

# Eletroforese e SDS-PAGE

QBQ1453

2023

# FUNDAMENTOS DA ELETROFORESE

-Eletroforese está baseada na migração de uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico (*biomoléculas possuem cargas que dependem do pH*).



Velocidade de migração:

$$v = \frac{qE}{f}$$

q= carga líquida

E= Força do campo elétrico  
(Volts/cm)

Mobilidade eletroforética:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

f= coeficiente friccional =  $6\pi\eta r$   
[resistência encontrada pelo íon;  
dependente da viscosidade do  
meio( $\eta$ ) e do tamanho e forma do  
íon, (r) ]

# FUNDAMENTOS DA ELETROFORESE

Portanto, quando uma diferença de potencial é aplicado, moléculas com diferenças na **carga líquida** irão se separar devido **as diferentes mobilidades eletroforéticas**. Mesmo moléculas com **carga similar** vão sofrer separação devido às **diferenças no tamanho**, e portanto diferenças na força friccional experimentada.

Velocidade de migração:

$$v = \frac{qE}{f}$$

q= carga líquida

E= Força do campo elétrico  
(Volts/cm)

Mobilidade eletroforética:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

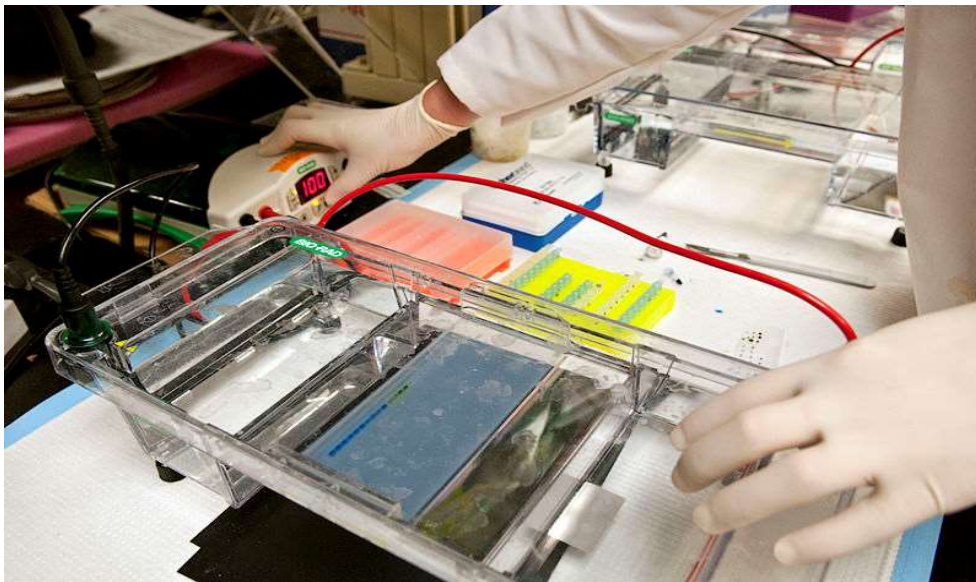
f= coeficiente friccional =  $6\pi\eta r$   
[resistência encontrada pelo íon;  
dependente da viscosidade do  
meio( $\eta$ ) e do tamanho e forma do  
íon, (r) ]

# SUPORTES PARA ELETROFORESE

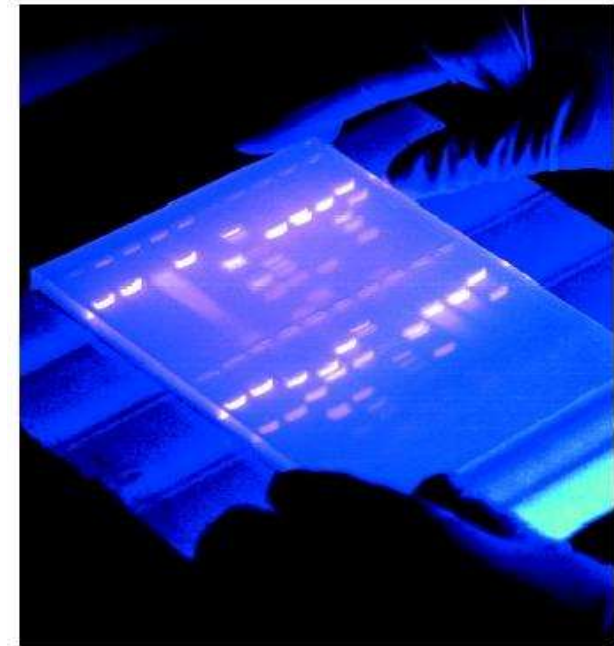
## Gel de Agarose (1-3%)

A agarose é uma mistura de polissacarídeos isolados de algas.

Geis de agarose são muito utilizados para separações de moléculas particularmente grandes como ácidos nucleicos (DNA, RNA)



[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_Agarose\\_gel\\_electrophoresis.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_Agarose_gel_electrophoresis.jpg)

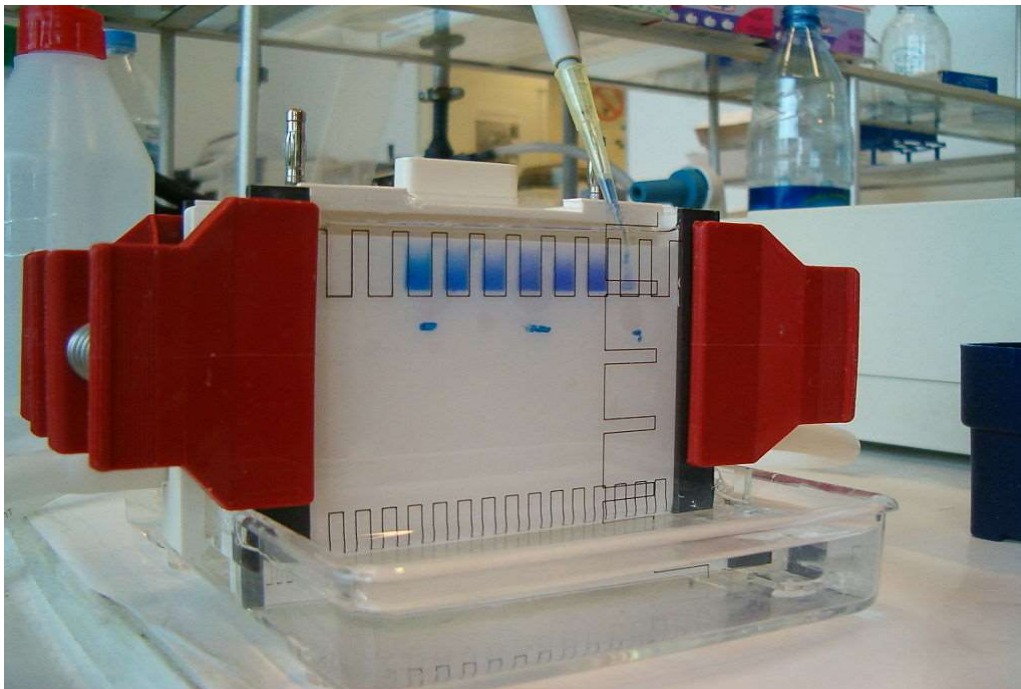


<http://www.biologyreference.com/Dn-Ep/Electrophoresis.html>

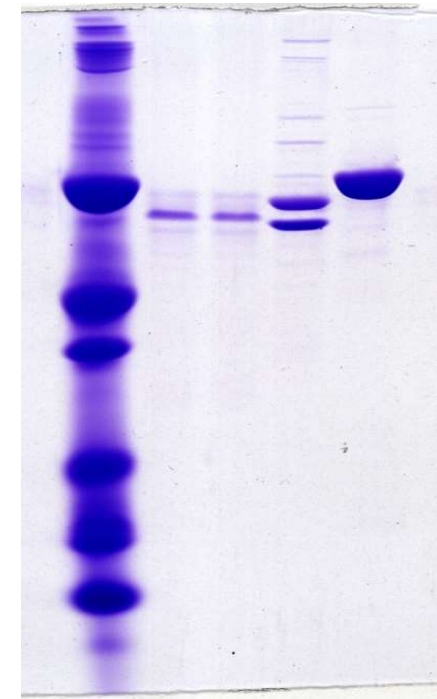
# SUportes PARA ELETROFORESE

Gel de Poliacrilamida  
(3-30%)

