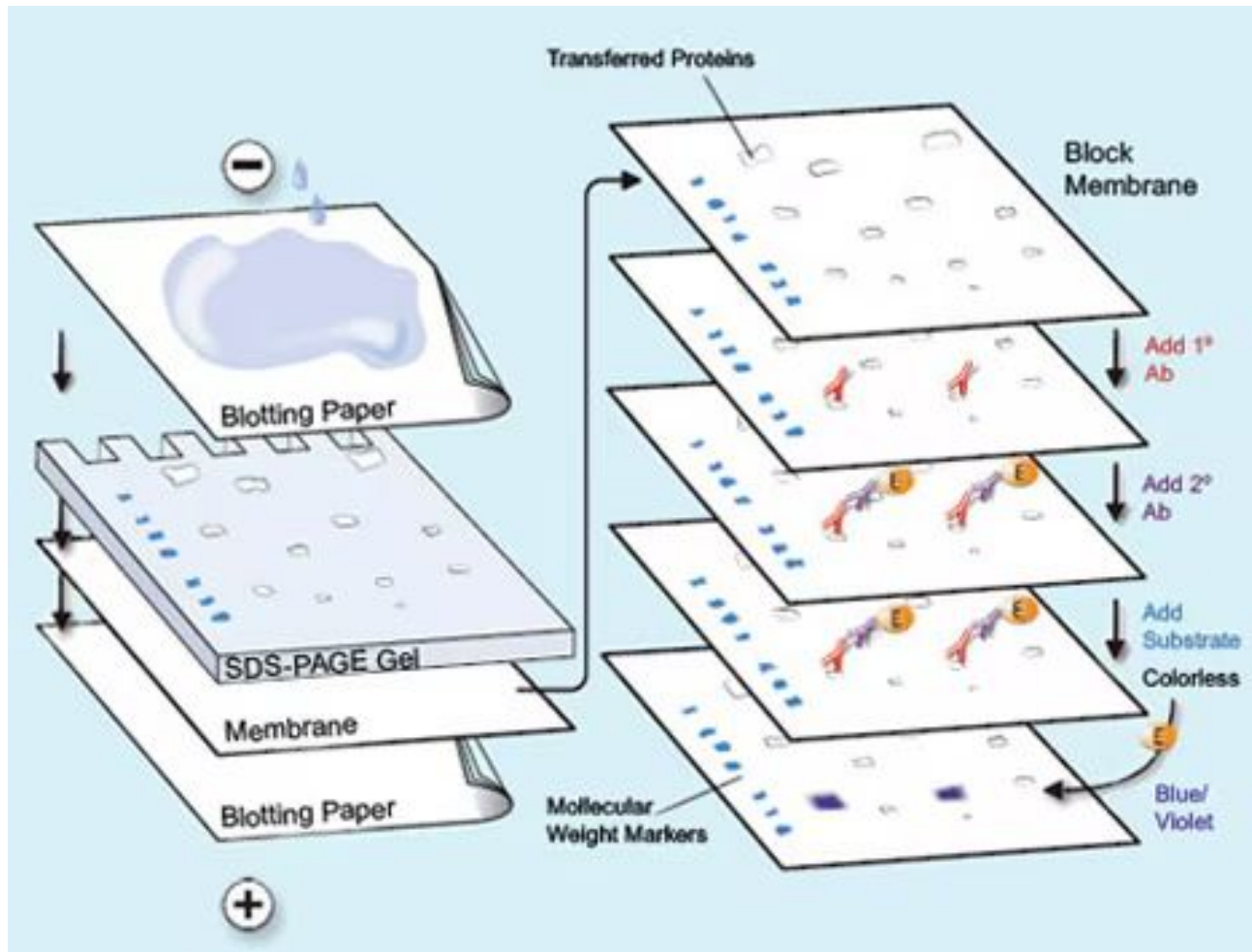


Figure 1. VersaBlot™ Total Protein Normalization Kits for WB normalization. (A) PVDF membrane detection of HeLa cell lysates in serial dilution with VersaBlot™ CF®770T kit. (B) Fluorescence following reversal protocol. (C) Tubulin detection via CF®770 conjugated secondary antibody after reversal. (D) Plots of band intensity vs. protein content for CF®680T and CF®770T labeled lysate compared to tubulin WB. The VersaBlot™ Total Protein Normalization Kits showed better linearity compared to the antibody labeling of housekeeping proteins.



