



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 (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

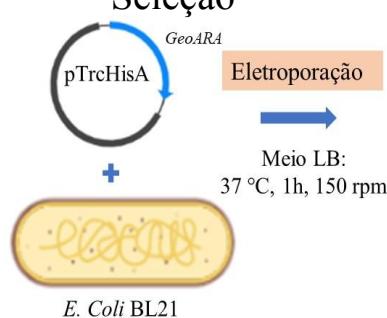
USP - 2025

Atividade de Proteína recombinante

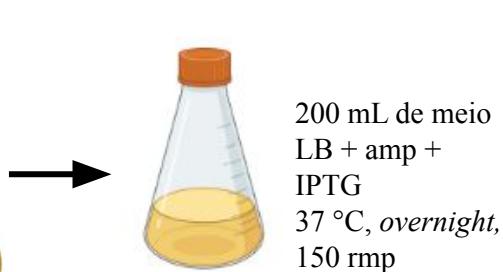
- 1. Atividade Enzima Catalase (CAT)**
- 2. Determinação de atividade enzimática por Zimograma - Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**
- 3. Imunodeteção de Proteínas: Transferência à membrana**

Expressão, purificação e atividade de Proteína recombinante

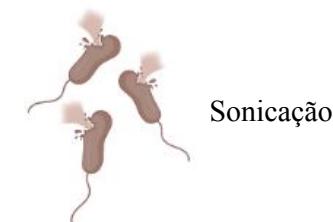
1 Transformação e Seleção



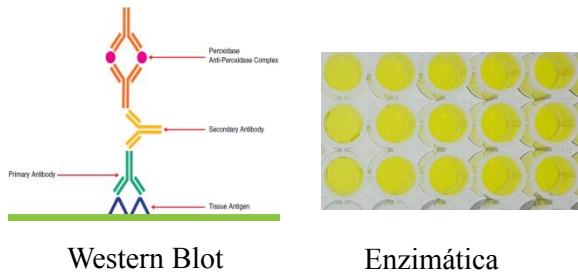
2 Produção da Proteína



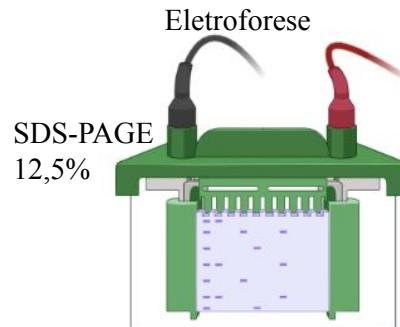
3 Lise celular



6 Análise de atividade

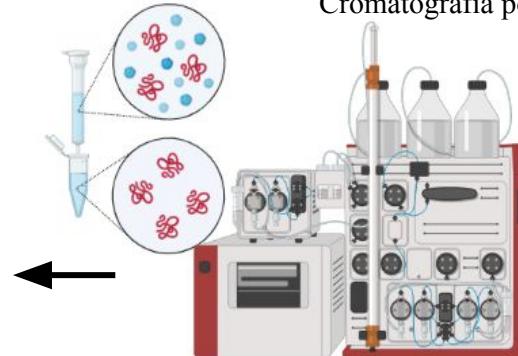


5 Análise da purificação



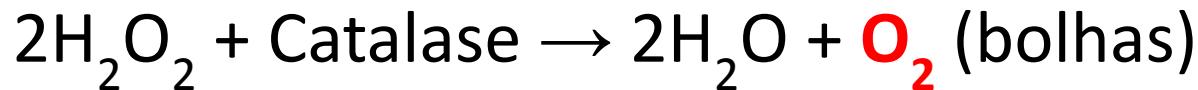
4 Purificação

Cromatografia por afinidade



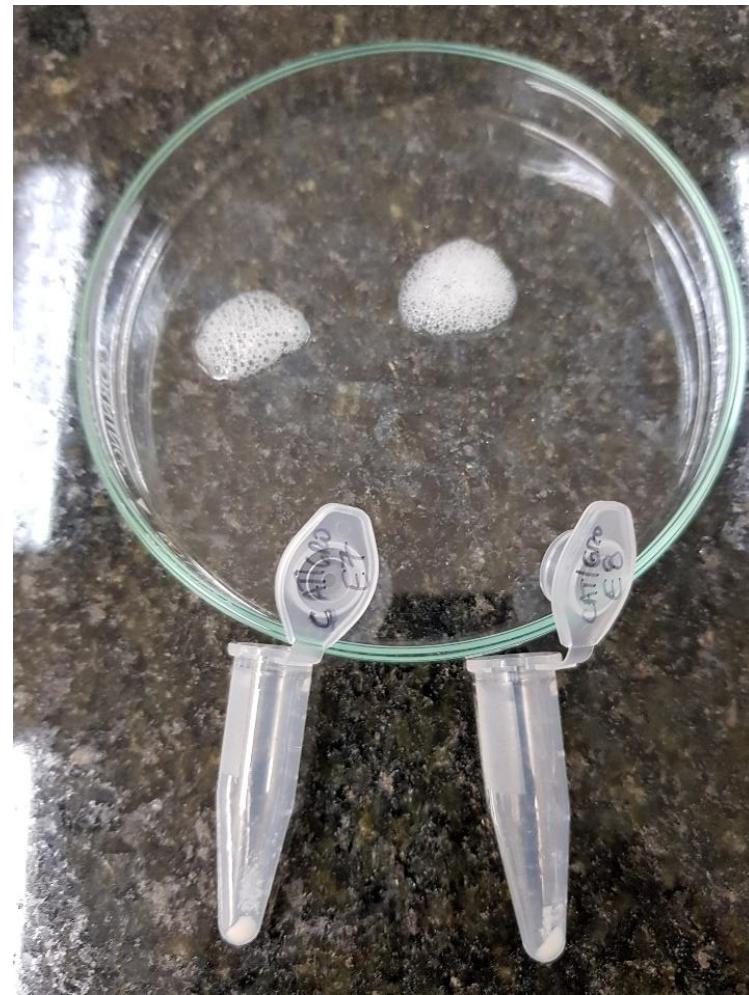
- Ligação
- Lavagem
- Eluição

1. Atividade Enzima Catalase



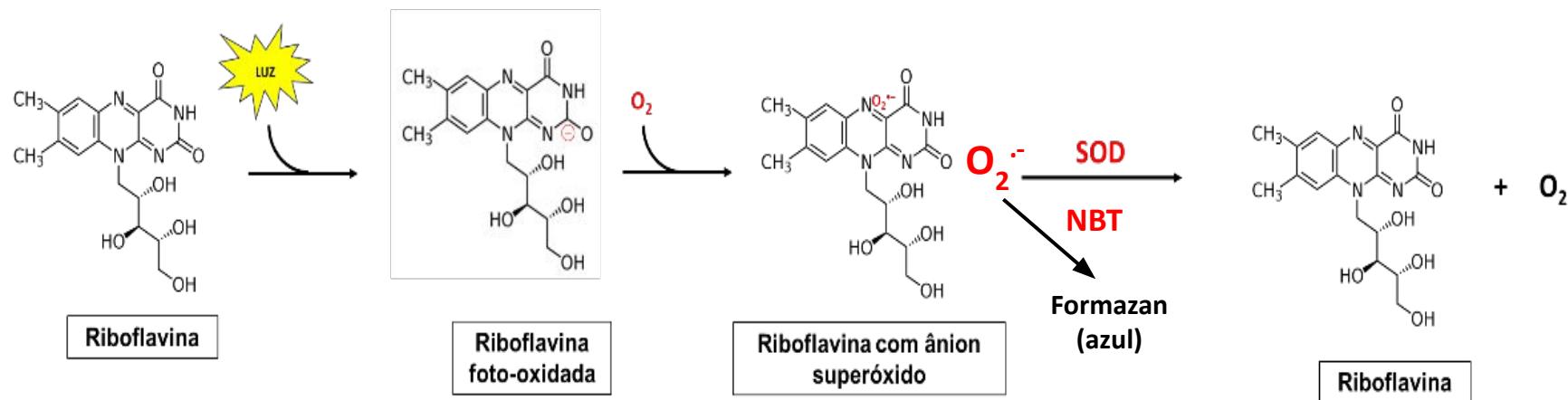
Procedimento:

1. Em uma lâmina de vidro, aplique 25 uL de uma solução 3% de H_2O_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 desnaturalante - Zimograma

Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

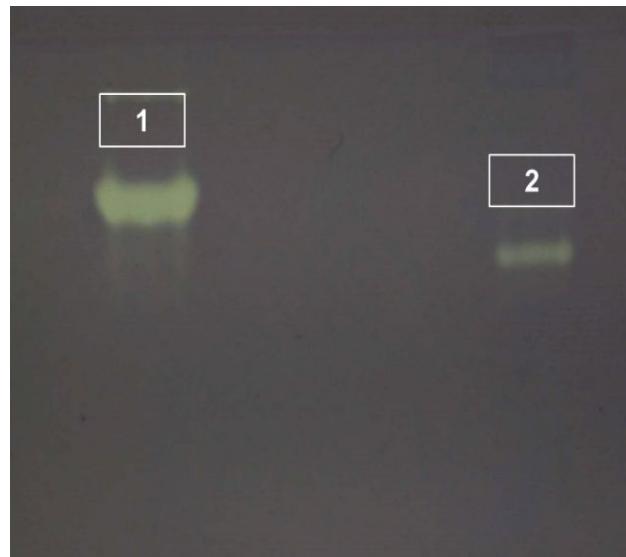


Amostra

- Não SDS
- Não β -MeOH
- Não ferve

Gel e Tampão

- Não SDS

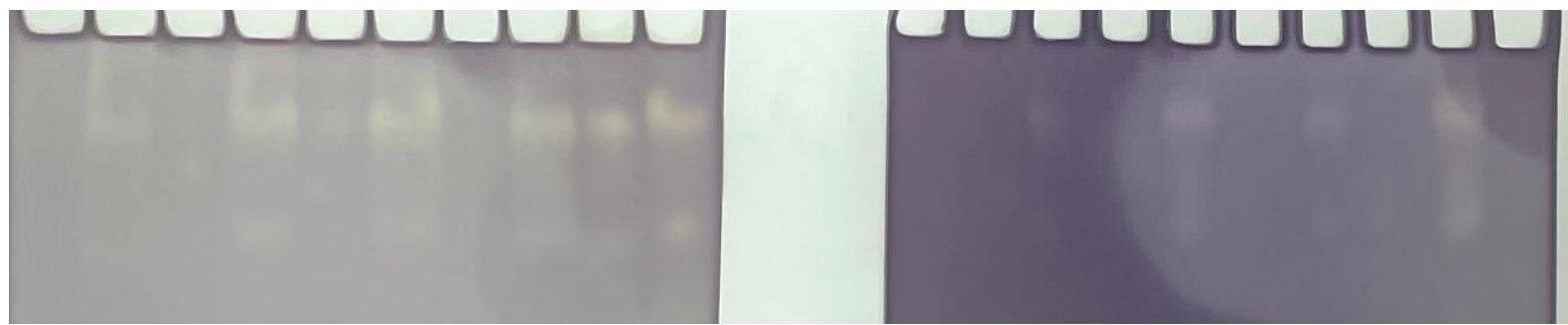


Determinação de atividade enzimática em gel não desnaturalante - Zimograma

Atividade Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

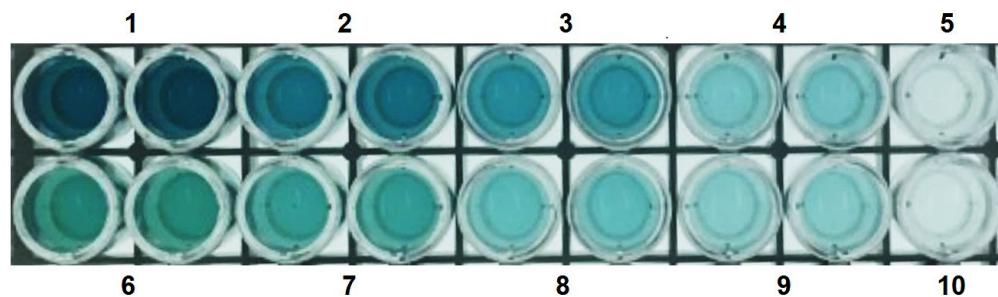
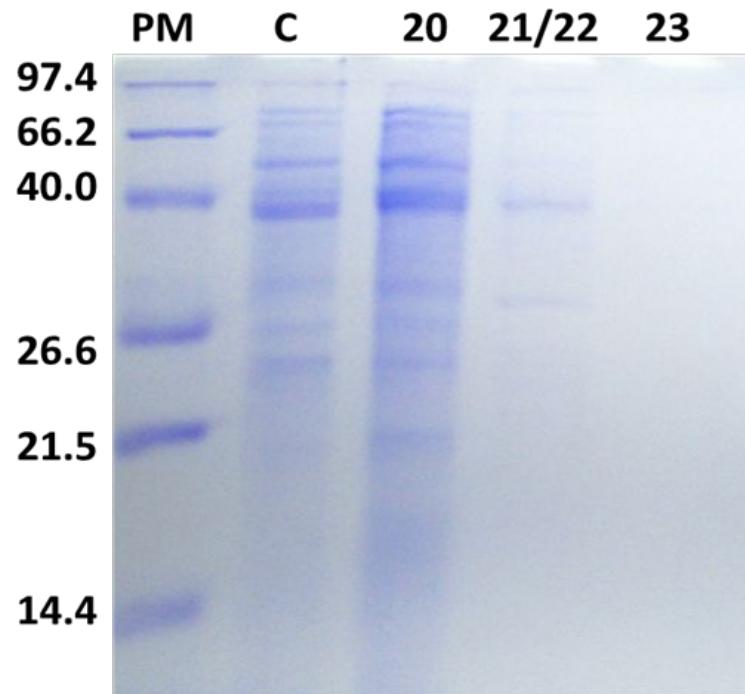
Procedimento:

1. Preparar sistema PAGE não desnaturalante 15% e tampão de corrida não desnaturalante (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 desnaturalante (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.