O gel de poliacrilamida (PAGE) é preparado pela polimerização de **acrilamida** e **bis-acrilamida**. Muito utilizado para análise de proteínas

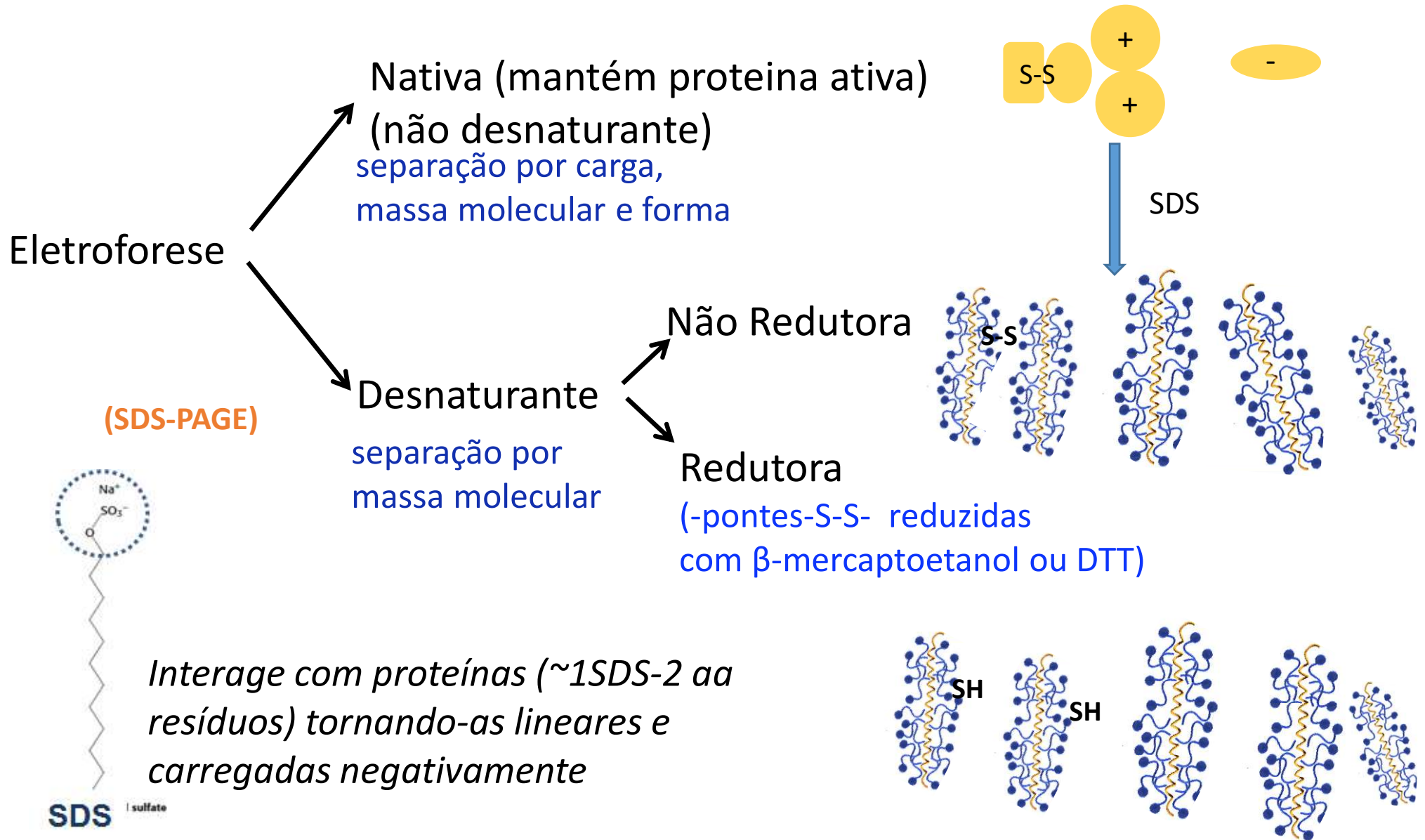


[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/Electrophoresis -  
\\_Filling\\_1D\\_gel\\_wells\\_with\\_proteins\\_mixture.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f1/Electrophoresis_-_Filling_1D_gel_wells_with_proteins_mixture.jpg)



<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/Coomassie3.jpg>

# TIPOS DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS





# SDS-PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

-Separa proteínas por TAMANHO!! Já que o SDS confere carga negativa homogênea a todas as proteínas