# **Transferência: Armadilhas comuns - Solução de Problemas**

Transferência incompleta

Superaquecimento

Transferência desigual

Dificuldade com proteínas de alto peso  
molecular

Transferência de proteínas de baixo peso  
molecular

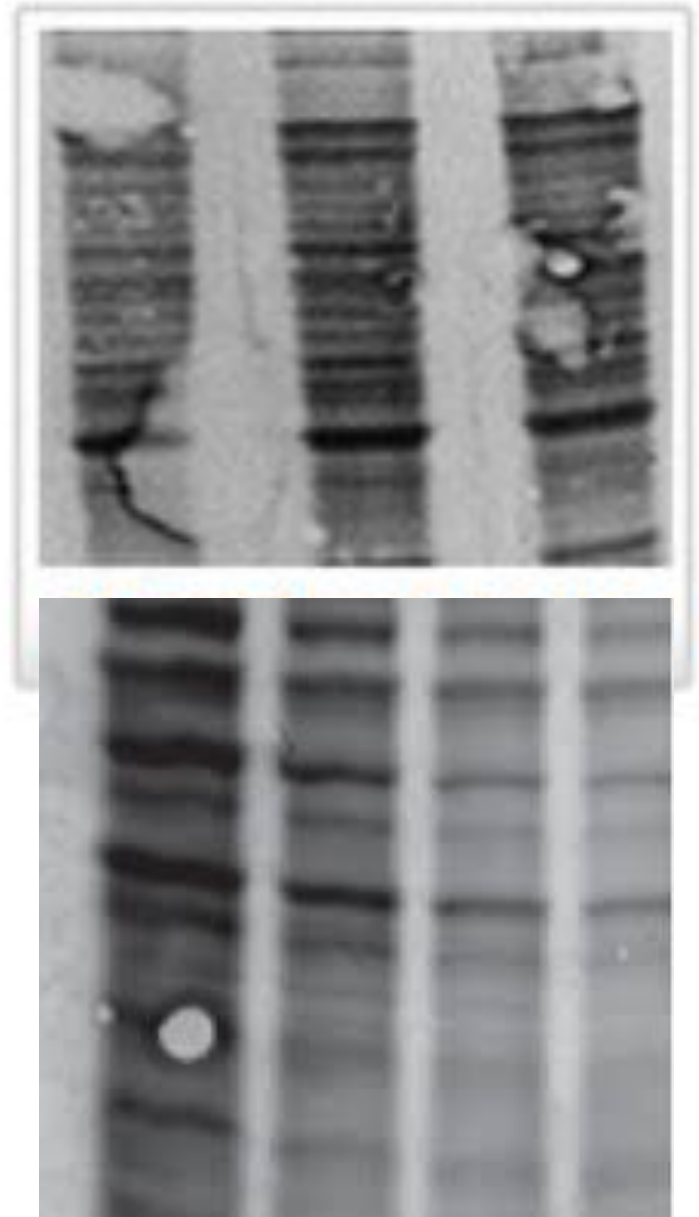
Falta de verificação



# Transferência: Armadilhas comuns - Solução de Problemas

Problema: Redemoinhos/bolhas

Solução: Bolhas de ar ou tampão ficaram presos entre o gel e a membrana durante a transferência, causando distorções locais. Use cuidadosamente o rolo para remover quaisquer espaços ou bolhas na pilha de transferência.

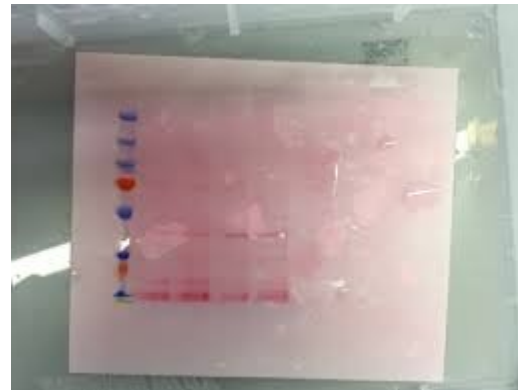


# Transferência: Armadilhas comuns - Solução de Problemas

Problema: Ausência de bandas/bandas fracas

Solução: Transferência excessiva ou insuficiente.