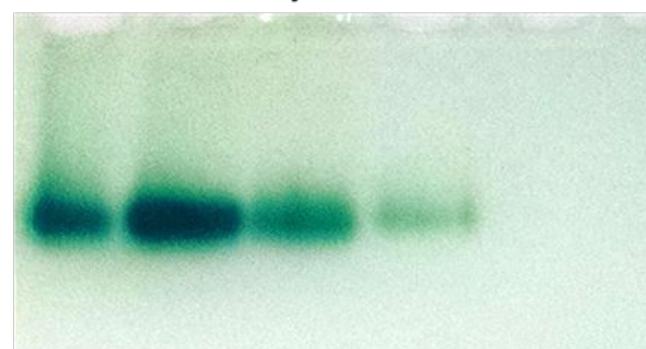


Identificação de enzimas Oxidases

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

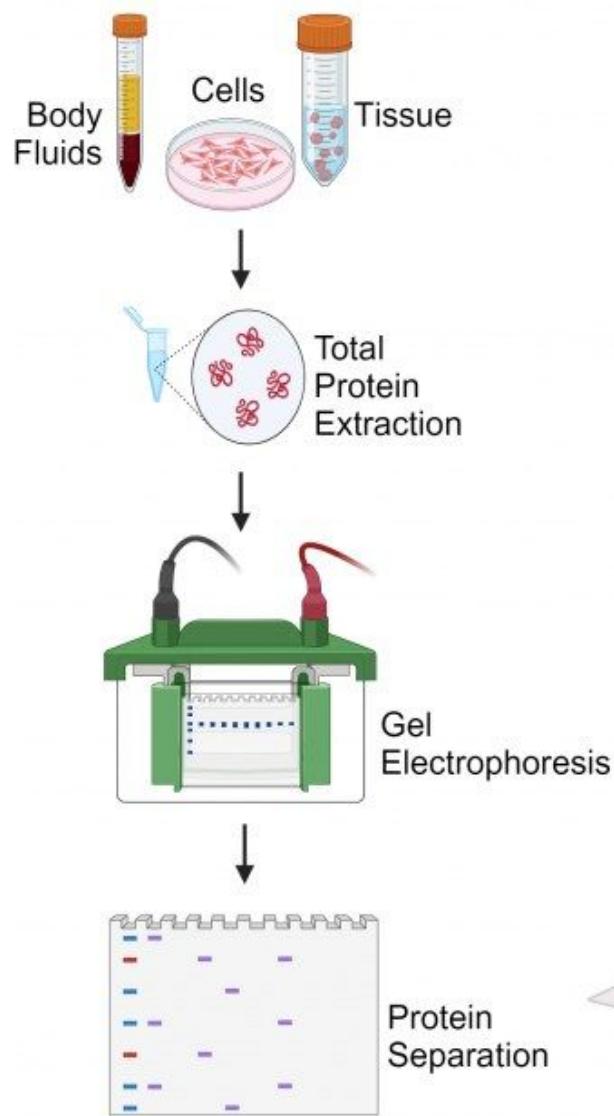
-**Western blot:** proteína está no gel

Imunodetecção de proteínas (Western Blotting)

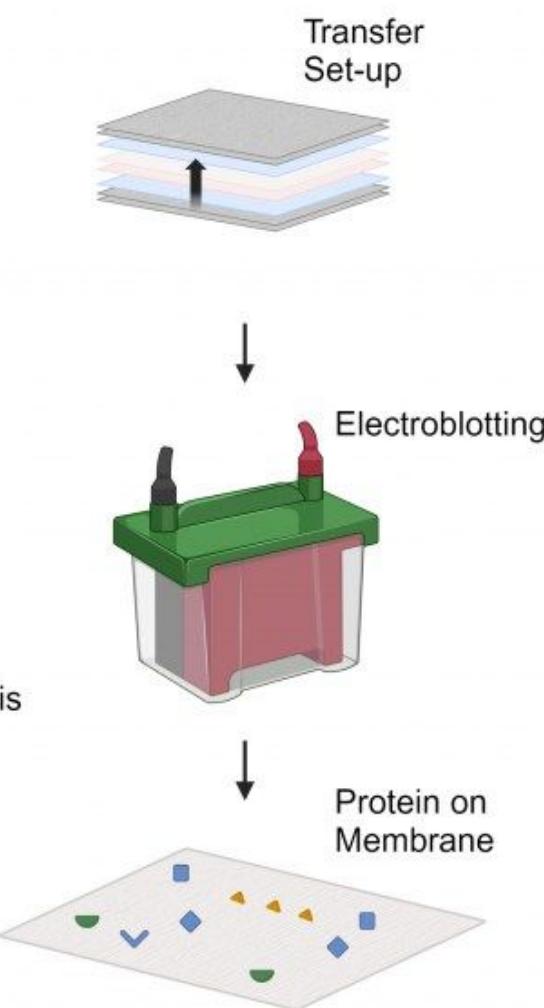
- técnica importante utilizada em biologia celular e molecular.
- identificar proteínas específicas em uma mistura complexa de proteínas extraídas de células.

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.

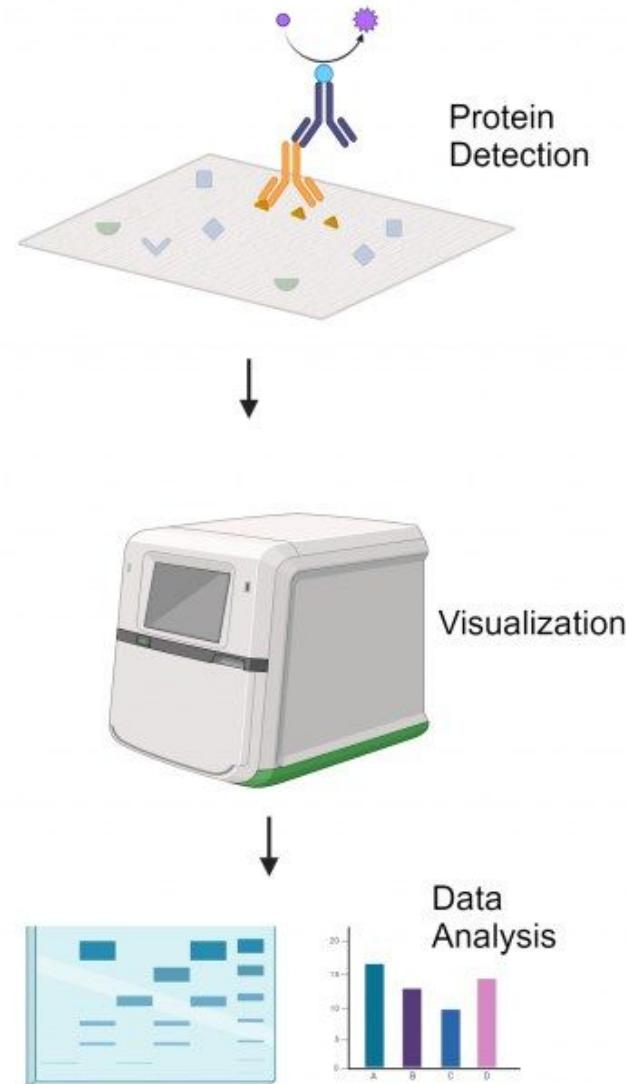
PolyAcrylamide Gel Electrophoresis



Western Blotting



Detection and Analysis



Seis passos para Western blotting

Etapa 1: Eletroforese em gel

Etapa 2: Transferência através da membrana

Etapa 3: Bloqueio

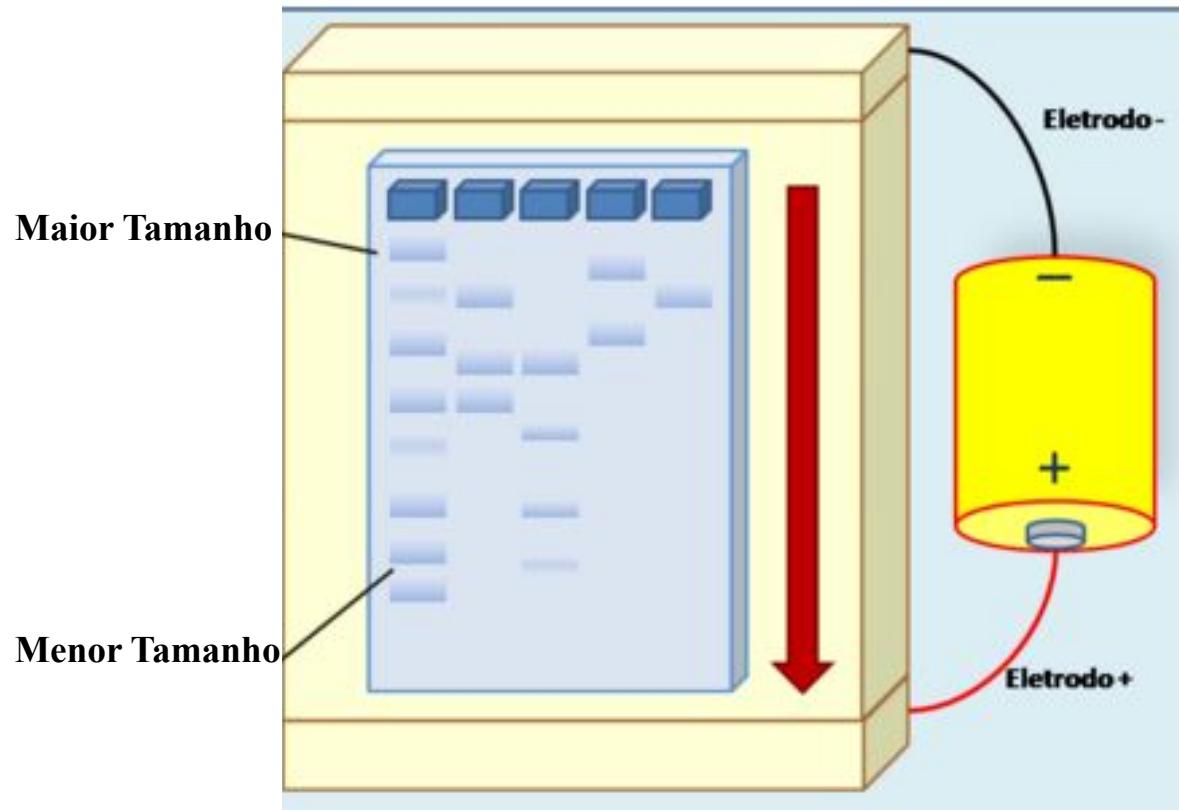
Etapa 4: Incubação com o anticorpo primário

Etapa 5: Incubação com anticorpo secundário

Etapa 6: Análise de Western Blot

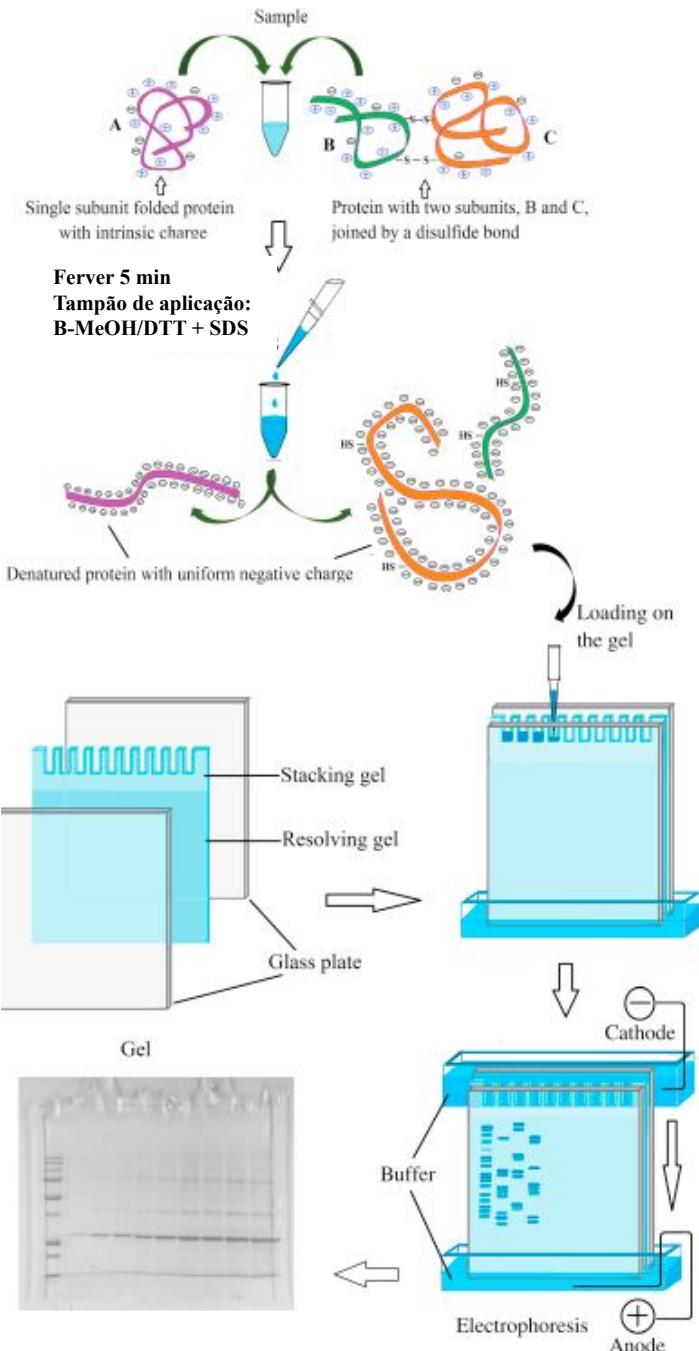
Eletroforese de Proteínas

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



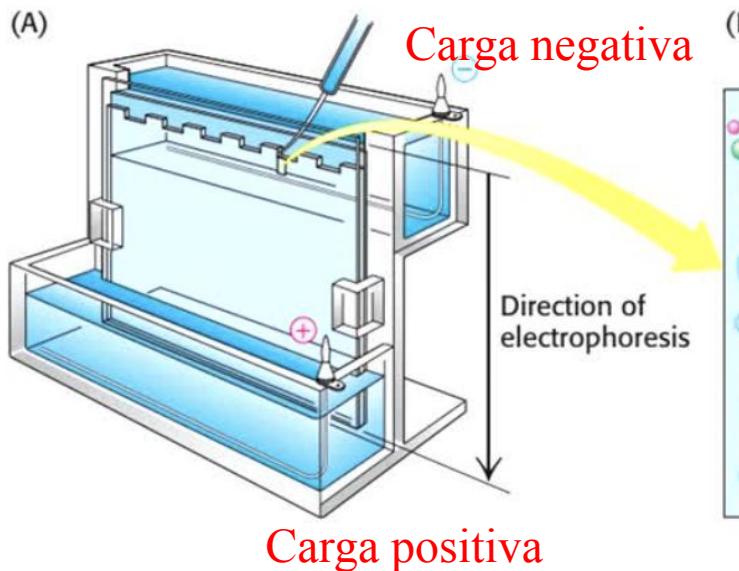
SISTEMA DE ELETROFORESE VERTICAL

Eletroforese de proteínas: SDS-PAGE

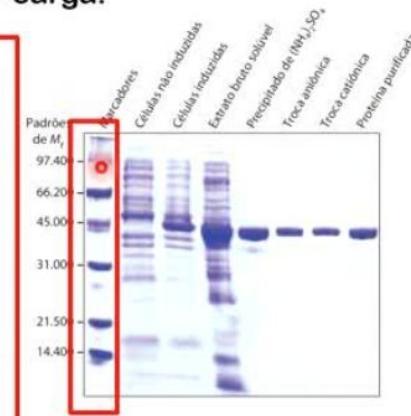
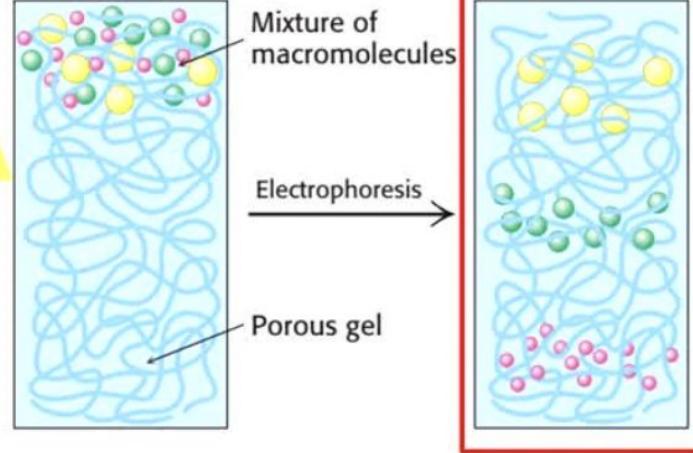


ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

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



Eletroforese em gel de acrilamida.
Separação de moléculas por carga.