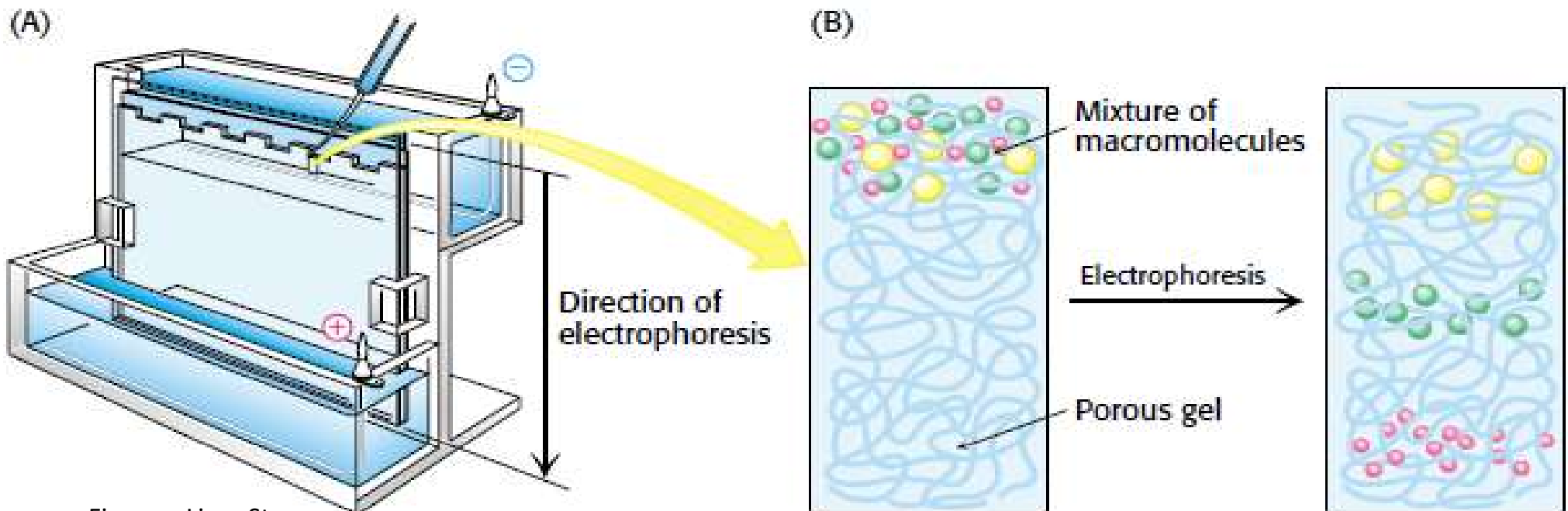


Figura – Livro Stryer

# Preparação das amostras - Final da aula prática 7

## Diálise seguido de secagem a vácuo

Material obtido após Cromatografia troca iônica  
DEAE



Diálise



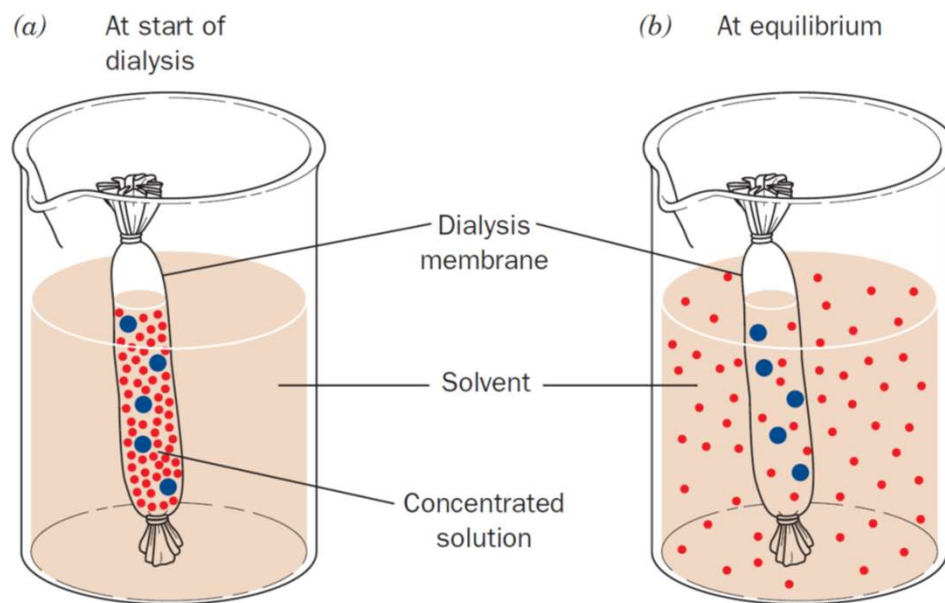
Secagem a vácuo



Material após  
troca iônica



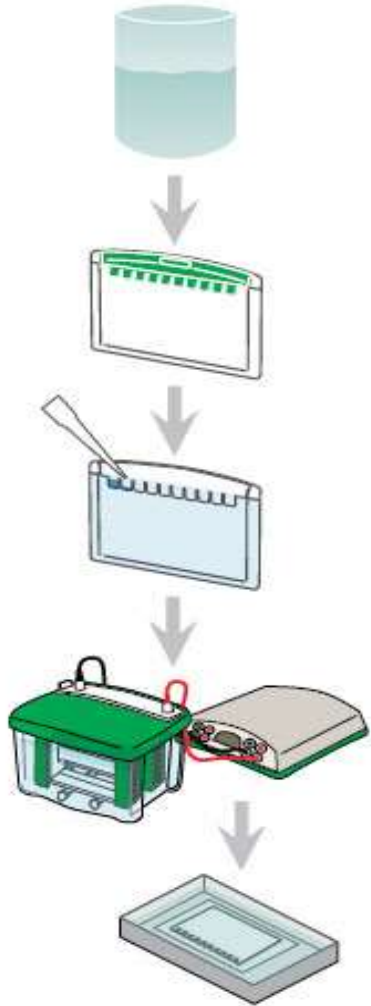
lisado





# SDS-PAGE

<http://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/performing-protein-electrophoresis>



1) Preparo do gel (técnica)

2) Montagem do aparato de eletroforese (técnica)

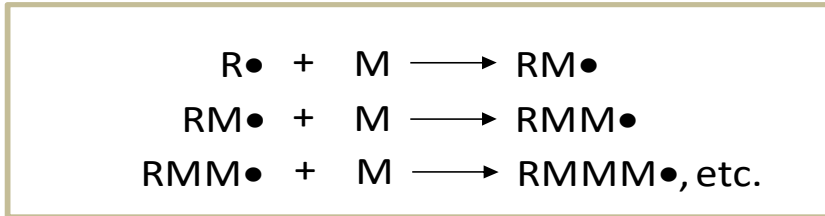
3) Preparação das amostras (vocês)

4) Aplicação das amostras (vocês)

5) Separação das amostras no gel de eletroforese

6) Revelação do gel de eletroforese

# PREPARAÇÃO DO GEL

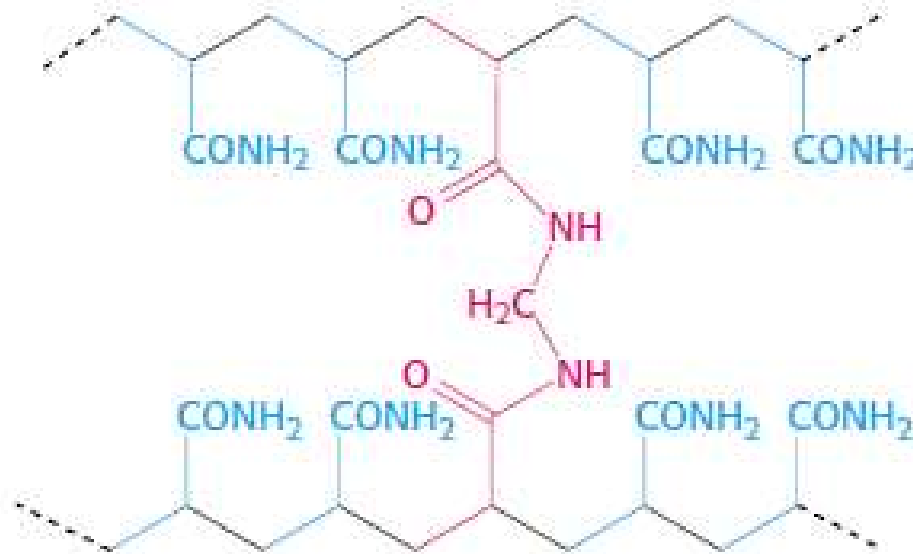


$S_2O_8^{2-}$  (persulfate)

**Catalisador**

$2 SO_4^{\bullet -}$  (sulfate radical, initiates polymerization)

← **TEMED**  
← **OU**  
← **Riboflavina+luz**



“malha” de acrilamida e bis-acrilamida serve como uma “peneira” para separação das proteínas