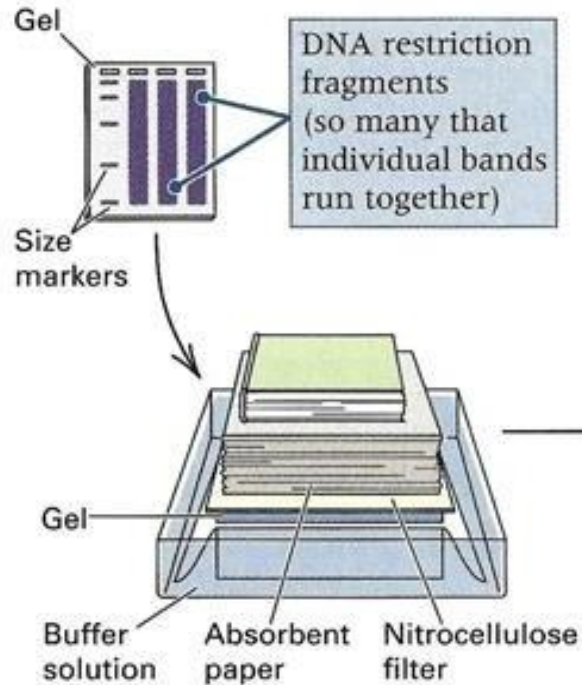
Ajuste as condições de transferência, o tipo de membrana ou o tamanho dos poros da membrana.  
Use coloração de proteína total para verificar a transferência.



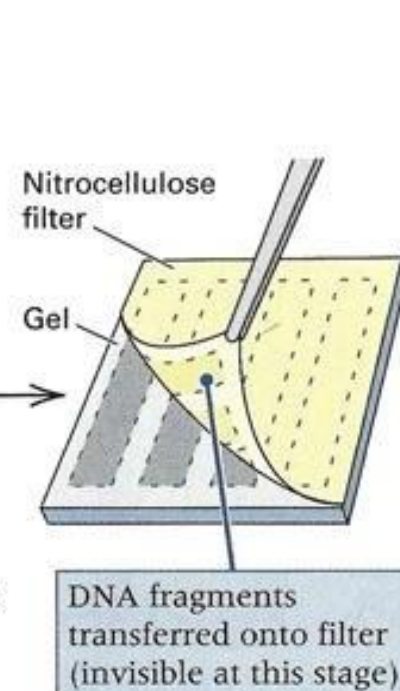


# Southern/Northern/Western Blot

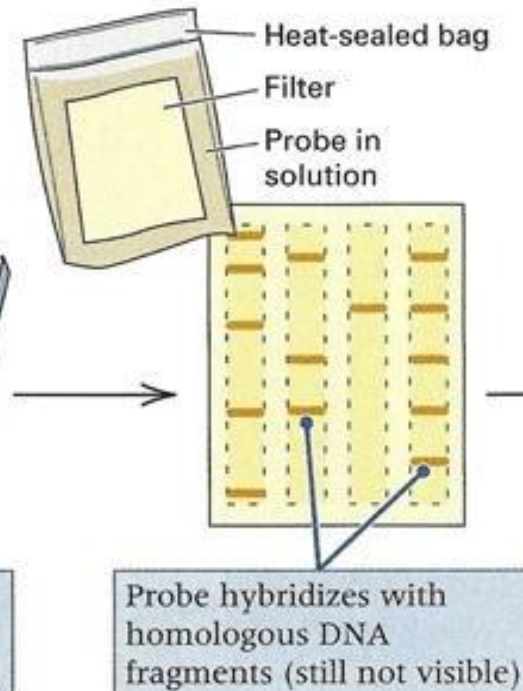
(A) DNA is cleaved; electrophoresis is used to separate DNA



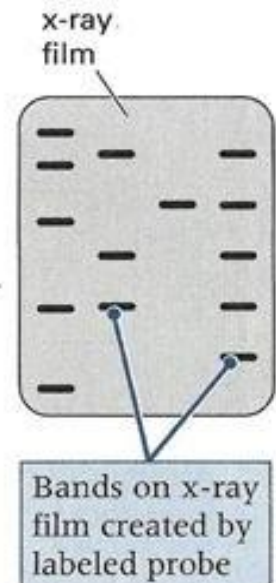
(B) DNA fragments are blotted onto nitrocellulose filter



