



## **QBQ0250 – Bioquímica: Estrutura e Metabolismo de Biomoléculas 2023**

**Ciências Biomédicas**

**Aulas Práticas**

Terças-feiras 8-12h

Sextas-feiras 14-18h

### **Locais:**

Aulas práticas: Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM)

Bloco 7 superior

Sala Multimídia: Bloco 1 superior

### **Professores**

Flávia Carla Meotti ([flaviam@iq.usp.br](mailto:flaviam@iq.usp.br))  
Shaker Chuck Farah ([chsfarah@iq.usp.br](mailto:chsfarah@iq.usp.br))

## QBQ0250 2015 -AULAS PRÁTICAS

### Normas de segurança e procedimentos

**O USO DE AVENTAL NAS AULAS PRÁTICAS É OBRIGATÓRIO.**

**Comer e beber no laboratório não é permitido. Deixe alimentos e garrafas na entrada.**

**Recomenda-se o uso de sapatos fechados e cabelos presos.**

- Os alunos deverão se dividir em grupos de, no máximo 4 integrantes, mantendo-o em todas as aulas práticas.
- Leia cuidadosamente os protocolos experimentais e atente para as instruções dos professores e monitores antes de iniciar o experimento.
- Familiarize-se com o ambiente do laboratório, particularmente, com os reagentes, vidraria e equipamentos disponíveis, procurando utilizá-los com propriedade para evitar erros experimentais, desperdícios de material e acidentes.
- No laboratório existem marcas e modelos diferentes de pipetadores automáticos, mas os princípios são os mesmos. Peça ajuda aos monitores ou professores se estiver com alguma dificuldade, pois o mau uso pode descalibrar ou mesmo avariar os pipetadores, além de trazer problemas para os seus resultados.
- Mantenha sua bancada de trabalho organizada e livre de objetos e uso pessoal. Guarde mochilas e outros objetos na estante disponível na entrada.
- Ao terminar o experimento passe água na vidraria utilizada e a coloque no local indicado.
- Ao usar equipamentos (centífugas, banhos-maria) ou ambientes (estufas e capelas) de uso comum, lembre-se de marcar bem seu material, com o nome do grupo e outras informações importantes.
- Qualquer dúvida ou acidente peça auxílio aos monitores, ao professor ou à técnica do laboratório.
- Registre seus resultados, pois serão indispensáveis para os relatórios. Recomenda-se o uso do caderno de laboratório.
- Conceitos abordados nas aulas práticas serão cobrados nas avaliações.

## AULA PRÁTICA 2

### PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

#### I. OBJETIVO

- Purificar as proteínas Lisozima e CynD (cianeto dihidratase), analisando os resultados por SDS-PAGE.

#### II. FUNDAMENTOS

Como já abordado em aulas passadas, é possível purificar e isolar proteínas utilizando-se princípios físico-químicos, que levam em conta as propriedades e características dessas biomoléculas. Na prática de hoje, vamos separar as proteínas Lisozima e CynD.

Lisozima é uma enzima encontrada em diversas secreções biológicas, como saliva, lágrimas, leite e fluidos nasais. Ela desempenha um papel importante no sistema imunológico como parte do sistema de defesa do corpo contra infecções bacterianas. A principal função da lisozima é hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ 1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico (Mur2Ac) e N-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc) no peptídeo glicano que compõe as paredes celulares de muitas bactérias, levando à lise dessas bactérias. A lisozima mais estudada é aquela isolada a partir da clara do ovo de galinha. Esta é uma pequena proteína de 130 aminoácidos. A sequência da Lisozima é:

```
MKVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCN  
IPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRL
```

CynD, cianeto dihidratase, é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise do cianeto de hidrogênio (HCN), produzindo ácido fórmico e amônia, compostos menos tóxicos. Isso é importante em processos de detoxificação de cianeto em organismos que estão expostos a esse composto, como algumas bactérias que vivem em ambientes ricos em cianeto. A proteína recombinante de CynD de *Bacillus safensis*, com um "His-tag" C-terminal, foi produzida em *E. coli* e purificada. A enzima recombinante é composta de 339 aminoácidos e tem a seguinte sequência:

```
MMTSIYPKFRAAAVQAAPVYLNLEATVEKSCELIDEAASNGAKLVAFPEAFPLGYPWFVAFIGHPEYTRKFYHELYKNAVEIPSL  
AIQKISEAAKRNETYVCISCSEKDGGSYLAQLWFNPNGDLIGKHKMRASVAERLIWGDGSGSMMPVFQTDIGNLGLMC  
WEHQVPLDLMAMNAQNEQVHVASWPGYFDDEISSRYAIATQTFVLMTSSIYTEEMKEMICLTQEQRDYFETFKSGHTCIY  
GPDGEPISDMVPAETEGIAEIDVERVIDYKYIIDPAGHYSNQSLSMNFNQPTPVVKQLYHQKNEVFYEDIQYQHGLEE  
KVLEHHHHHH
```

Usar o site de ExPASy Protein Parameter tools (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) para calcular o peso molecular e estimar o pI das duas enzimas.

