

QBQ2457- Lab 6 - Indução da expressão

Até agora realizamos todos experimentos para obter clones que possuam o gene de interesse. Na aula passada, verificamos por PCR de colônia a presença do gene nos clones, hoje iremos selecionar um desses clones positivos para a indução da expressão e verificação da produção da proteína.

1. No dia anterior, o monitor pré-inoculou um clone positivo RRP47 em 5mL de meio LB-Kan e deixou crescer por 14-18 horas a 37°C e 200rpm;
2. 2 horas antes da aula, o monitor fez um inoculo a partir do pré-inoculo com 100µL do pré-inoculo em 5mL de meio LB-Kan.
3. No início da aula, medir a DO₆₀₀ da cultura. Caso esteja entre 0,5-1, passe para os passos abaixo. Em caso negativo, continue a incubação por mais tempo (lembrando que culturas de *E. coli* em fase exponencial de crescimento dobram em cerca de 40 minutos).;
4. No tempo 0 (após o inóculo atingir a DO desejada), coletar 1 mL da cultura, centrifugar a 6000rpm por 2 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 50µL de tampão de amostra ao pellet. Suspende as bactérias vigorosamente no vórtex, ferver as amostras por 3 minutos e levar ao gelo;
5. No restante da cultura, adicionar IPTG para concentração final de 0,1 a 1 mM, e incubá-las a 37°C por 3 horas, 200 rpm;
6. Após esse período, retirar 1mL do meio, centrifugar a 6000rpm por 2 minutos, descartar o sobrenadante, e adicionar 100µL de tampão de amostra. Ferver por 3 minutos, juntamente com a amostra t=0. Centrifugue novamente por 2 min a 12000 rpm e mantenha a temperatura ambiente. As amostras devem ser armazenadas a -20°C até a próxima aula quando será realizada a eletroforese de proteínas.

QBQ2457- Lab 7 – Verificação da expressão da proteína recombinante

7. Um gel de poliacrilamida SDS-PAGE estará previamente montado pelas técnicas do LBBM. Nele, aplique 20 μ L das amostras do tempo 0 e 15 μ L das amostras recolhidas na aula anterior, juntamente com o marcador de peso molecular;
8. Correr o gel por 40 minutos, a 180-200V, até o tampão de amostra estar próximo do final do gel.
9. Desmontar o sistema com cuidado, retirando o gel de empilhamento. Colocar o gel na solução de coloração (azul de Coomassie), aquecer brevemente no micro-ondas (30 seg) e colocar na estufa 80°C por 5 minutos.
10. Retirar o corante e lavar bem o gel em água corrente. Acrescentar solução de descoloração, aquecer 30 seg no micro-ondas e colocar novamente na estufa a 80°C, por 10-15 minutos. Se necessário, repetir a operação.

Utilizar luvas para manipulação do gel de poliacrilamida.

Receitas de Reagentes, Soluções e Meios de cultivo

LB (Líquido) para 1 litro

10g de Triptona ou Peptona
10g de NaCl
5g de Extrato de Levedura
Acertar o pH para 7,5
Autoclavar por 20 minutos.

LB (Ágar) para 1 litro

Acrescentar 1,5% de ágar base no meio LB
Autoclavar por 20 minutos
Depois de autoclavada, filtrar a ampicilina 100mg/ml dissolvida em água destilada (acertar o pH com NaOH, tem que ficar transparente) 1,0 ml para 1L de LB.