(C) Filter is exposed to radioactive probe



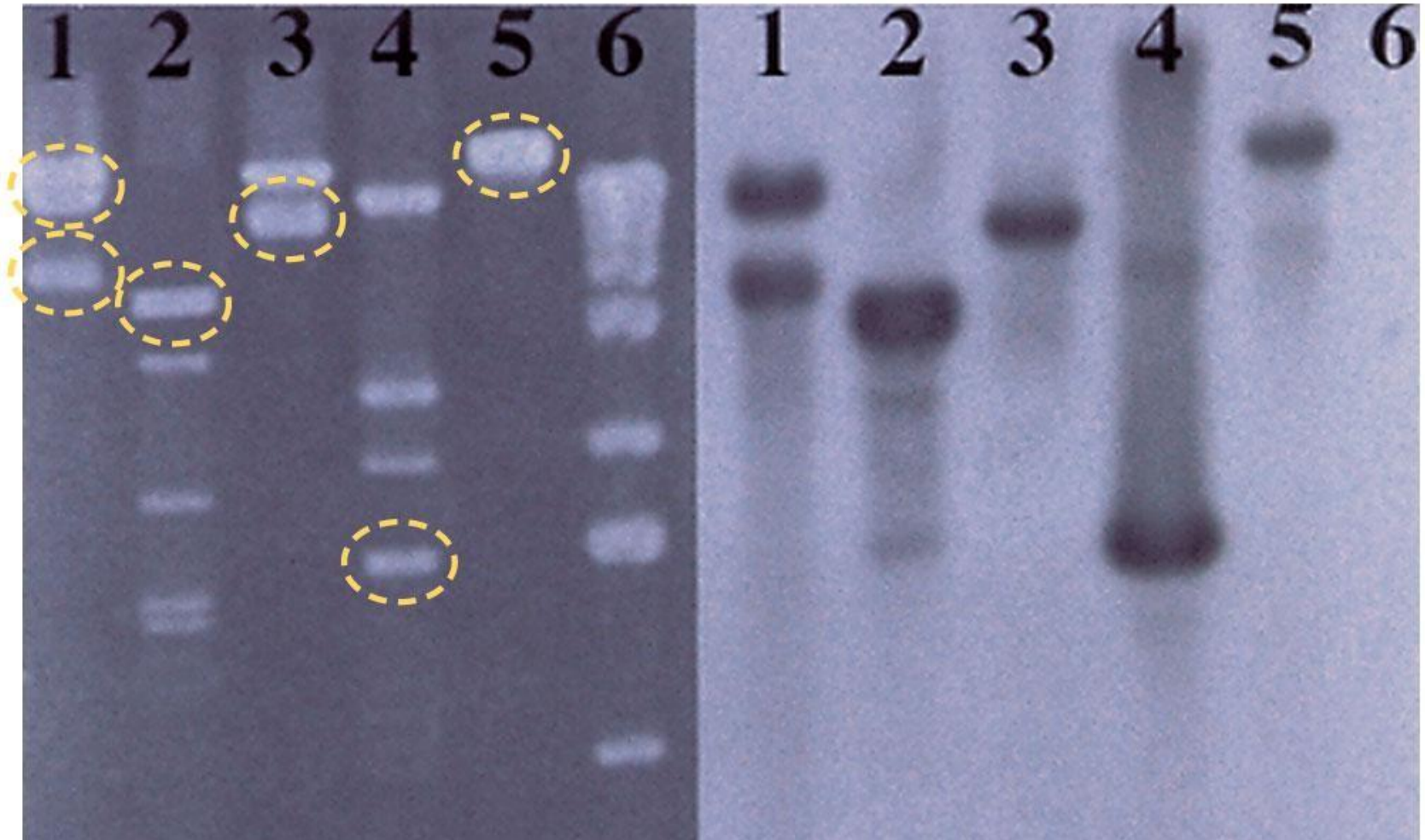
(D) Filter is exposed to photographic film; film is developed