TEMED: N,N, N',N'-tetramethylenediamine

# SDS-PAGE

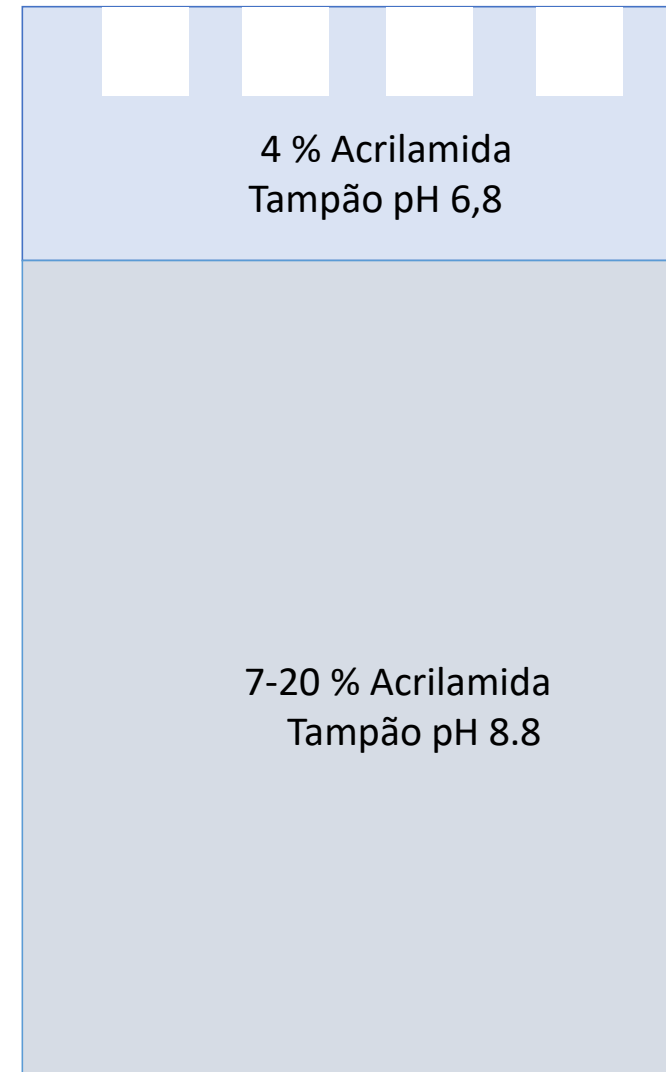
## GEL DE EMPILHAMENTO

<u>Soluções</u>	<u>Volume</u>
Água	3,05 mL
SDS 10%	50 µL
Acrilamida/Bis-Acrilamida (30%)	0,65 mL
Tampão Tris 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio	25 µL

Poros maiores - comprimir as amostras de proteínas em uma frente fina de migração

## GEL DE SEPARAÇÃO

<u>Soluções</u>	<u>Volume</u>
Água	4,02 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida/Bis-Acrilamida (30%)	3,33 mL
Tampão Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amônio	50 µL



(12 % o mais comum)

[http://www.youtube.com/watch?v=EDi\\_n\\_0NiF4](http://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4)

Procedimento:

# SDS-PAGE

- Encaixar o gel no sistema de eletroforese
- Colocar o tampão de corrida na parte superior do gel

tampão de corrida  
Tris – glicina - SDS



<http://bitesizebio.com/3285/sds-page-the-easy-way-to-find-the-wells/>

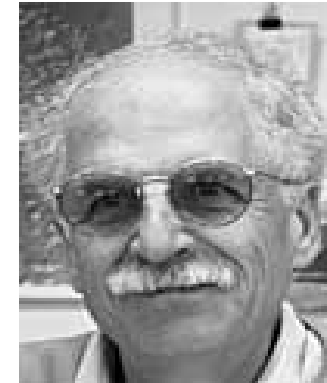
## Procedimento:

# SDS-PAGE

## 2) Preparo das amostras

### TAMPÃO DE AMOSTRA (Laemmli buffer)

Água	3,55 mL
Tampão Tris 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
<b>Glicerol</b>	2,50 mL
<b>SDS 10 %</b>	2,00 mL
<b>Azul de bromofenol 0.5%</b>	0,20 mL
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	0,05 mL

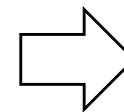
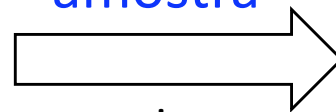


Ulrich Karl LAEMMLI, PhD  
Professeur emeritus  
University of Geneva

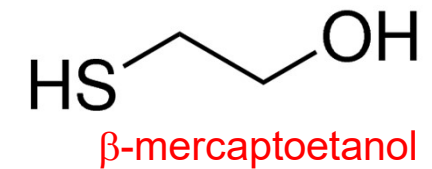
Amostra  
dialisada e  
seca



+ 20  $\mu$ L  
Tampão de  
amostra  
maximum  
~ 50  $\mu$ g protein



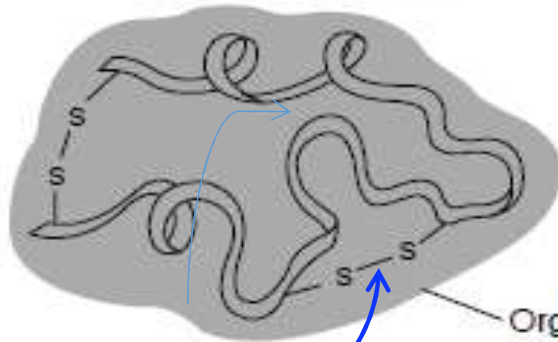
**Ferver/ 5 min**



# SDS-PAGE

Aquecimento e SDS desnaturam a proteína  
Beta-mercaptoetanol reduz as pontes de dissulfeto