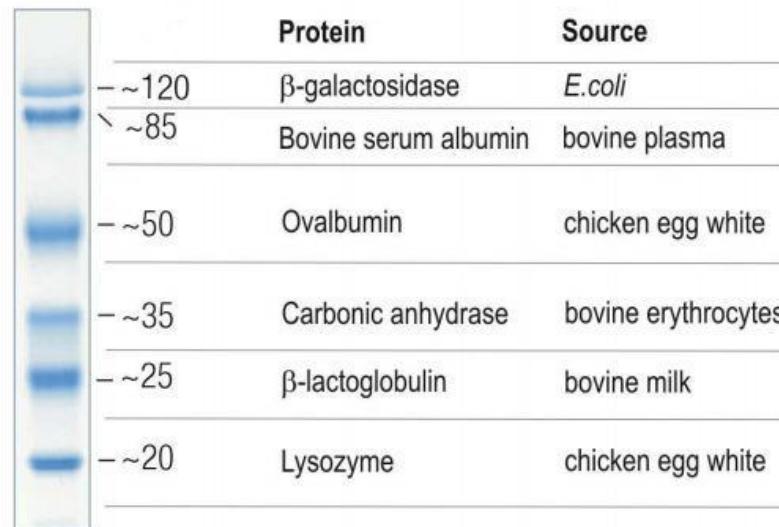


Eletroforeses de proteínas: SDS-PAGE

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.

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



8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

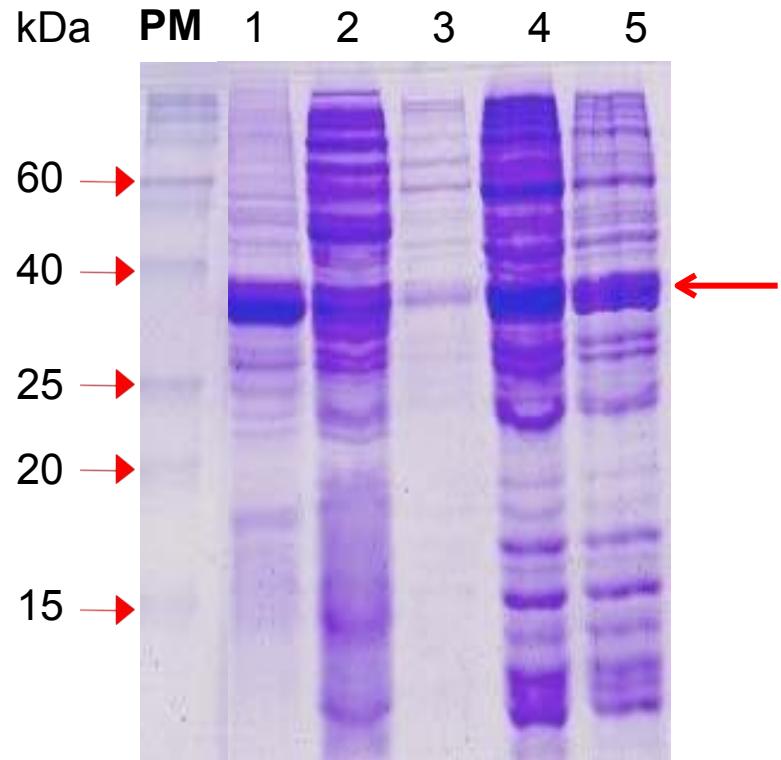


Figura 7. Análise da expressão e purificação de proteína por eletroforese SDS/PAGE (12,5%). Purificação de proteína: Linha 1 – fração insolúvel (10 μ L); Linha 2 – fração solúvel (10 μ L); Linhas 3, 4 e 5 - frações obtidas durante eluição da proteína a partir da coluna ‘HiTrap Chelating’ carregada com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

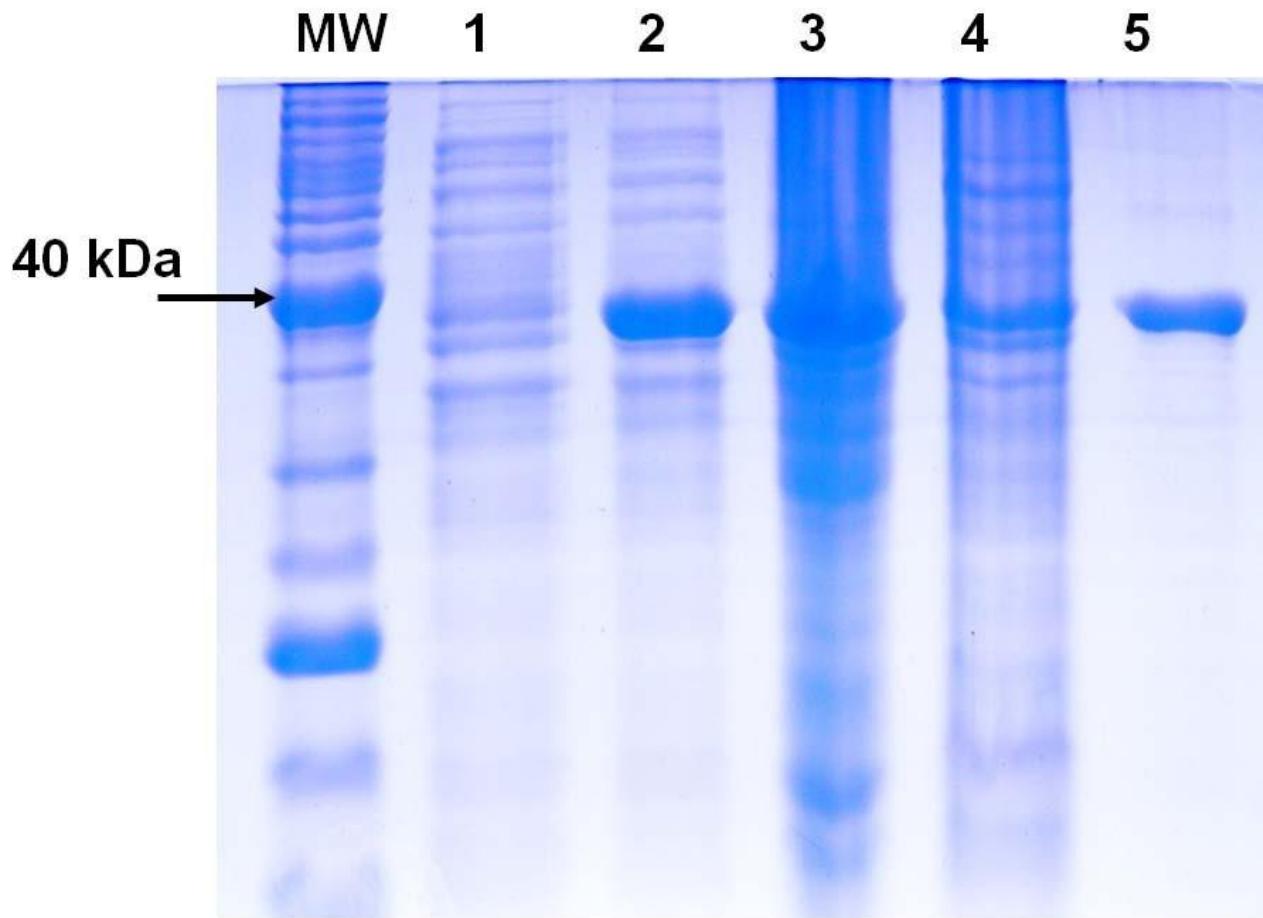


Figura 8 – Eletroforese SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína recombinante TrEH2, em *E. coli* BL21. (1) Amostra de 20 μ L da bactéria não induzida; (2) Amostra de 20 μ L da bactéria induzida com 0,5 mM de imidazol; (3) Amostra de 20 μ L do precipitado do lisado bacteriano (não solúvel);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

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

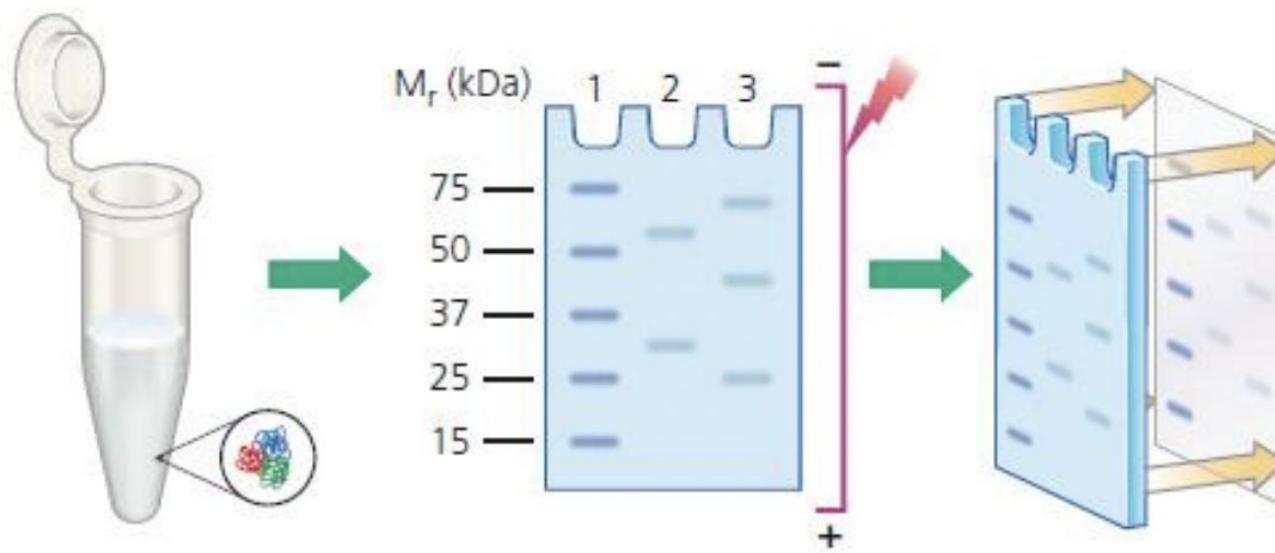
Etapa 6: Análise de Western Blot

TRANSFERÊNCIA

Procedimento:

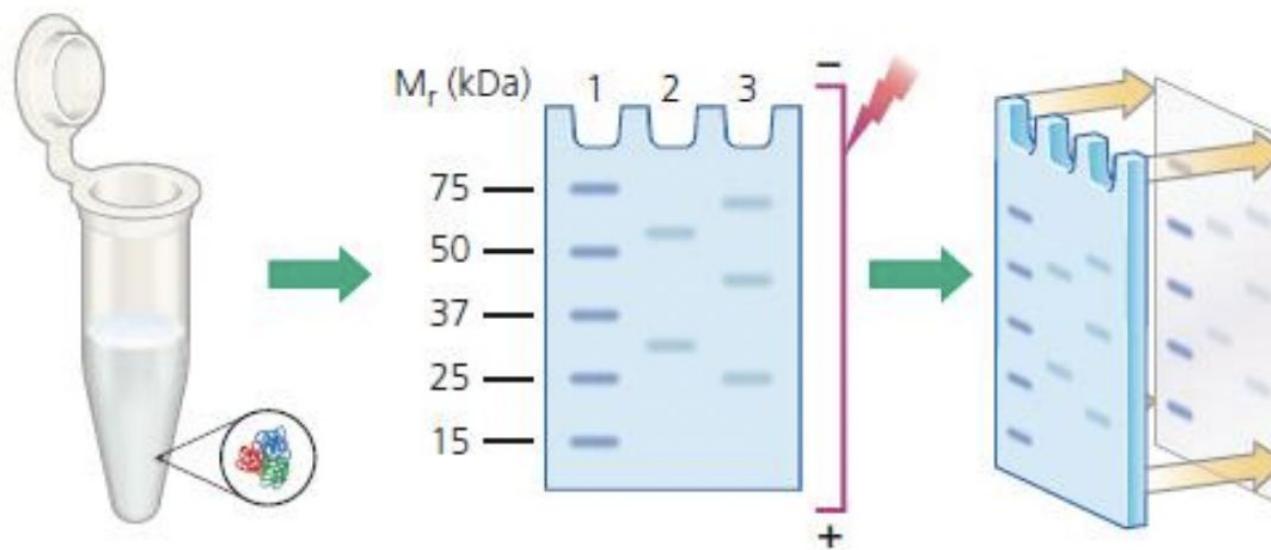
1. Após a separação das proteínas (Antígeno) presentes em gel de poliacrilamida/SDS , realizar a transferênciapara uma membrana de PVDF ,sob corrente elétrica à 300 mA, por 30 min, utilizando tampão de transferência (g/L: glicina 2,9/Trizma base 5,8/metanol 20%)
2. Após o período, verificar pelo marcador 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 identificara massa molecular das bandas.
4. Na sequênci a membrana de nitrocelulose será utilizada no ensaio de Imunoblot.