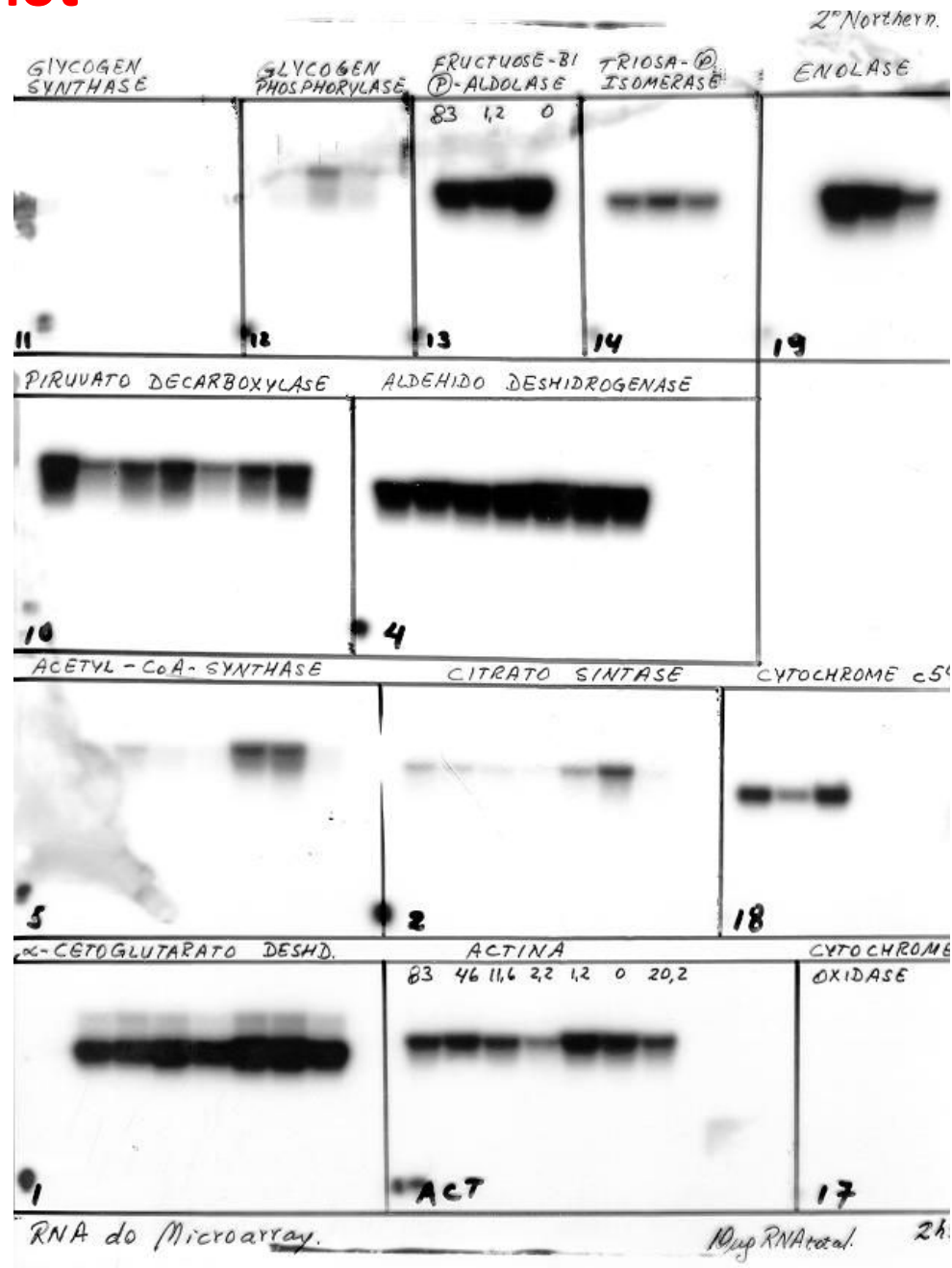
# Southern Blot

GEL AGAROSE

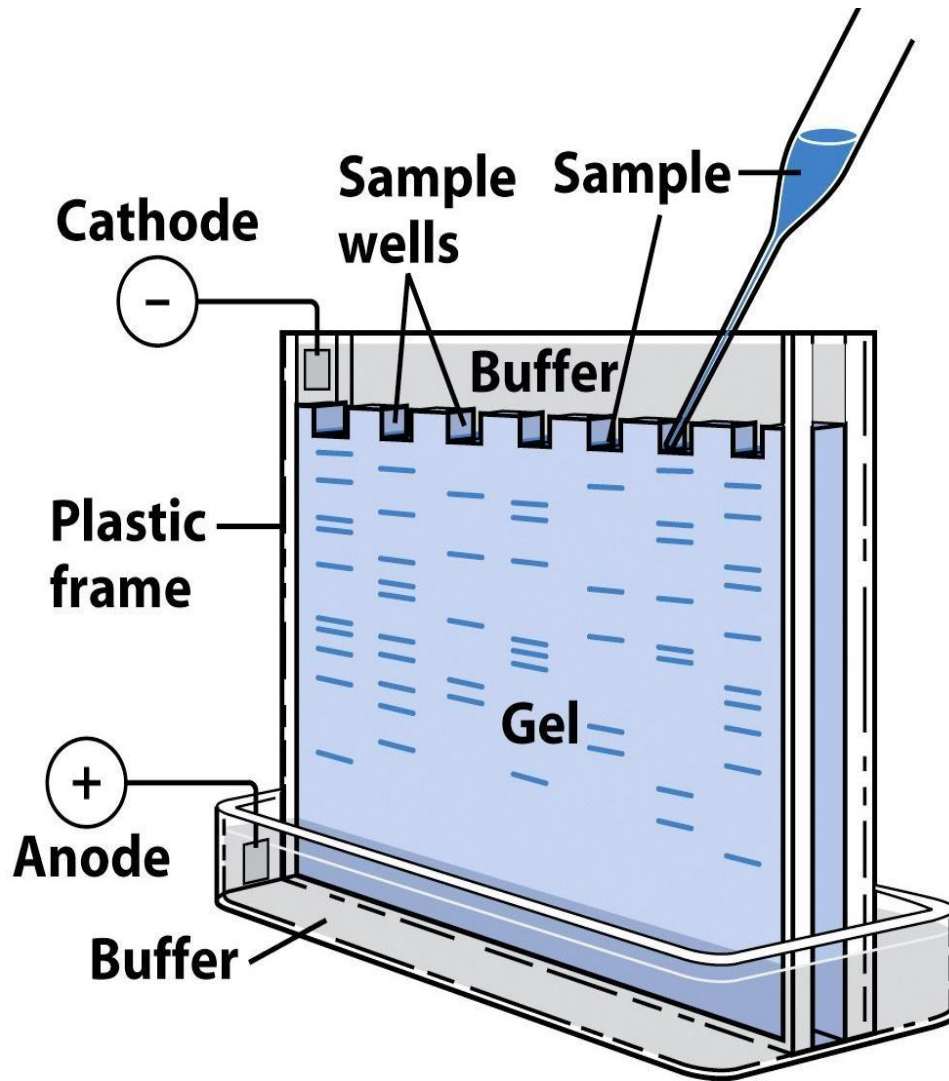