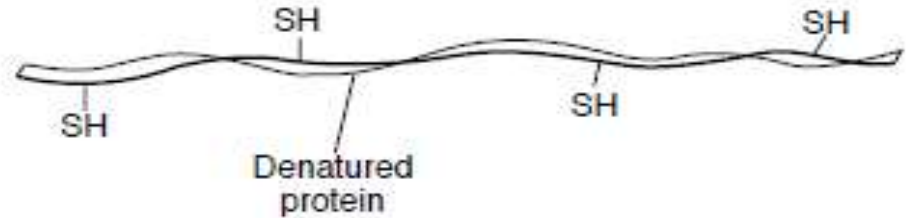
Proteins without Subunits



Organized native protein with 3-dimensional structure

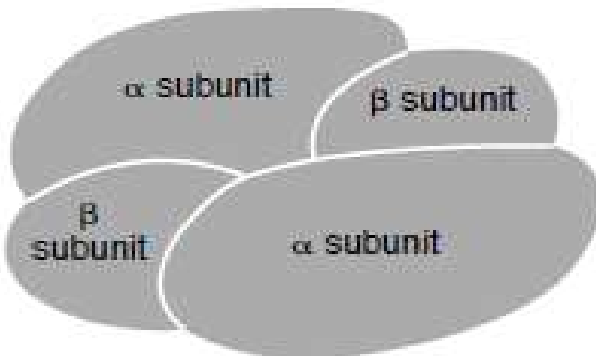
$\beta$ -mercaptoetanol

SDS

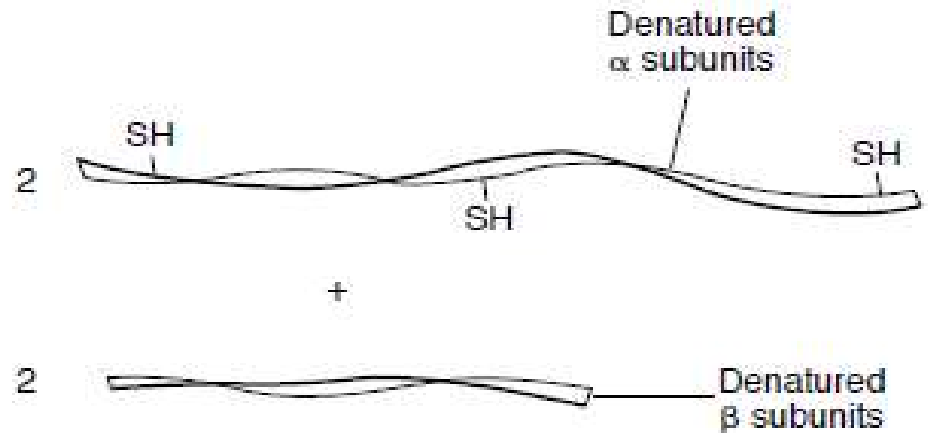


Denatured protein

Proteins with Subunits



SDS



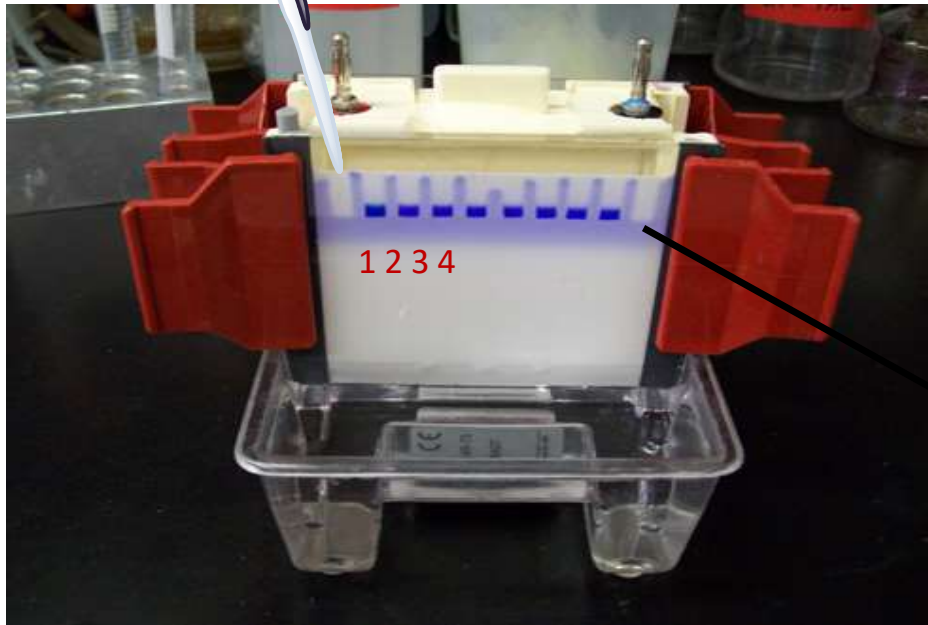
Denatured  $\alpha$  subunits

Denatured  $\beta$  subunits

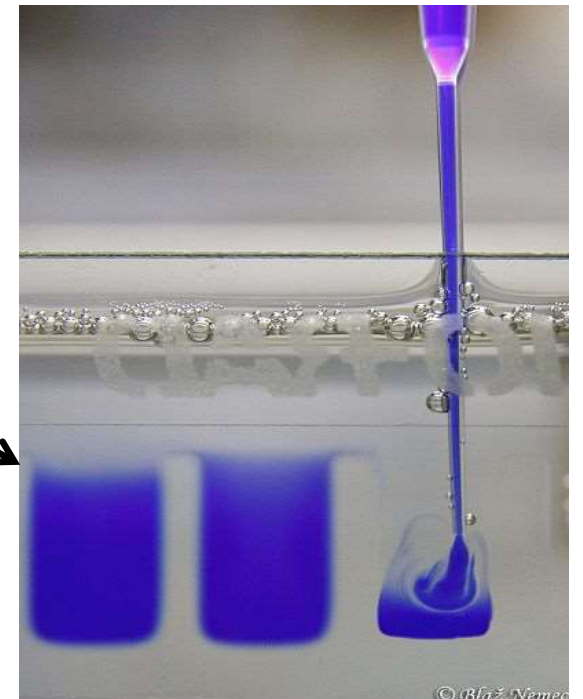
# SDS-PAGE

Aplicar as amostras com cuidado!

- 1: Padrão de peso molecular
- 2: Lisado centrifugado
- 3: Material DEAE



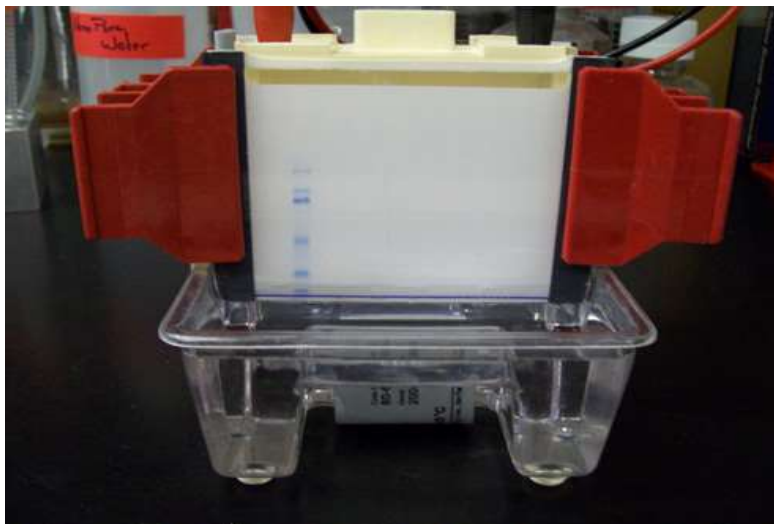
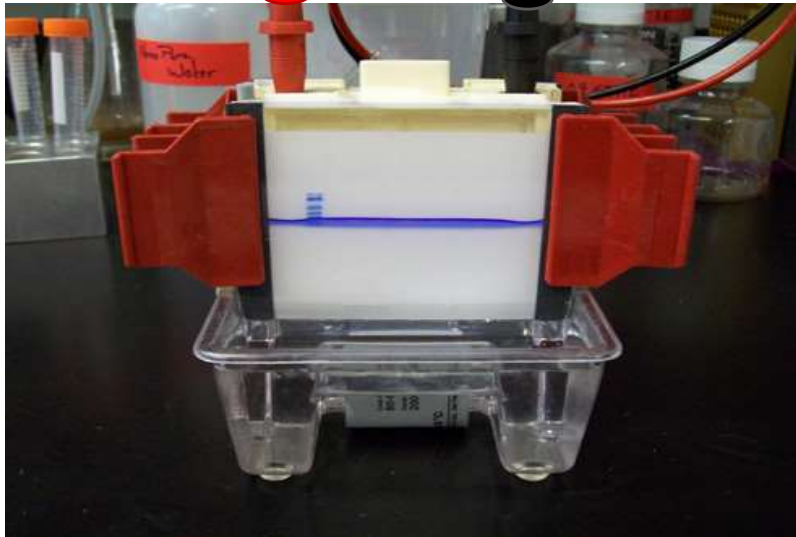
ampliando



<http://bitesizebio.com/3285/sds-page-the-easy-way-to-find-the-wells/>



# SDS-PAGE



$$v = \frac{qE}{f}$$

$$\mu = \frac{q}{f}$$

Ligar a fonte e aguardar a migração da proteína até o final

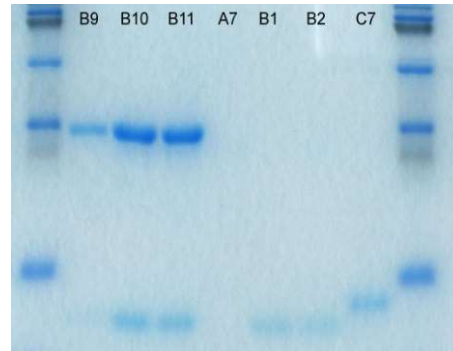


# SDS-PAGE

## -Revelação do gel de eletroforese



Antes de corar



Após corar com azul de Coomassie e descorar p/remover o corante não ligado

-Outros métodos de detecção: prata, anticorpos (immunoblotting)