Porque transferir a proteína do gel para membrana?



Porque transferir a proteína do gel para membrana?

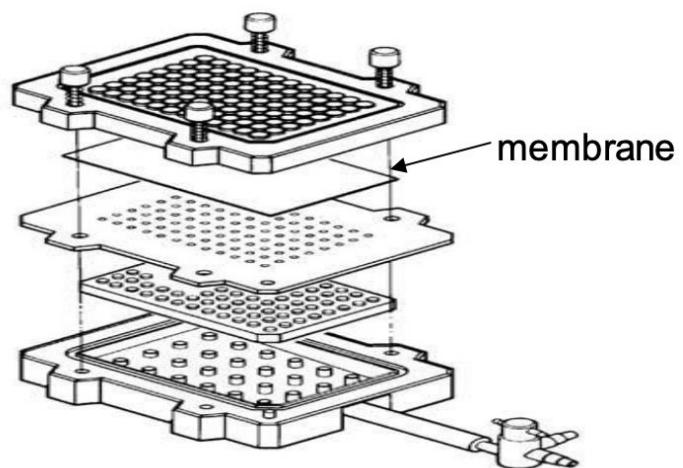
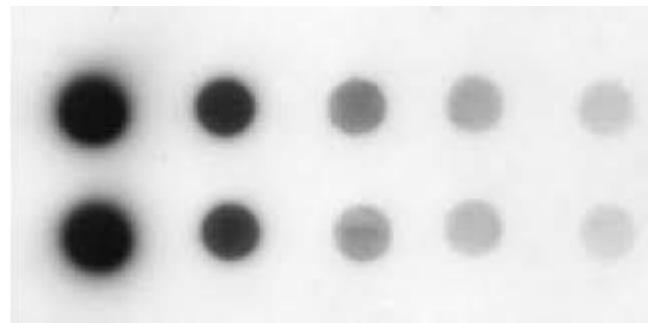
- pequenas moléculas (corante Comassie) se difunde através do gel poliacrilamida, mas grande moléculas (anticorpos) não permeiam o gel
- transferir a proteína para membrana permite a imunodetecção; anticorpos podem alcançar e se ligar às proteínas na superfície da membrana



Técnicas de Transferência

Dot-blotting: microfiltração

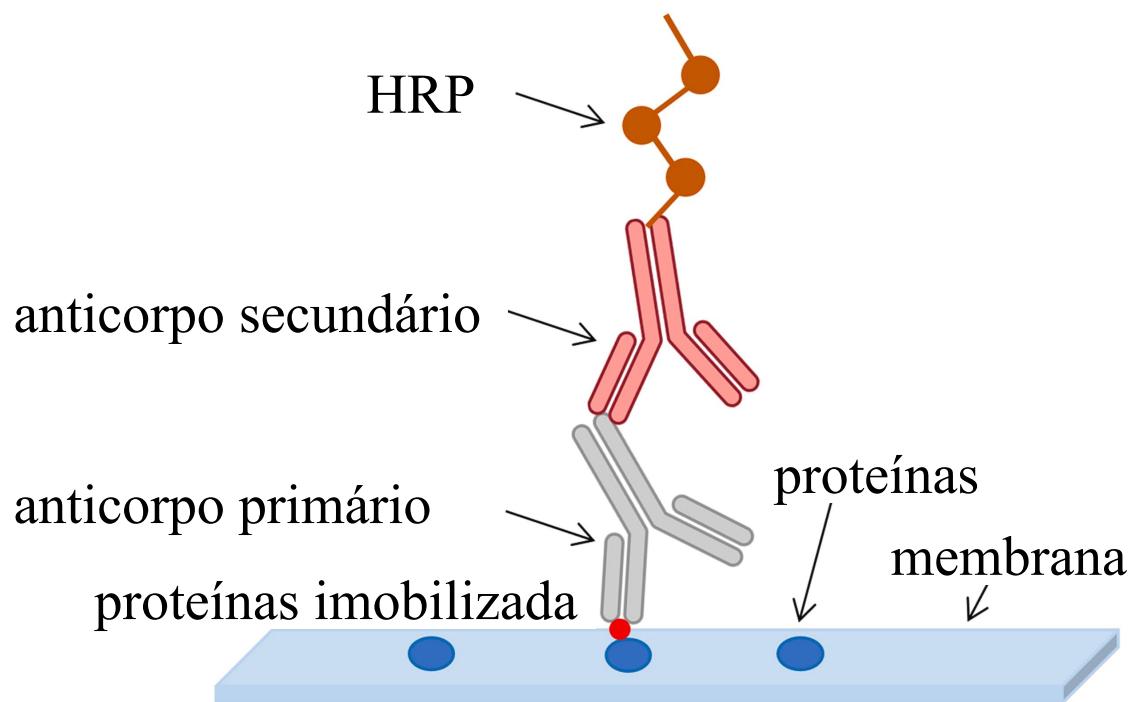
- Proteína aplicada manualmente na membrana
- volumes pequenos ou grandes
- o formato de 96 poços permite a triagem de grande número de amostras
- Não há separação de proteínas por peso molecular.



Técnicas de Transferência

Dot-blotting: microfiltração

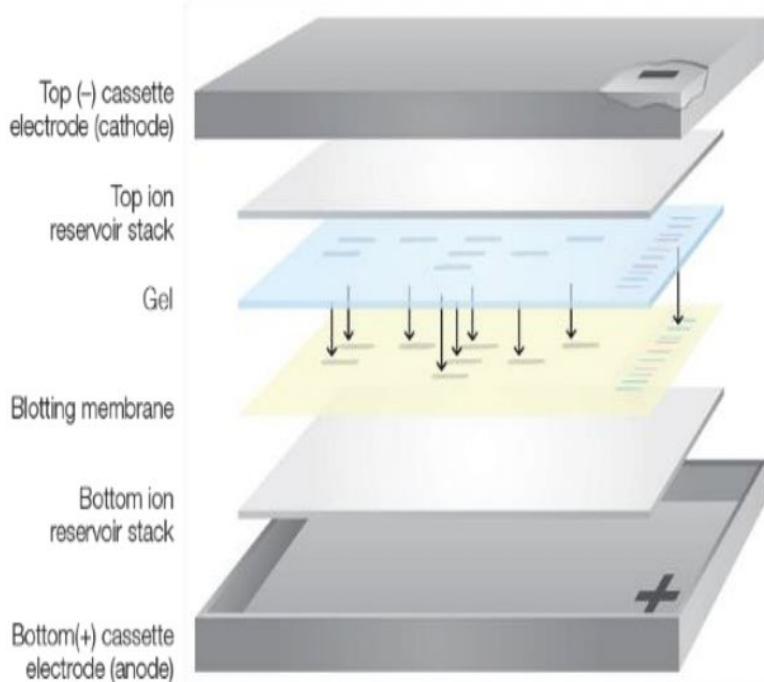
- Proteína aplicada manualmente na membrana.



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:

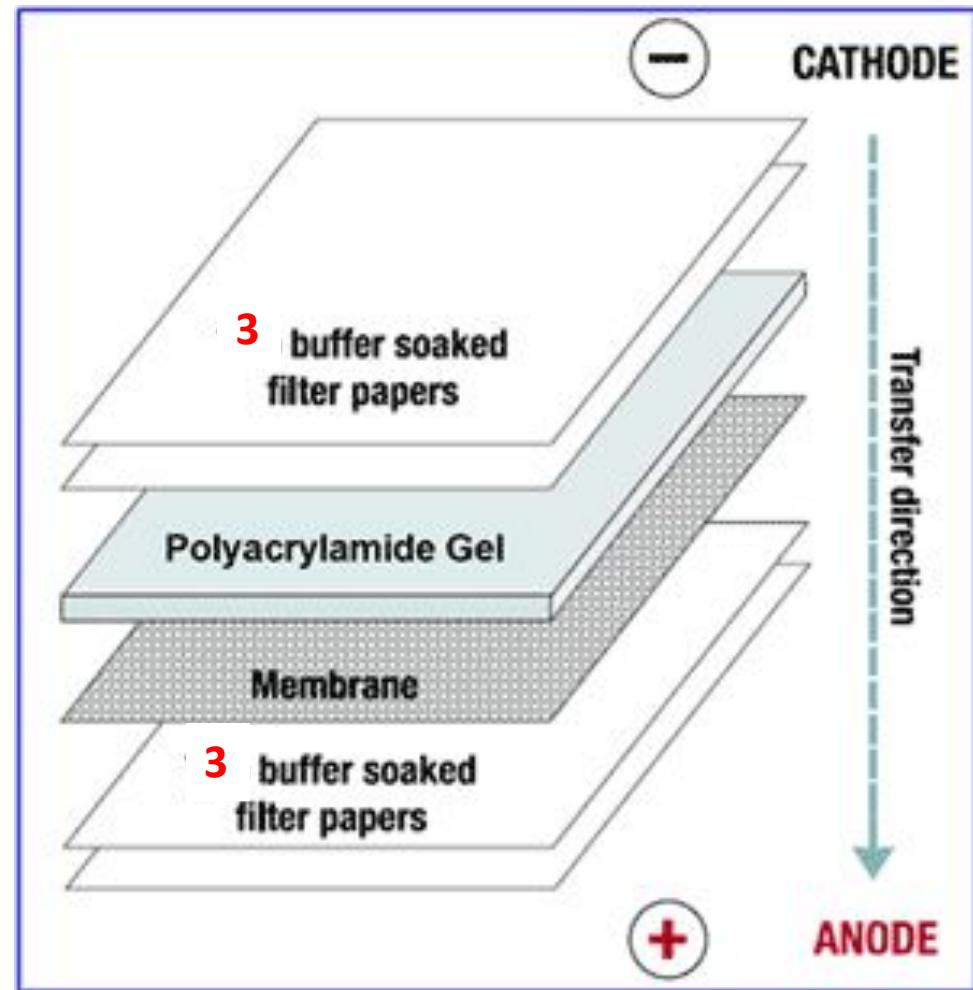
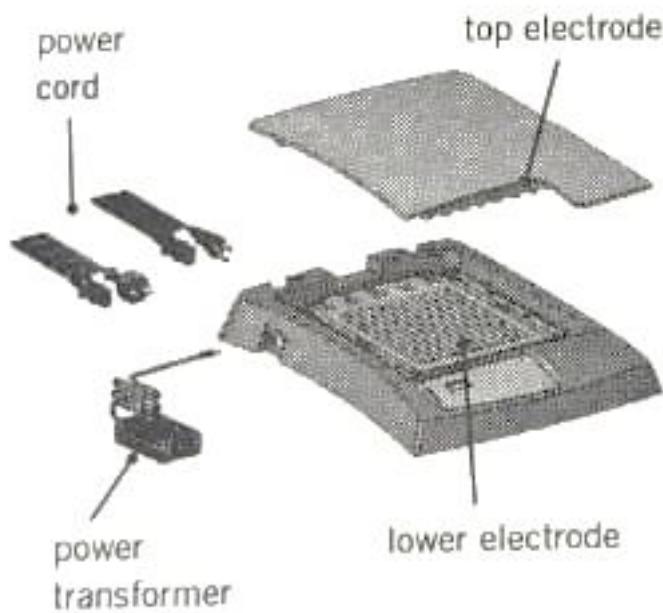
- A pilha de transferência está em contato direto com os eletrodos da placa.
- Alta taxa de transferência, ideal para alto rendimento
- Utiliza uma quantidade mínima de buffer de transferência
- Pode sobreaquecer devido à dissipação de calor limitada



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

300 mA/1 h

TE77 PWR



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

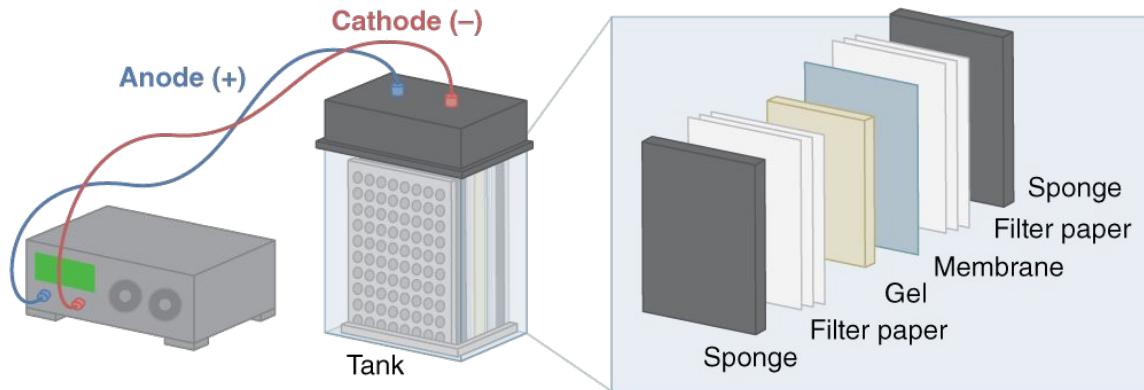
- **Transferência em tanque úmido (wet tank):**
- A pilha de transferência é submersa em tampão
- Papéis de filtro, gel e membrana precisam ser colocados entre esponjas e mantidos em uma cassete plástica
- Taxa de transferência mais lenta
- Voltagem e tempo flexíveis
- Confiável para transferência de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



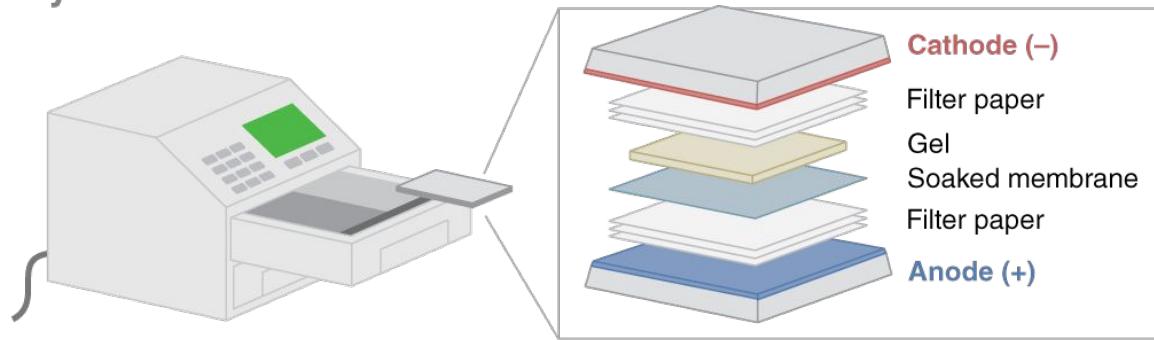
Técnicas de Transferência

- **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.