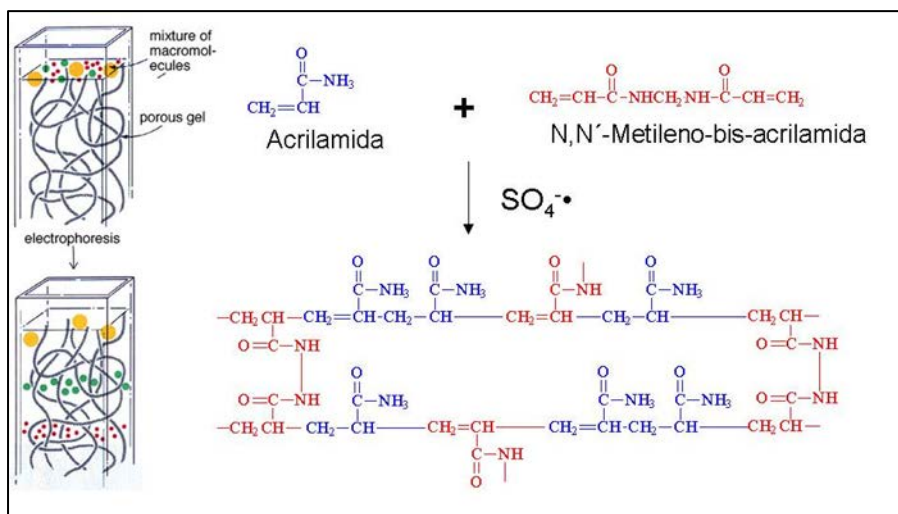
Uma técnica de purificação/separação de proteínas é a cromatografia de troca iônica. Nessa prática, vamos empregar um procedimento simples dessa técnica para separar as duas proteínas de uma mistura. Para isso, iremos utilizar dois tipos de resina, a DEAE celulose e a CM celulose. Dietilaminoetil (DEAE) celulose é uma resina catiônica (trocador de ânions), ou seja, positivamente carregada. Por outro lado, carboximetil (CM) celulose é uma resina aniônica (trocador de cátions), sendo carregada negativamente.

## Eletroforese e Separação de Proteínas Totais (SDS-PAGE)

A eletroforese é um método de separação que se baseia na migração das moléculas em relação a um campo elétrico, devido à sua carga. É amplamente utilizada para a análise de macromoléculas (proteínas, DNA e RNA) numa matriz sólida, como um gel ou papel.

Normalmente se utiliza um gel, devido a supressão das correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura e também porque o gel funciona como uma peneira molecular, permitindo a separação das macromoléculas por peso molecular.

O gel para a eletroforese de proteínas é constituído de um polímero de acrilamida cuja estrutura está demonstrada na Figura 1. Esta polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados por persulfato de amônio e estabilizados por TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamino). A polimerização



também depende da presença de um agente, o N,N'-metileno-bis-acrilamida, que facilita a ligação cruzada entre as cadeias longas de poliacrilamida, formando um gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas.

**Figura 1** – Esquerda: ação de peneiramento de um gel poroso de poliacrilamida. Direita: formação de um gel de poliacrilamida. O tamanho da poro da malha pode ser controlado pelo ajuste da concentração do monômero ativado (acrilamida, em azul) e do interligante (bis-acrilamida, em vermelho).

A separação de proteínas ocorre em condições desnaturantes. A mistura de proteínas é dissolvida em tampão de amostra, que contém dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um detergente aniônico que rompe as ligações não-covalentes existentes na proteína nativa resultando na sua desnaturação. Neste tampão também pode ser acrescentado  $\beta$ -mercaptoetanol, que reduz as pontes de dissulfeto existentes em algumas proteínas.

**Sugerimos que antes da aula prática, você assistir a aula online sobre eletroforese no seguinte link de e-aulas: <https://eaulas.usp.br/portal/video?idItem=18557> e este vídeo: <https://www.youtube.com/watch?v=nsL55BiI3Go>.**

### III. MATERIAL

#### Para a purificação das proteínas:

1. 200 µL de resina DEAE-Celulose em tubo de Eppendorf;
2. 200 µL de resina CM-celulose em tubo de Eppendorf;
3. Tampão de condicionamento/lavagem:
  - 25 mM TrisHCl, pH 8,0
  - 10 mM NaCl
4. Tampão de eluição:
  - 25 mM TrisHCl, pH 8,0
  - 1 M NaCl
5. 300 µL de 1 mg/ml de enzima Lisozima;
6. 300 µL de 1 mg/ml de enzima CynD.
7. Oito tubos de Eppendorf vazios mais