## -Usos de SDS-PAGE

- Acompanhar a expressão e/ou purificação de proteínas
- Determinar massas moleculares de proteínas

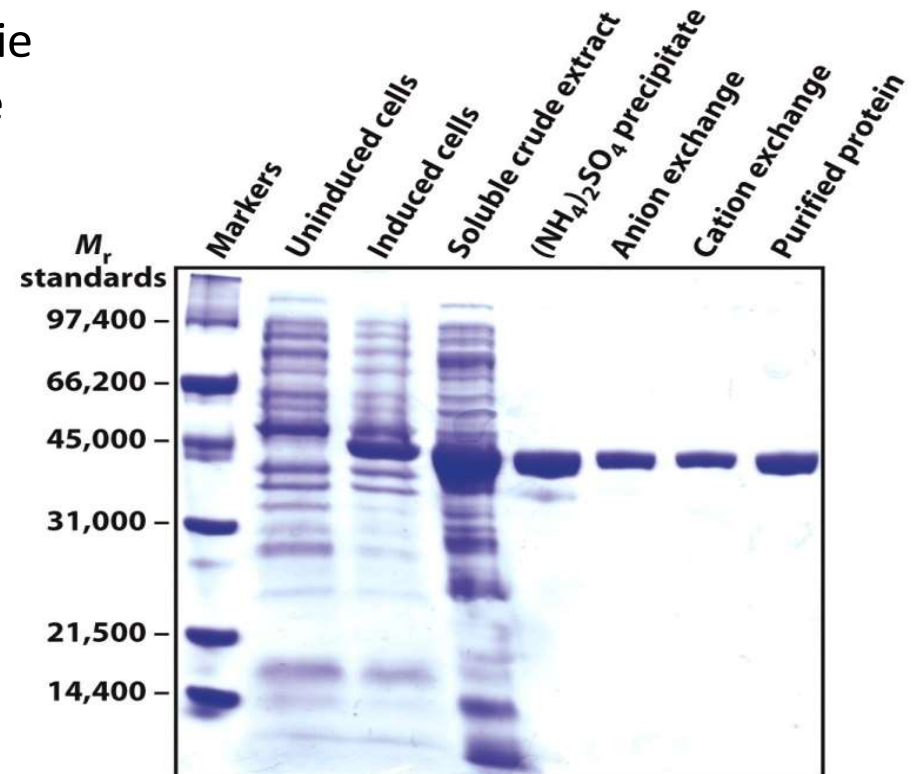
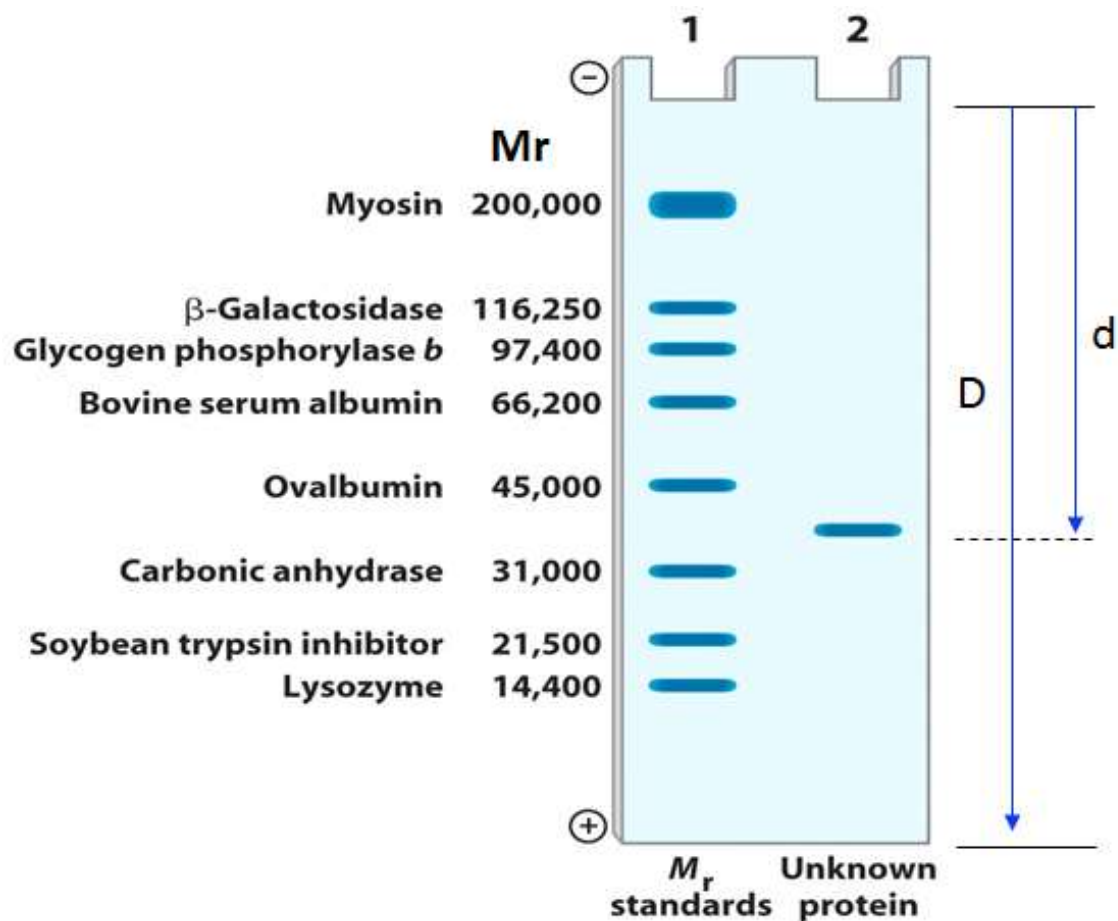
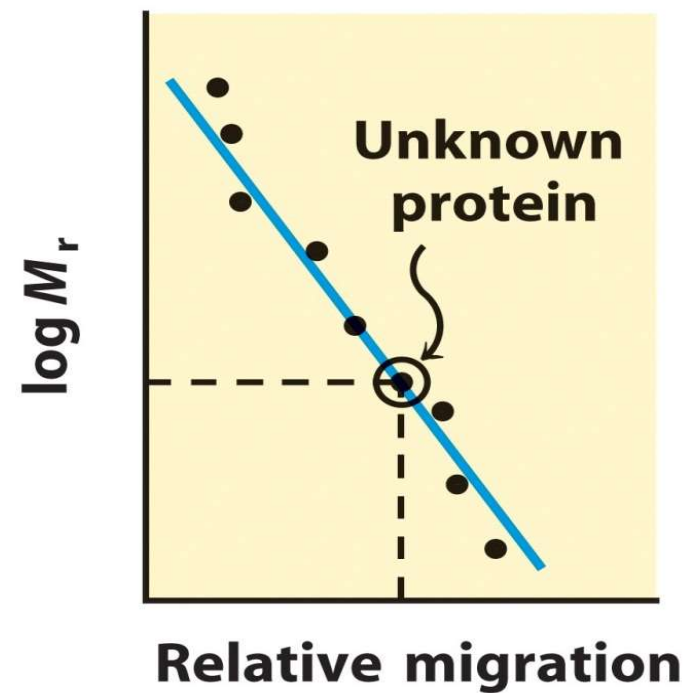