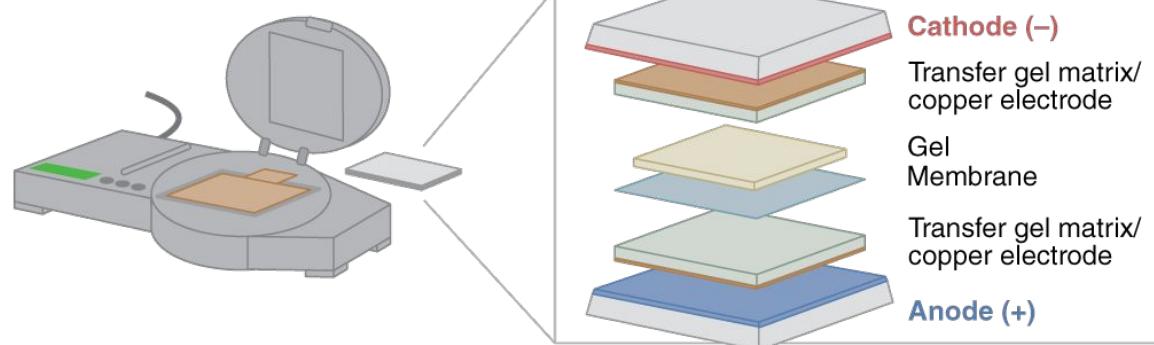
Wet transfer



Semi-dry transfer



Dry transfer



Membrana: Nitrocelulose

As técnicas iniciais de Western blotting utilizavam a membrana de nitrocelulose (nitrato de celulose - pímero 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 μm e 0,22 μm .

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

- métodos de detecção como coloração, fluorescência, quimioluminescência e radiomarcação
- 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 ($150\text{-}200\text{ }\mu\text{g/cm}^2$) à da nitrocelulose.

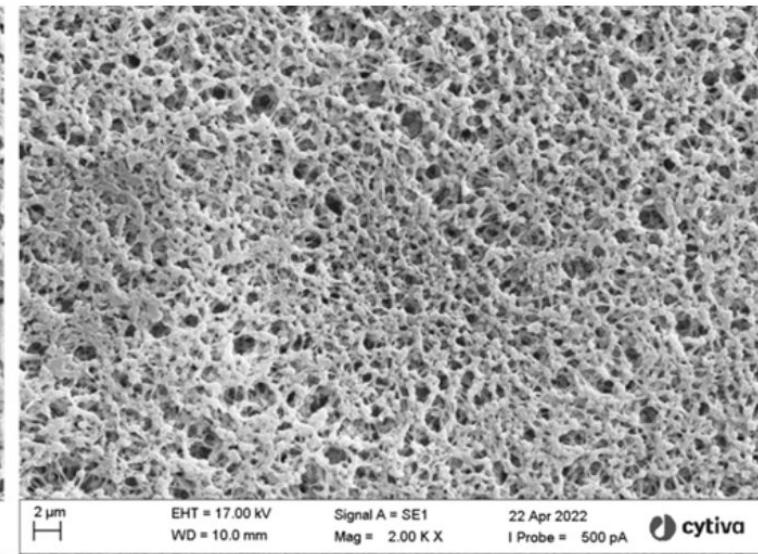
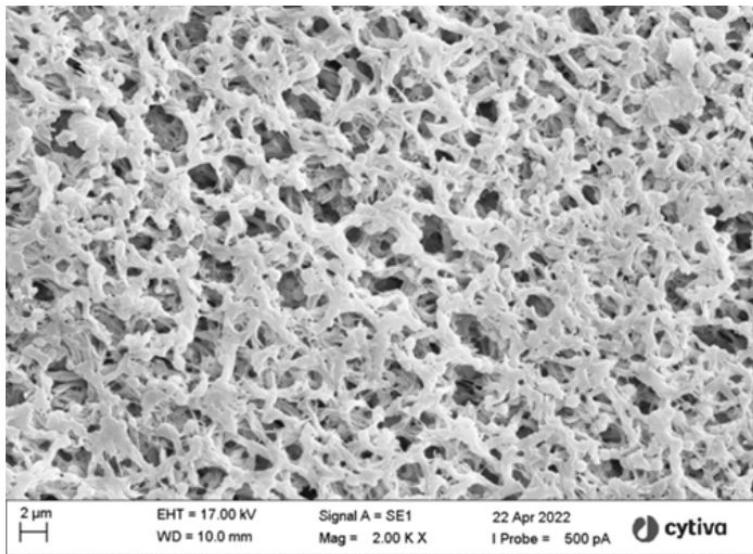
- O PVDF pode fornecer um sinal quimioluminescente forte.
- Deve ser umedecido previamente com solvente orgânico (MeOH) antes da montagem da membrana de transferência.
- Disponível também com poros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$, $0,22\text{ }\mu\text{m}$ e $0,1\text{ }\mu\text{m}$.
- As proteínas transferidas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

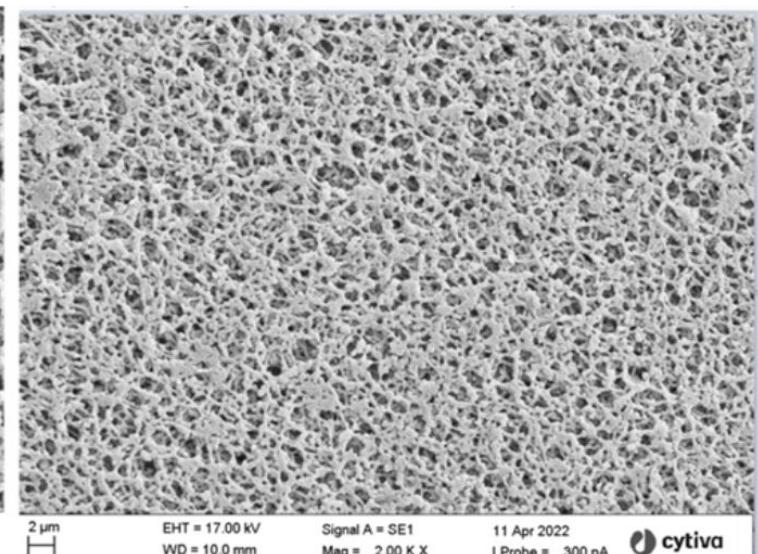
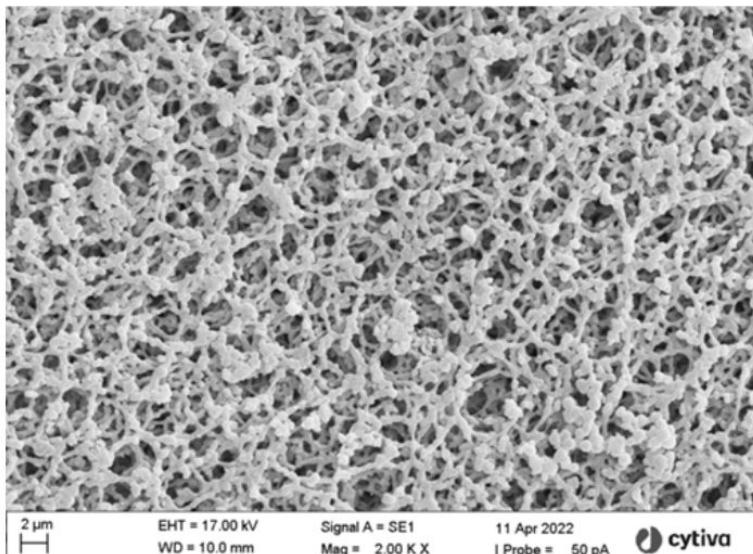
- Recomenda-se PVDF de baixa fluorescência (Low-fluorescence - LF) para blots fluorescentes
 - Também apresenta bom desempenho para detecção quimioluminescente
 - O PVDF de baixa fluorescência é recomendado para aplicações sem manchas
 - Baixa autofluorescência/dispersão de luz para baixo ruído de fundo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

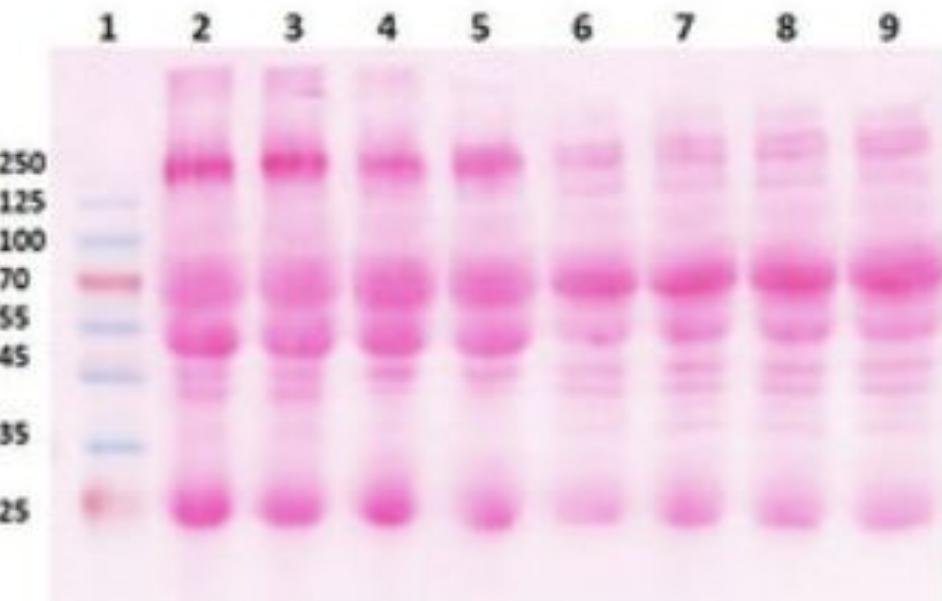
Como conferir a transferência das proteínas para a Membrana?