FILME RAIOS-X



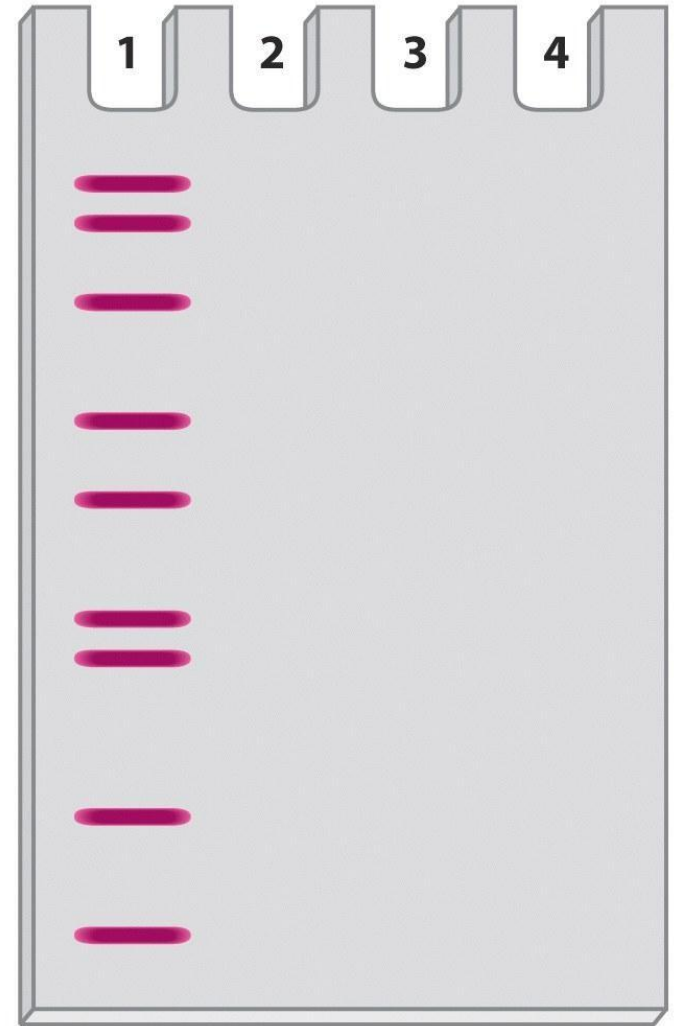
# Northern Blot



# Western Blot



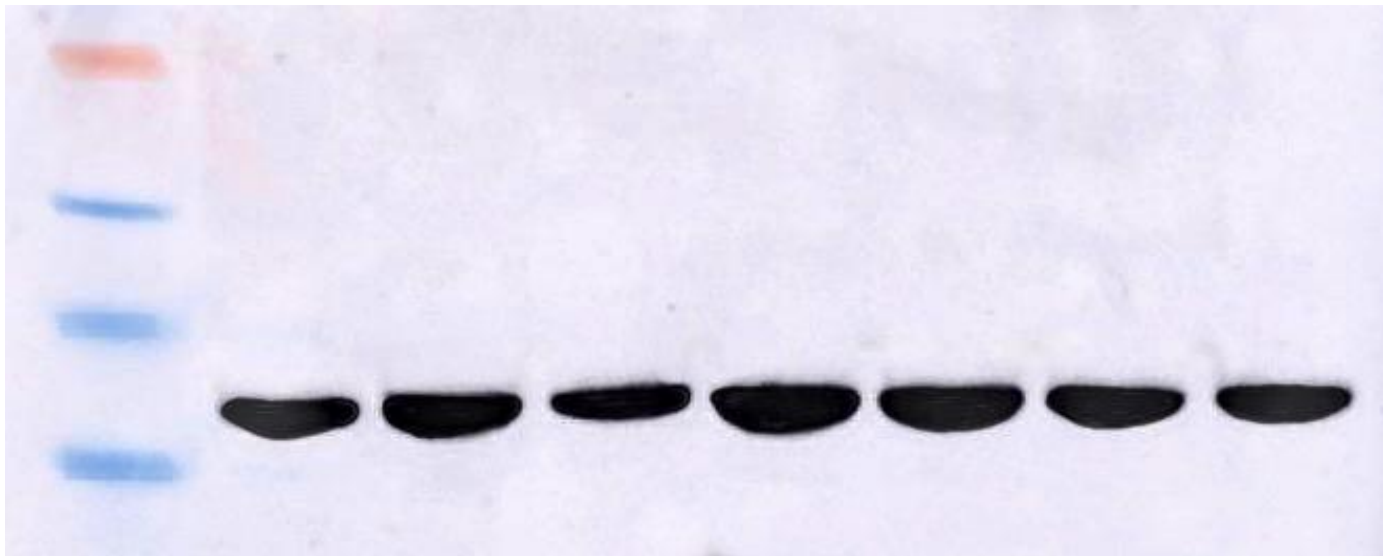