Figure 3-18b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# DETERMINAR MASSA MOLECULAR RELATIVA



$d$  = migração da proteína de interesse  
 $D$  = migração total

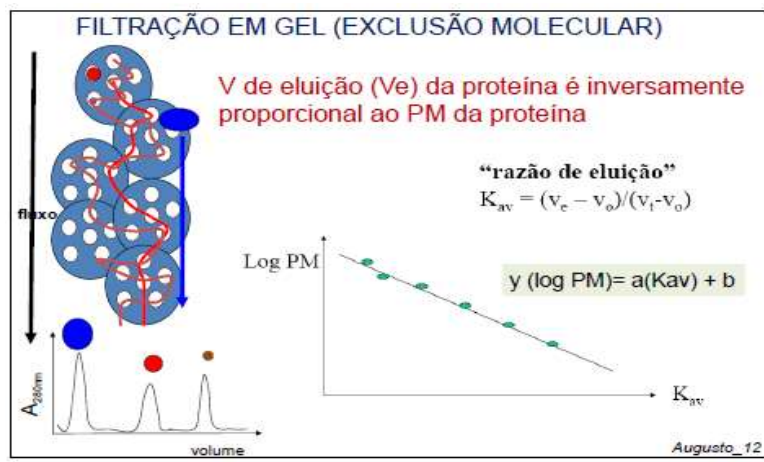


$$R_m = d/D$$

# MASSA MOLECULAR: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

## Cromatografia de Exclusão

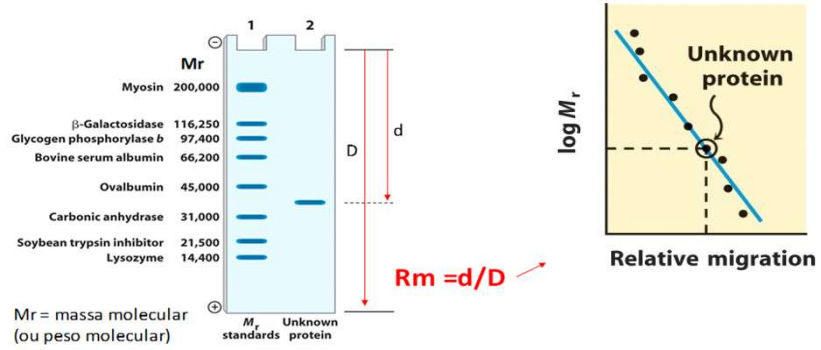
Eluição relativa



Precisão  
± 10 %

## SDS-PAGE

Migração relativa

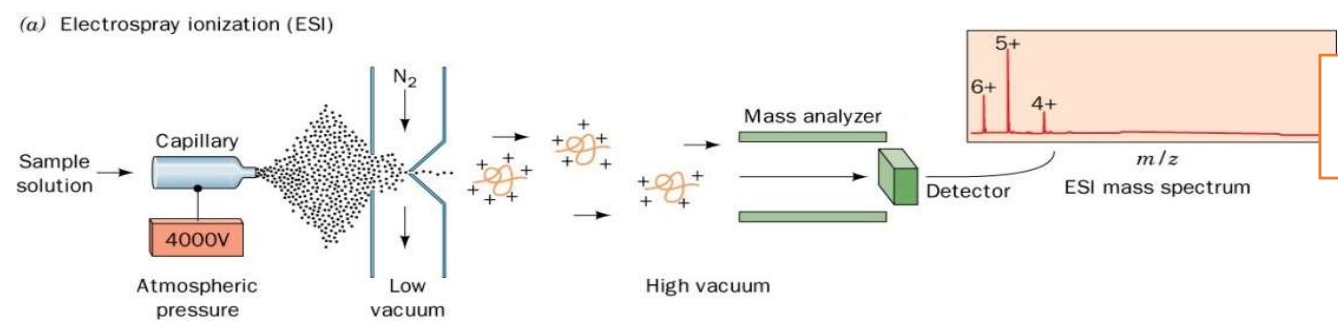


Precisão  
± 10 %

## Espectrometria de Massas

Método bastante sensível

Valores de massa/carga bastante precisos

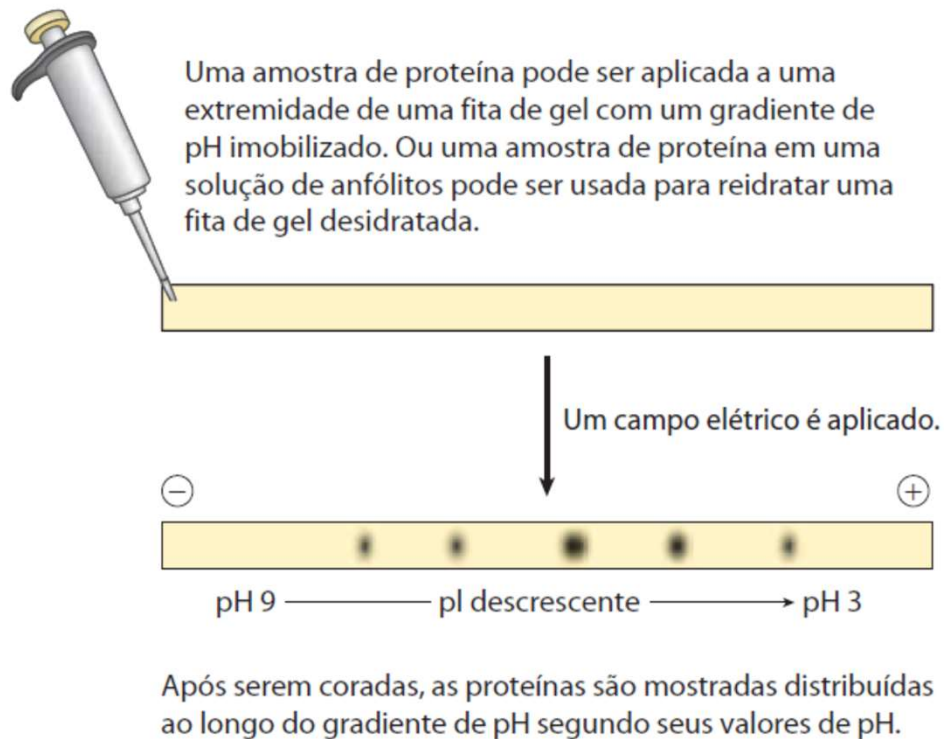


Precisão  
± 0.001 %

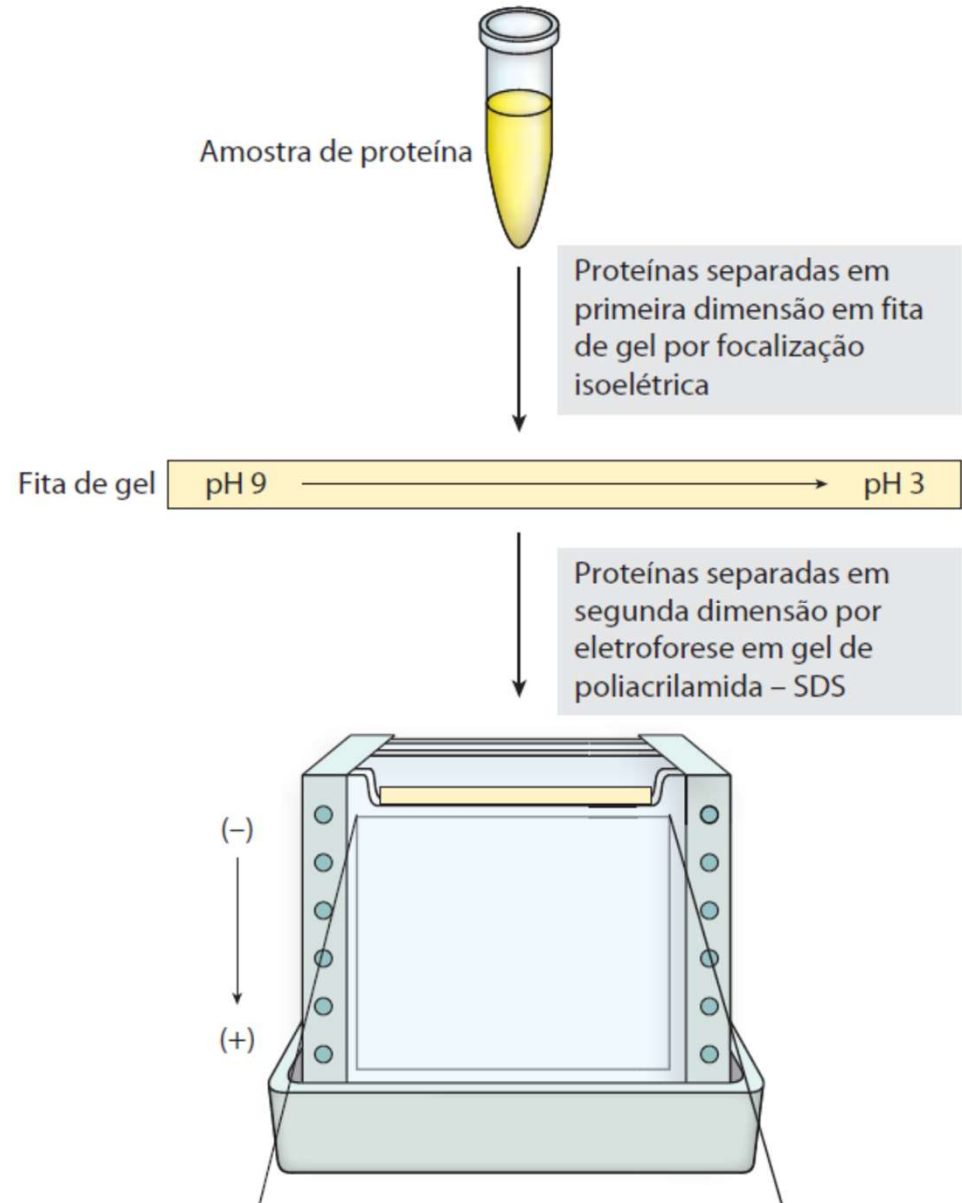
# ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

Primeira dimensão- separação de acordo com o pI