- **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

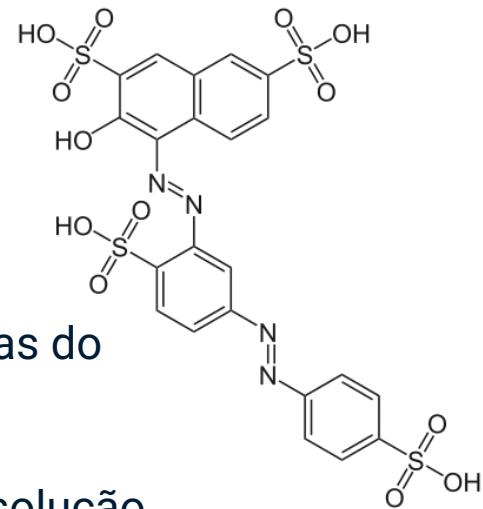
Detecção colorimétrica

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

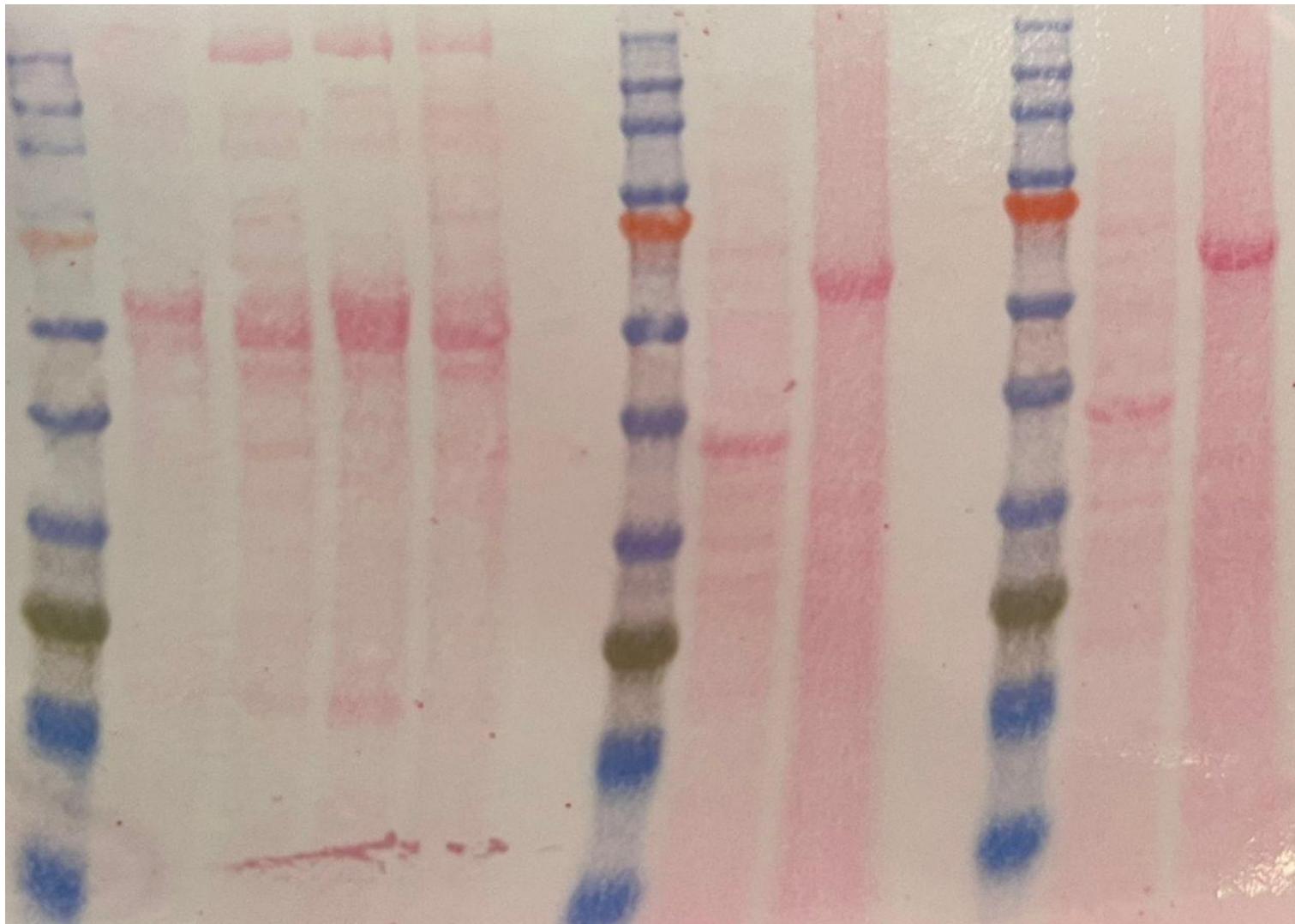


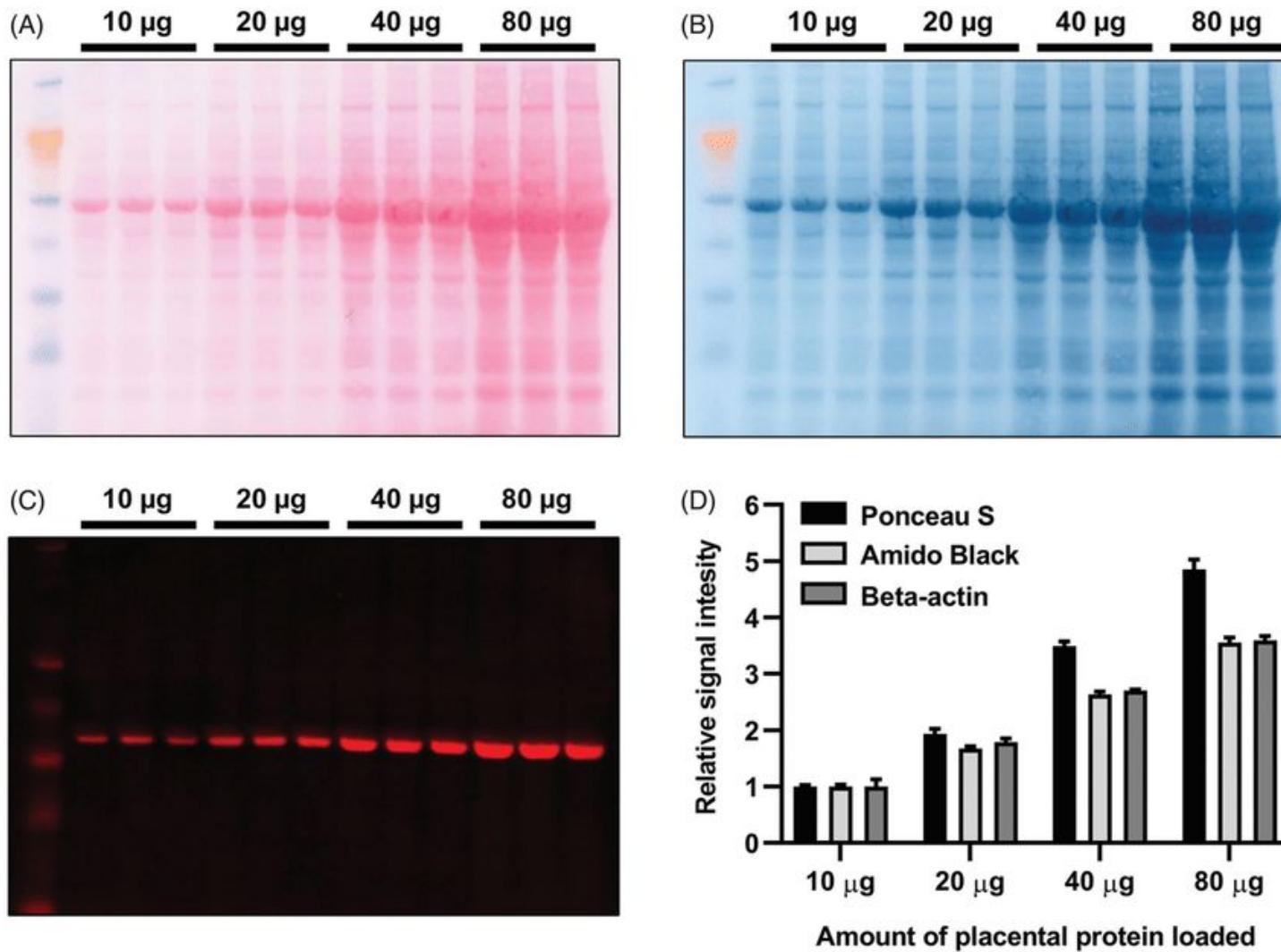
Coloração:

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.

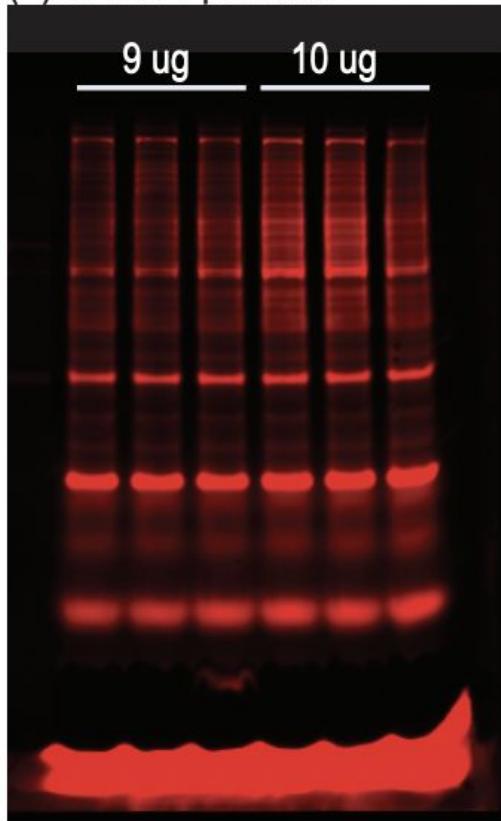
Transferência das proteínas: Fluorescência

Detecção por fluorescência UV

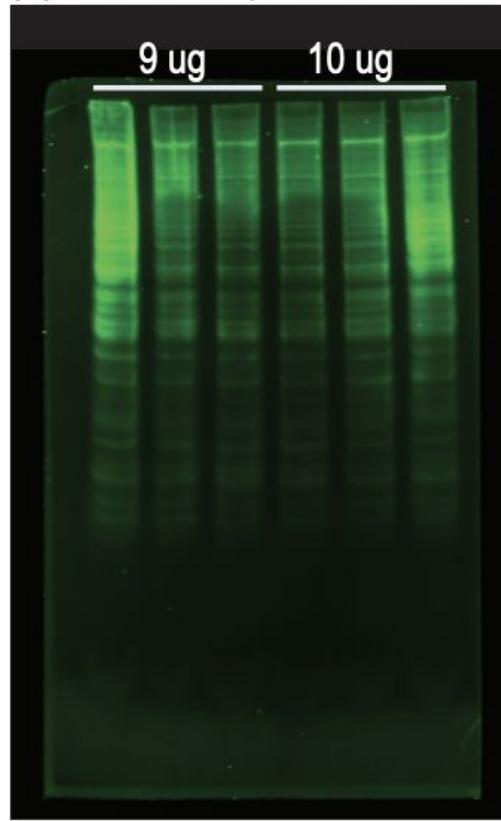
- Sensibilidade: 2-8 ng
- Compatível com proteínas do Ladder
- Não bloqueia epítópos antigênicos
- Baixo ruído de fundo em membranas PVDF e nitrocelulose
- Ideal para normalização de proteínas totais em imunoblot

Transferência das proteínas: Fluorescência

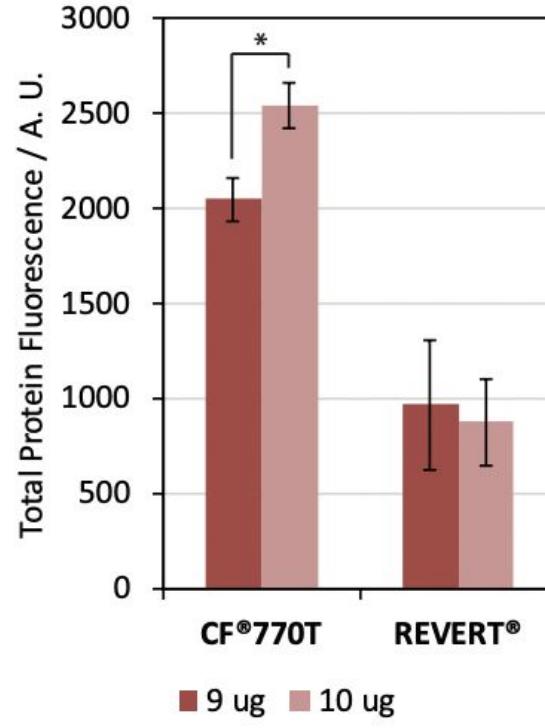
(A) CF®770 prestain



(B) REVERT™ post-stain



(C) Comparison of distinction

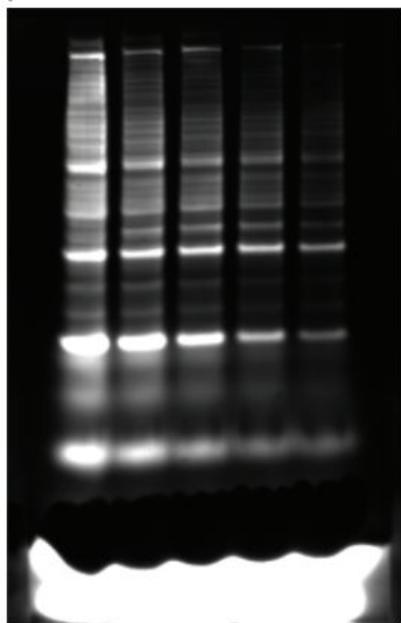


* p<0.05, 1-tailed t-test, n = 3

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 PVDF 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

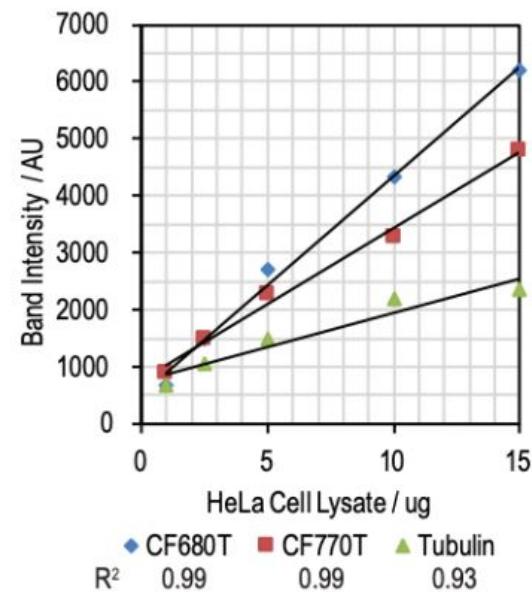
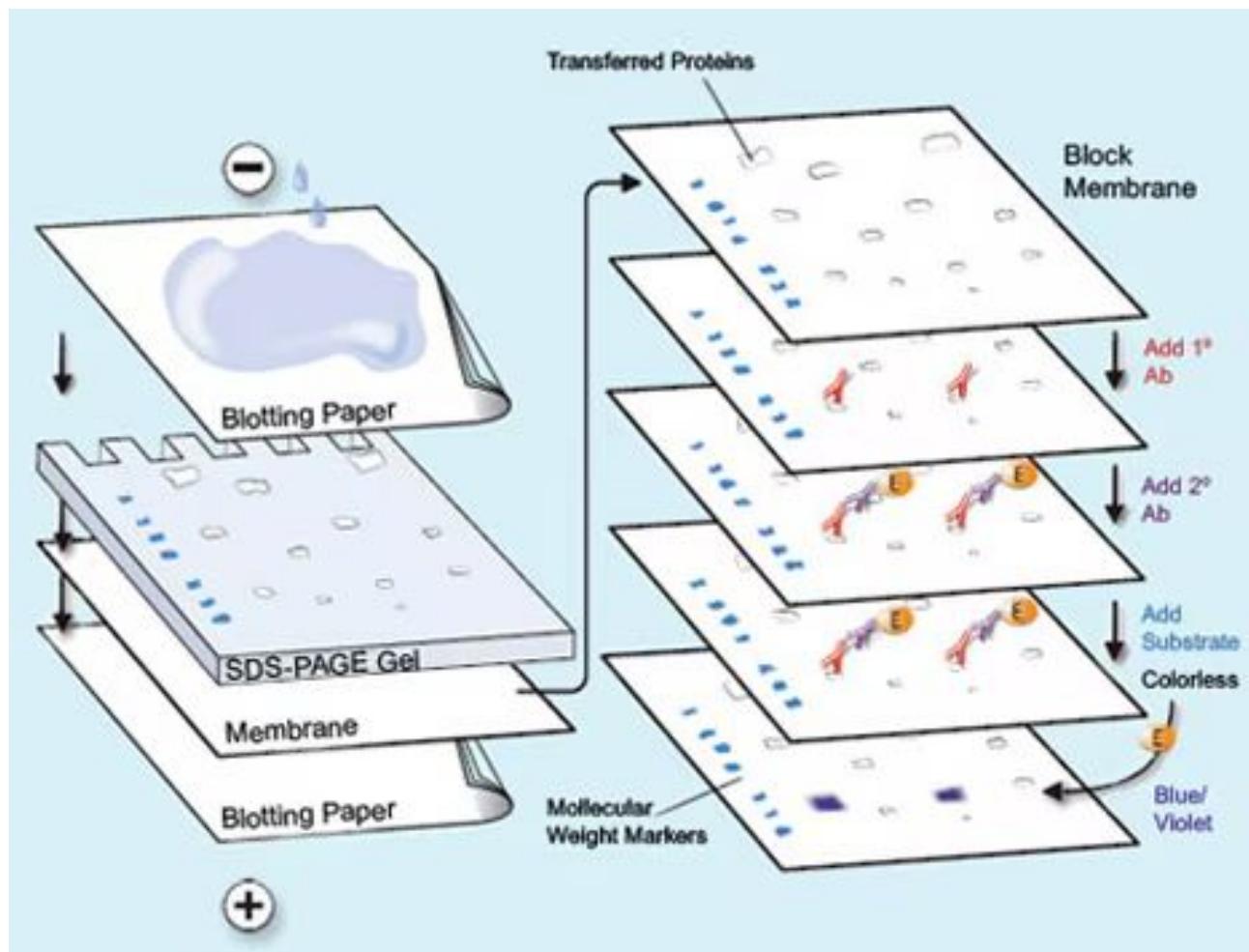