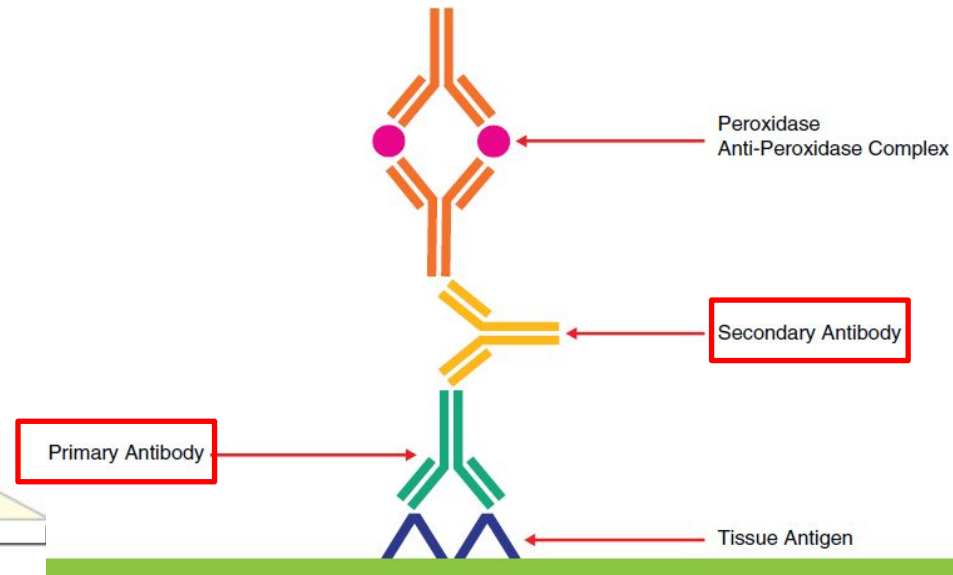
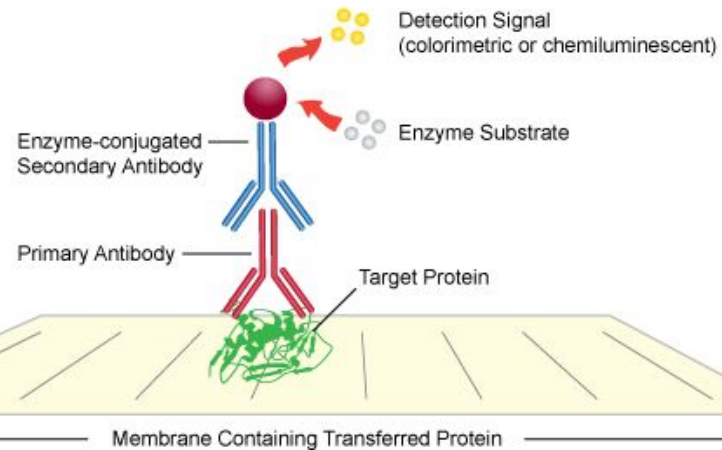
Electrophoresis