Tampão Acetato de Sódio 20mM + CaCl₂ 0,1M pH 6,5 (1:1)

Dissolver com H₂O destilada as duas soluções
Acertar o pH para 6,5
Completar o volume desejado
Autoclavar por 20 minutos

Tampão TE (Tris 10mM + EDTA 1mM pH 7,5)

Dissolver com H₂O destilada as duas soluções
Acertar o pH para 7,5
Completar o volume desejado

Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X CONCENTRADO

Tris-Base	242g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8	100 mL
Volume final	1000 mL

Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X para eletroforese em gel de agarose

(40 mM Tris-Acetato pH 8,0; 10 mM EDTA)
20 mL do TAE 50x e completar o volume para 1 Litro com água destilada

Procedimento para SDS-PAGE

O gel para eletroforese é constituído de um polímero de acrilamida. A polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados por persulfato de amônio e estabilizados por TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). A polimerização também depende da presença de um agente bifuncional N,N'-methylenebisacrilamida tornando as cadeias ligadas entre si formando o gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas. O sistema de eletroforese que será utilizado é denominado descontínuo. São utilizados dois tipos de gel, um denominado gel de empilhamento e outro denominado gel de corrida, que são polimerizados um sobre o outro. A função do gel de empilhamento é de concentrar amostras com grande volume, resultando em uma melhor definição e resolução da separação das moléculas no gel de corrida. Serão montados mini-géis de poli(acrilamida de concentração 12% para verificação da expressão da proteína recombinante.

1. Siga as tabelas abaixo para preparar 10 ml do gel de separação e 10 ml do gel de empilhamento.

Os monômeros de acrilamida são neurotóxicos, portanto, evite aspirar ou deixar cair na pele. Caso isto ocorra, lave imediatamente, com bastante água e sabão. O polímero (poliacrilamida) é inócuo/atóxico.

2. Prepare primeiro o gel de separação, aplicando-o à placa de vidro, até a altura indicada, espere até que a acrilamida esteja completamente polimerizada, antes de colocar o gel de empilhamento;
3. Aplique a solução para a formação do gel de empilhamento, e ajuste o pente, que vai permitir a formação dos canais onde serão aplicadas as amostras;
4. Quando o gel de empilhamento estiver polimerizado, o pente pode ser cuidadosamente removido e a placa de vidro montada na cuba de eletroforese;

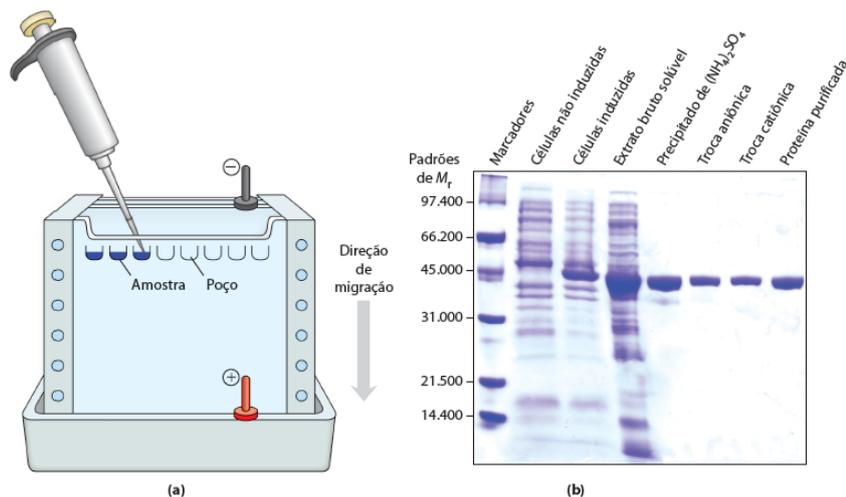


FIGURA 3-18 Eletroforese. (a) Diferentes amostras são colocadas em poços ou depressões no topo do gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas se movem para o gel quando um campo elétrico é aplicado. O gel minimiza as correntes de convecção causadas pelos pequenos gradientes de temperatura, bem como movimentos proteicos além daqueles induzidos pelo campo elétrico. (b) Proteínas podem ser visualizadas após eletroforese tratando o gel com um corante como o azul Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si. Cada banda no gel representa uma proteína diferente (ou subunidade de proteína); proteínas menores se movem através do gel mais rapidamente que as maiores e, portanto, são encontradas mais

próximas da base do gel. Esse gel ilustra a purificação da proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita no Capítulo 25). O gene para a proteína RecA foi clonado (Capítulo 9) para que sua expressão (síntese da proteína) pudesse ser controlada. A primeira canaleta mostra um conjunto de proteínas padrão (de M_r conhecido), servindo como marcadores de massa molecular. As duas canaletas seguintes mostram proteínas de células de *E. coli* antes e depois que a síntese da proteína RecA foi induzida. A quarta canaleta mostra as proteínas presentes após sucessivas etapas de purificação. A proteína purificada é uma cadeia polipeptídica única (M_r , 38.000), como mostrado na canaleta mais à direita.