Figure 1. VersaBlot™ Total Protein Normalization Kits for WB normalization. (A) PVDF membrane detection of HeLa cell lysates in serial dilution with VersaBlot™ CF®770T kit. (B) Fluorescence following reversal protocol. (C) Tubulin detection via CF®770 conjugated secondary antibody after reversal. (D) 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

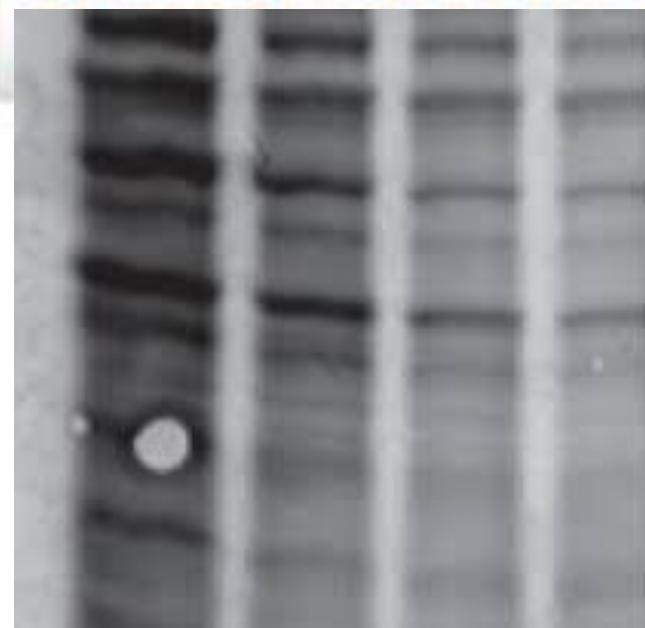
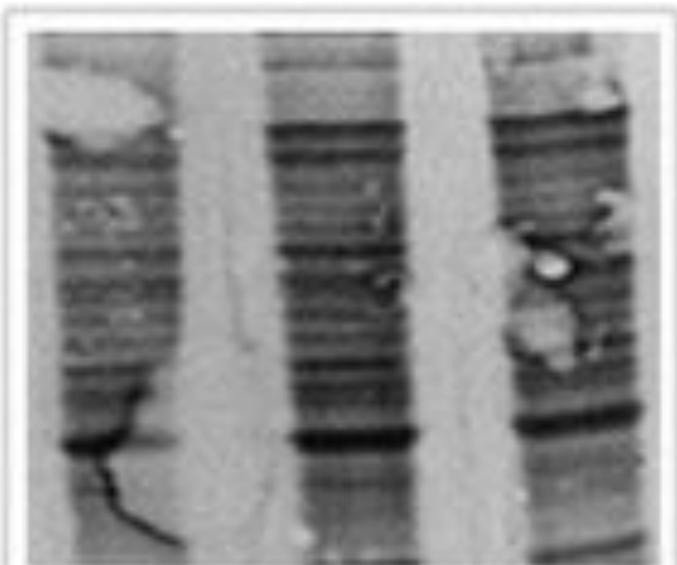
Transferência de proteínas de baixo peso molecular

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.

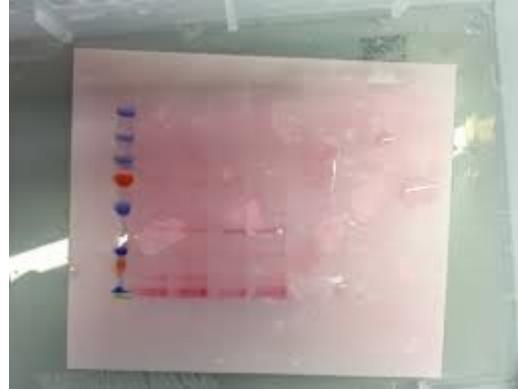


Transferência: Armadilhas comuns - Solução de Problemas

Problema: Ausência de bandas/bandas fracas

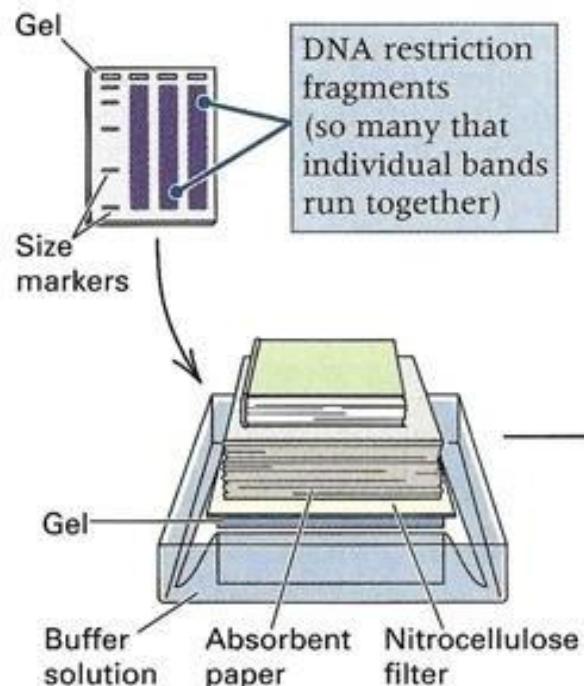
Solução: Transferência excessiva ou insuficiente.

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.

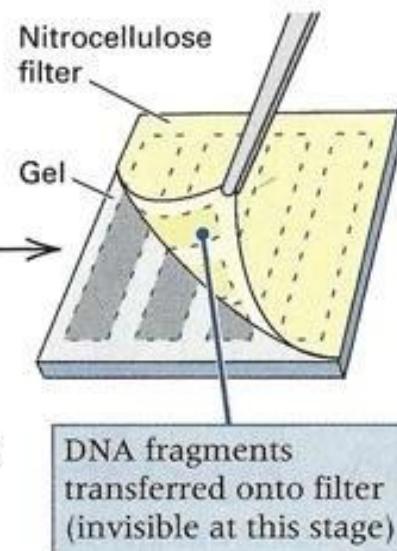


Southern/Northern/Western Blot

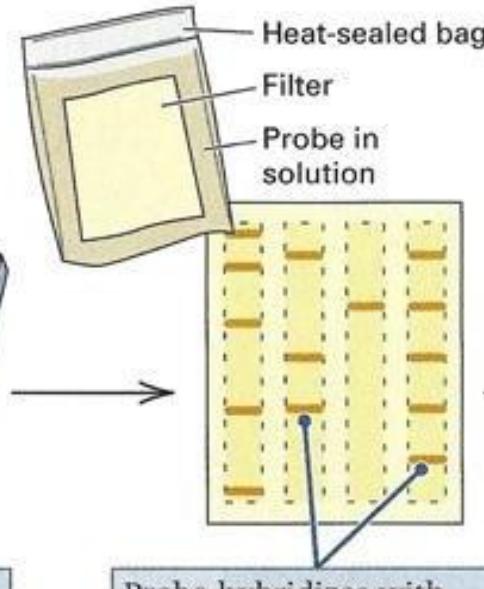
(A) DNA is cleaved; electrophoresis is used to separate DNA



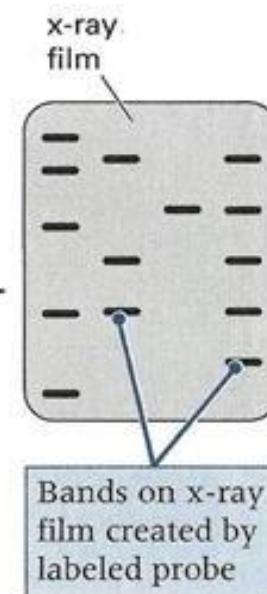
(B) DNA fragments are blotted onto nitrocellulose filter