## Focalização isoeétrica



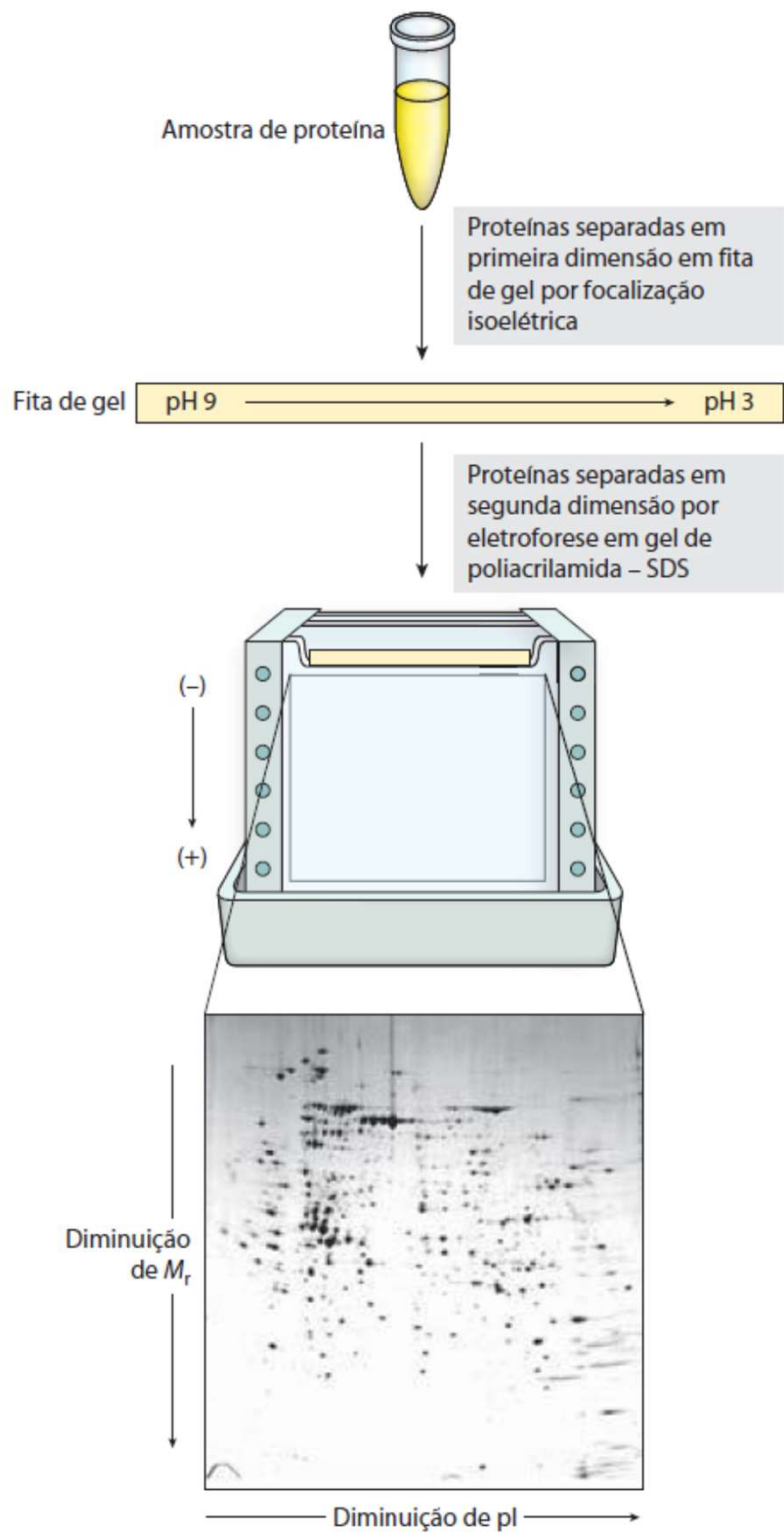
Prepara-se um gel com **gradiente de pH**. – fita contendo **poliacrilamida ligada covalentemente a diferentes anfólitos (mistura de ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular)**.



segunda dimensão – separação por massa molecular



# ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL



# ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

-Eletroforese em gel bidimensional das proteínas de *E. coli*



- Utilizada para comparar níveis de expressão de proteínas
- Proteínas podem ser identificadas por revelação com anticorpos.
- Proteínas podem ser identificadas por espectrometria de massas (proteômica).

-Mais de 2,000 proteínas são visualizadas