PREPARO DO MINI-GEL DE SEPARAÇÃO (12%)

Soluções	Volume
H ₂ O destilada	3,35 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
10% SDS	100 µL
Acrilamida / bis-acrilamida	4,0 mL
10% persulfato de amônio	50 µL
TEMED	5 µL
Volume total	10 mL

PREPARO DO MINI-GEL DE EMPILHAMENTO

soluções	Volume
Água destilada	6,1 mL
0,5M Tris-HCl pH 6,8	2,5 mL
10% SDS	100 µl
Acrilamida/bis-acrilamida	1,3 mL
10% persulfato de amônio	50 µL
TEMED	10 µL
Volume total	10 mL

5. Coloque o tampão de corrida (obs: diluir 5x esta solução antes do uso) na parte inferior da mini-cuba de eletroforese e, em seguida, coloque a placa de vidro, contendo o gel, na cuba;
6. Coloque o tampão na parte superior da cuba;
7. Aplicar 5 µL de mistura de proteínas de massa molecular conhecida e previamente corada (marcadores pré-corados de massa molecular);
8. Aplique as amostras (lisados proteicos das culturas induzidas e não induzidas) diluídas em tampão de amostra;
9. Tampar a cuba para conectar os cabos elétricos, aplicar uma tensão de 200V por 45 minutos;
10. Observe a separação das diferentes proteínas do marcador pré-corado;
11. Desligar a fonte quando a linha do corante (azul de bromofenol "linha de frente") atingir 0,5mm antes do fim do gel.
12. Corar o gel com solução de azul de Coomassie e descorar.

Soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)**Acrilamida Bis-acrilamida**

29,2 g de Acrilamida
0,8 g de bis-acrilamida
Para 100 mL de H₂O destilada

Tris-HCl pH 8,8

Pesar 1,5 M de tris HCl
Acertar o pH para 8,8
Dissolver com H₂O destilada

Tris-HCl pH 6,8

Pesar 0,5 M de tris HCl
Acertar o pH para 6,8
Dissolver com H₂O destilada

Persulfato de Amônio 10%

Dissolver com H₂O destilada

TEMED (solução pronta para uso, armazenada em geladeira)

SDS 10%

Dodecil Sulfato de Sódio
Dissolver com H₂O destilada

Tampão de Corrida

15 g de Tris pure
72 g de Glicina
5 g de SDS
Completar o volume para 1 litro
Para uso diluir 5 x

Tampão de Amostra

1,0 mL de solução de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
0,4 mL de β-mercaptoetanol
0,8 mL de glicerol
1,6 mL de SDS 10%
0,2 mL de azul de bromofenol 0,05%
4,0 mL de H₂O destilada

Soluções extração de DNA plasmídial (Miniprep)**Etanol 100 %****Etanol 70 %****Tampão GET**

50mM de Glicose

50mM de Tris-Cl pH 8,5

10mM de EDTA

Mistura Lítica (lise alcalina - plasmídeo)

NaOH 0,2N

SDS 1%

OBS: Esta solução é preparada no dia do experimento.

Tampão TE

10mM de Tris-HCl pH 8

1mM de EDTA

No dia do uso, acrescentar a RNase A (1 µl da solução 10 mg/mL para cada mL de TE)

Solução de Neutralização

60 mL de Acetato de Potássio 5M

11,5 mL de Ácido Acético Glacial

28,5 mL de H₂O Milli-Q**Rnase 10mg/mL**

Dissolver 0,01g de Rnase A

em 1 mL de Tampão Tris 10mM pH 7,5

Guardar em alíquotas a -20°C