(C) Filter is exposed to radioactive probe

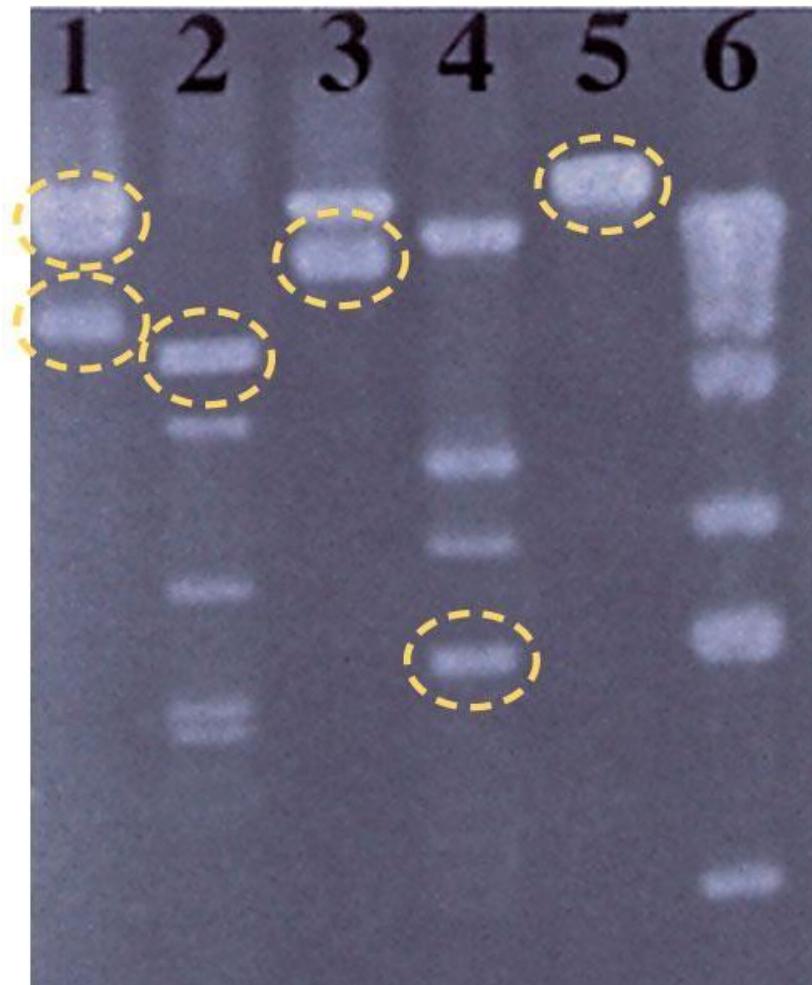


(D) Filter is exposed to photographic film; film is developed

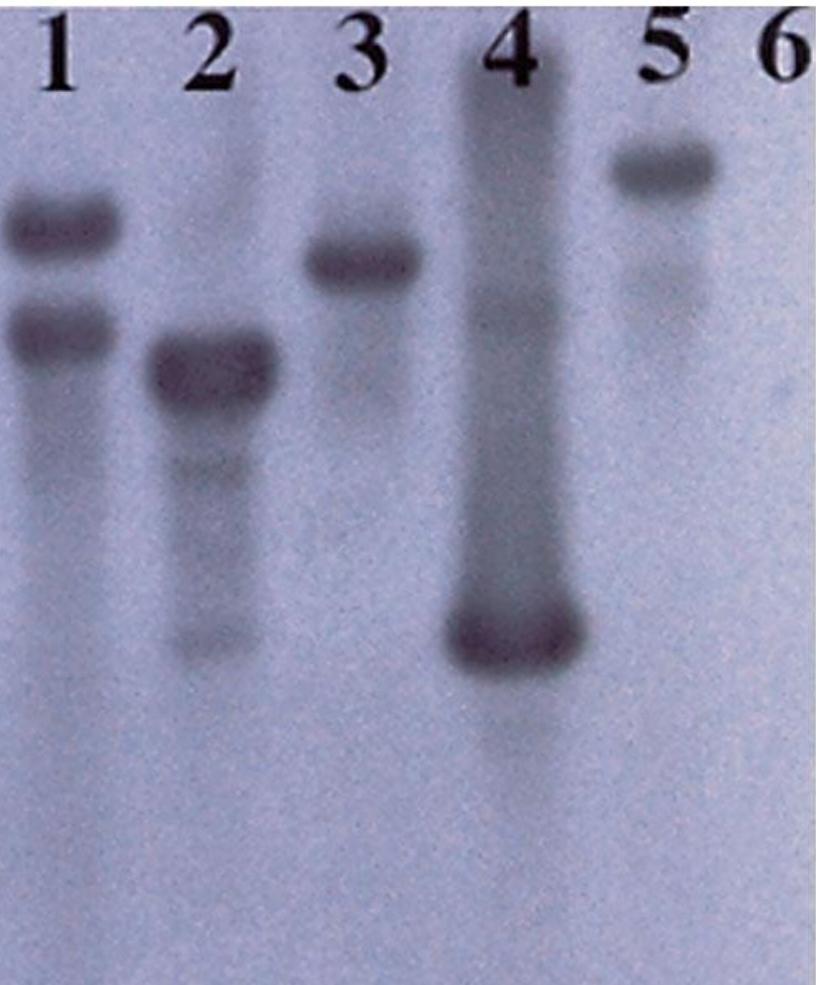


Southern Blot

GEL AGAROSE

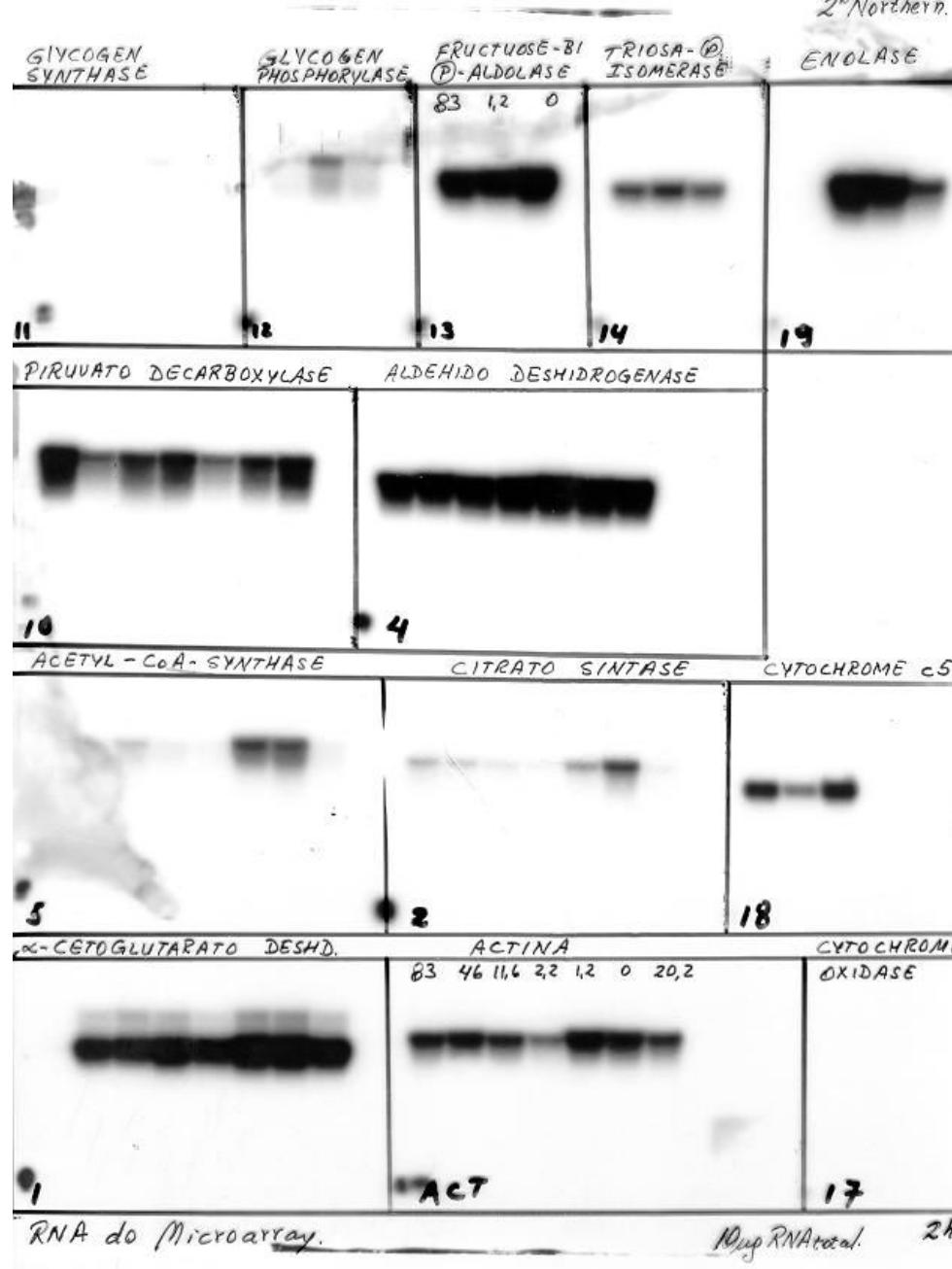


FILME RAIOS-X

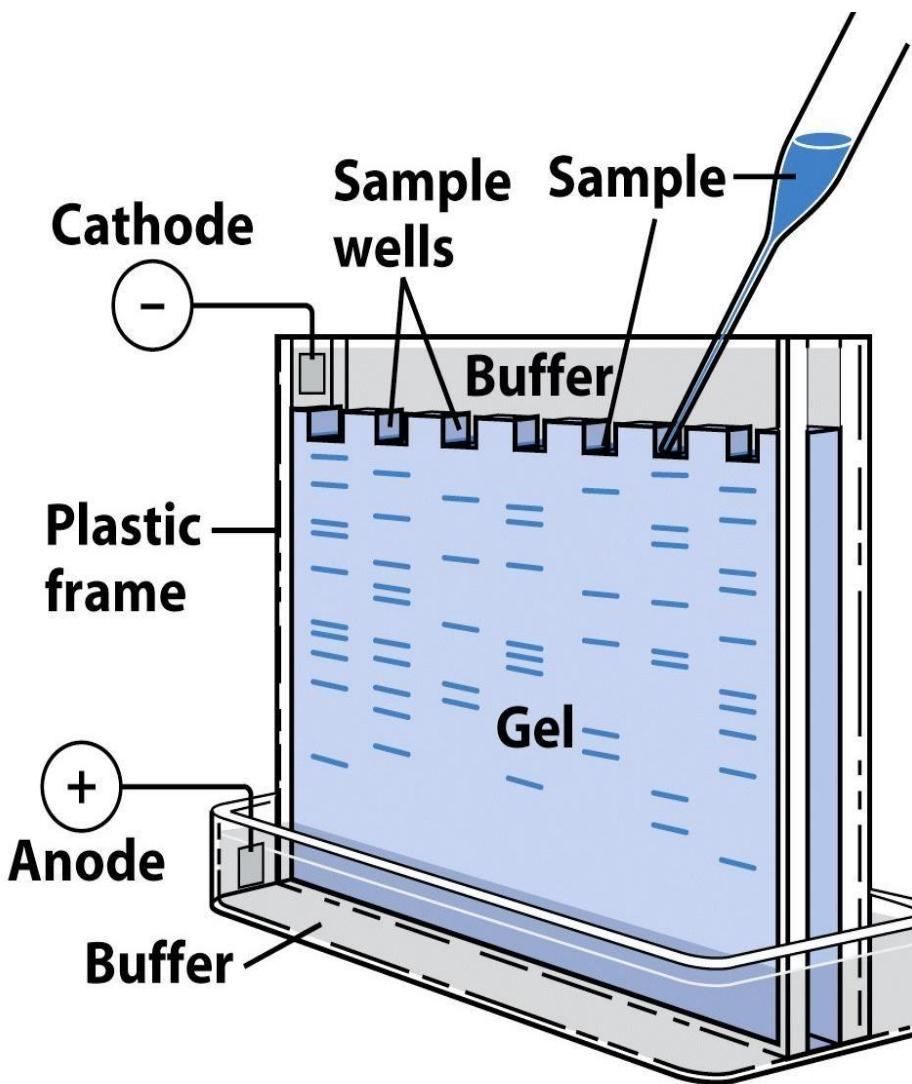


Northern Blot

2^o Northern

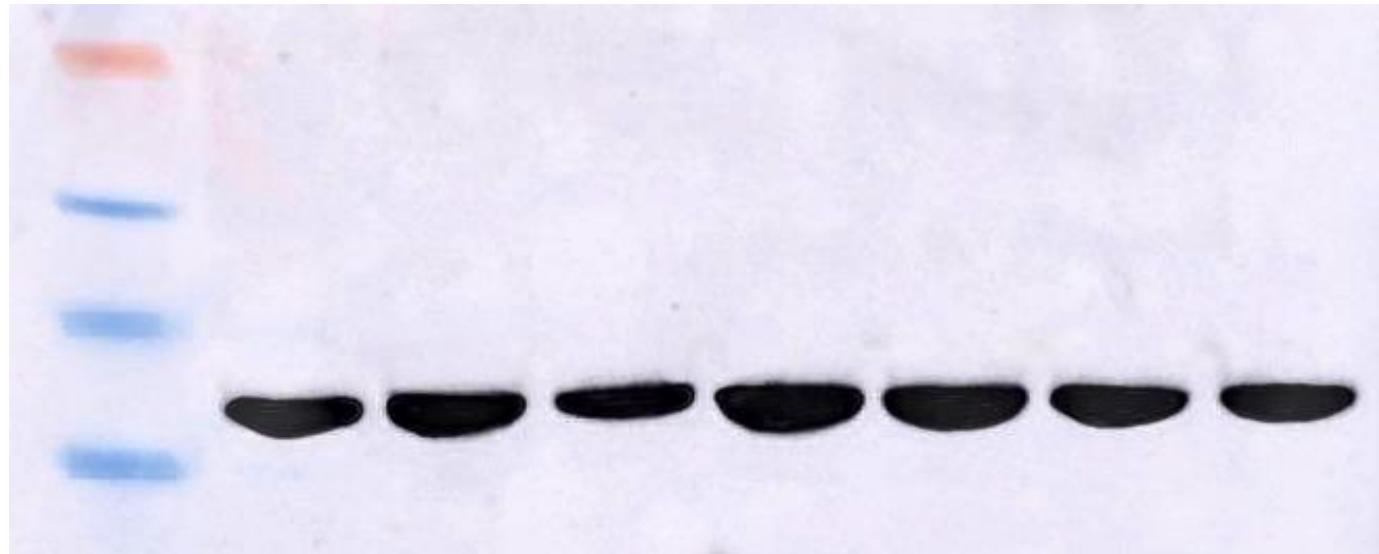
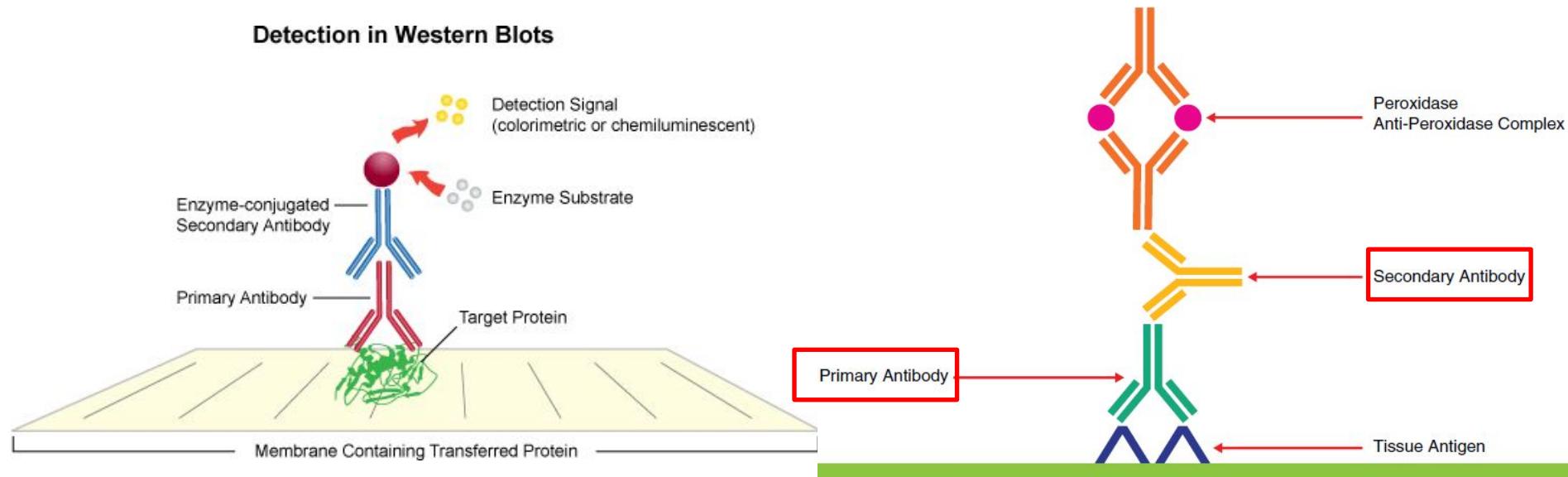


Western Blot

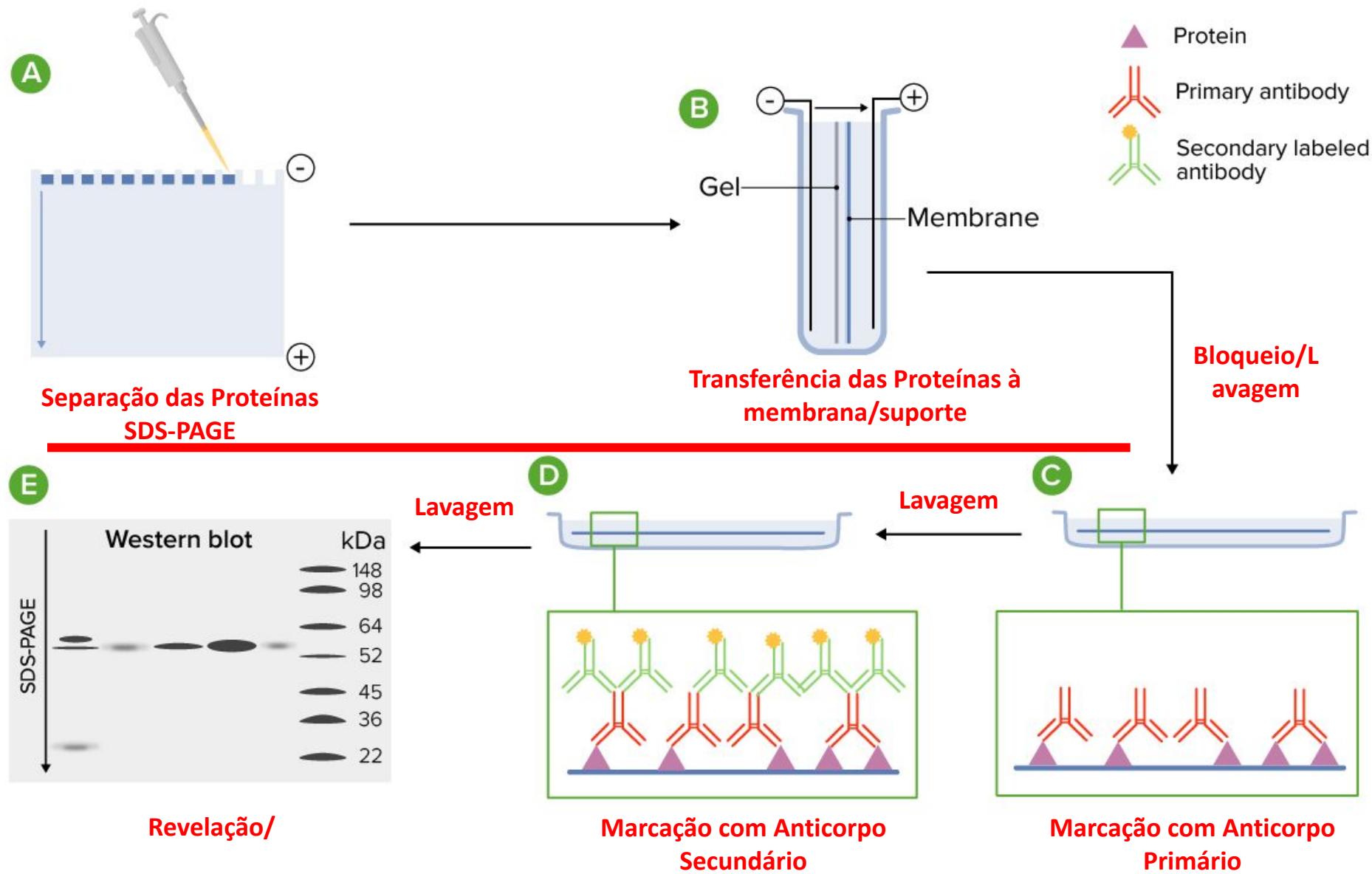


Western Blot

Detection in Western Blots



Western Blot



Western Blot - Vídeos

<https://www.youtube.com/watch?v=q7DT5xGheCE>

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