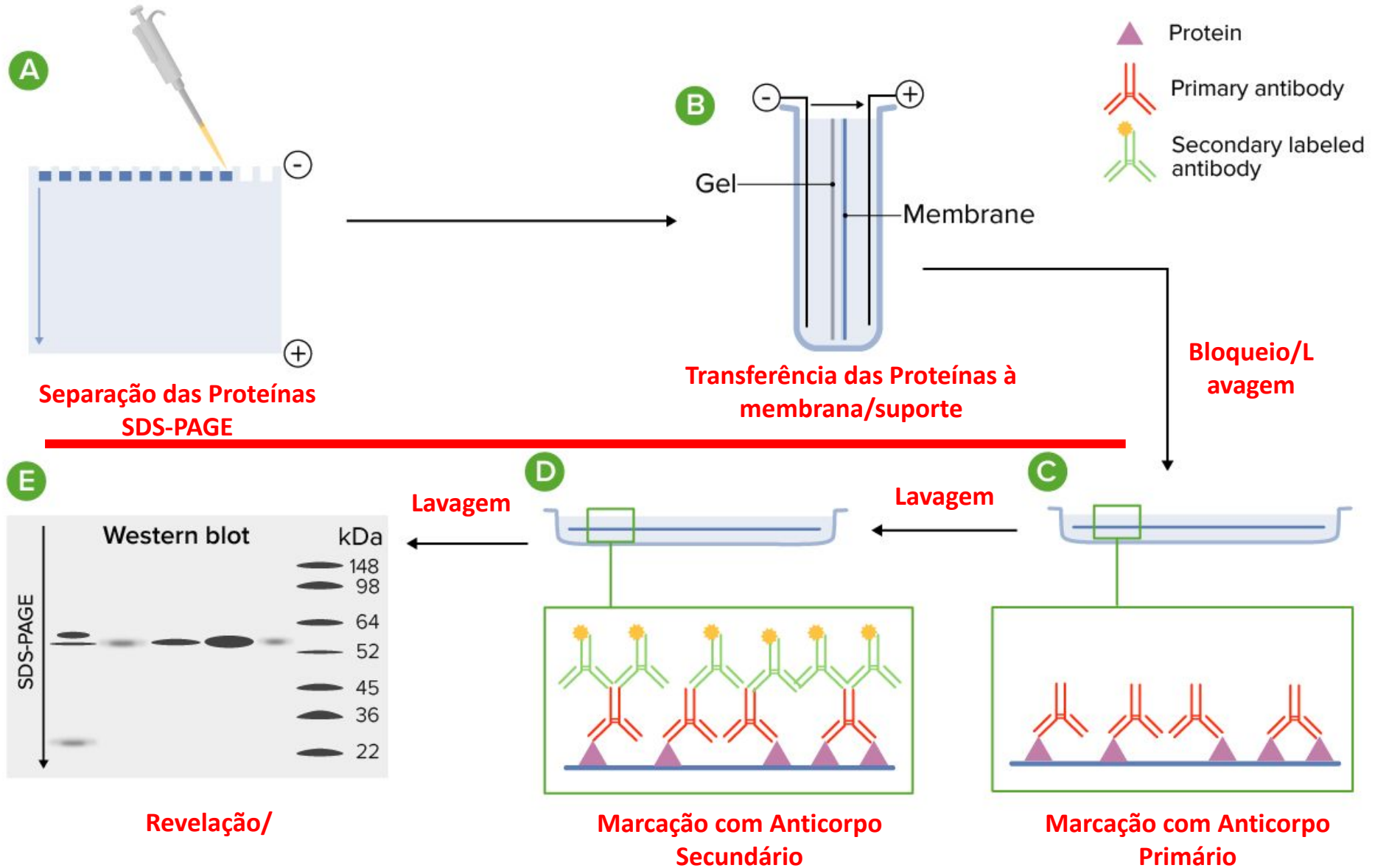


# Western Blot

## Detection in Western Blots



# Western Blot



# Western Blot - Vídeos

<https://www.youtube.com/watch?v=g7DT5xGheCE>

<https://www.youtube.com/watch?v=VgAuZ6dBOfs>