#### Para o SDS-PAGE:

##### Tampão de amostra

10% dodecil sulfato de sódio (SDS)  
10 % glicerol  
0,5 mM EDTA 0,1M  
2,5 % (0,35 M) de 2-mercaptoetanol  
0,05 % Azul de Bromofenol  
62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

##### Solução A

30 % acrilamida  
0.8 % bis-acrilamida

##### Solução B

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

##### Solução C:

1,5 M Tris-HCl pH 6,8

##### SDS 10%

##### Tampão de corrida

3,0 g de Tris-HCl  
14,4 g de glicina  
1 g de SDS  
Ajustar o volume de água destilada para 1000 mL  
(pH final deve ser 8,3)

##### 10% Persulfato de amônio (APS)

##### Tetrametilenodiamina (TEMED)

##### Solução de Coloração:

2,5 % Coomassie Blue R  
50% etanol.  
7% ácido acético

##### Solução de Descoloração:

30% etanol.  
7% ácido acético

**ATENÇÃO:** Use luvas para manipular soluções de acrilamida, pois ela é neurotóxica. Evite inalar o TEMED.

#### IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### Montagem do gel de poliacrilamida – Dia 1

1. Verifique se as placas de vidro estão bem seguras e niveladas no suporte. Coloque o pente entre as placas e faça um risco com a caneta aproximadamente 1 cm abaixo do pente e retire-o.
2. Prepare a solução para o gel de separação (12 % acrilamida, contendo 0,1 % SDS, 1.5 mm de espessura) (ou gel de corrida, ou de separação), pipetando as soluções na ordem abaixo, misturando suavemente após cada adição:
  - 5 mL água bidestilada
  - 6 mL da mistura 30% acrilamida/0,8% bisacrilamida (solução A)
  - 3,75 mL de tampão solução B (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8)
  - 150 µL de SDS 10 %
  - 150 µL APS (10% Persulfato de Amônio)
  - 6 µL TEMED
- 3.3. Imediatamente após a adição de TEMED, misture suavemente, sem formar bolhas, e coloque entre as placas de vidro, até a marca feita com a caneta. **Atenção:** O gel de acrilamida:bisacrilamida (presentes na solução A) começa a polimerizar logo após a adição de TEMED, portanto aja com rapidez!
- 3.4. Coloque cerca de 1 mL de água destilada gentilmente sobre a solução entre as placas, para evitar o contato com o oxigênio do ar. Deixe polimerizar por pelo menos 30-40 minutos.
- 3.5. Verifique se o gel está polimerizado. Você será capaz de visualizar claramente a interface entre o gel e a água. Com cuidado, seque a água que permanece sobre o gel polimerizado com um papel de filtro.

##### ENQUANTO O GEL DE SEPARAÇÃO ESTA SE POLIMERIZANDO, EXECUTAR O PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

- 3.6. Prepare a solução para o gel de empilhamento (“stacking”), pipetando as soluções na ordem abaixo:
  - 2,1 mL água bidestilada
  - 0,5 mL da mistura 30% acrilamida/0,8% bisacrilamida (solução A)
  - 0,38 mL de Solução C (1,5 M Tris-Cl, pH 6,8)
  - 30 µL de SDS 10 %
  - 30 µL APS (10% persulfato de amônio)
  - 3 µL TEMED
- 3.7. Imediatamente após a adição de TEMED, misture suavemente, sem formar bolhas, e coloque entre as placas de vidro, até o topo, sem deixar espaços.
- 3.8. Introduza o pente de maneira inclinada num dos cantos do sanduíche de vidro, nivelando-o com cuidado para evitar a formação de bolhas. Limpe com um papel higiênico a solução que vai transbordar para fora do vidro.
- 3.9. Mantenha o gel polimerizando até o final da aula. Cubra o pente com um papel higiênico molhado em água destilada e com um filme plástico, para evitar a desidratação. Toma cuidado para não empurrar o pente mais fundo. O gel será guardado em geladeira até a próxima aula (**Dia 2 abaixo**).

## Purificação das proteínas – Dia 1

### 1. Prepare os tubos que receberão as amostras

Marque 7 tubos (tipo Eppendorf), conforme a tabela abaixo. Coloque 20 µL de tampão de amostra em cada um, para usar nos passos indicados.

Marca no tubo	Descrição da amostra	Observações
Lis+CynD	Mistura de Lisozima e CynD	
SN-DEAE	Sobrenadante da DEAE	
LV-DEAE	Última Lavagem da DEAE	
EL-DEAE	Eluição da DEAE (com solução de alta força iônica)	
SN-CM	Sobrenadante da CM	
LV-CM	Última Lavagem da CM	
EL-CM	Eluição da CM (com solução de alta força iônica)	

**Atenção:** a partir do próximo passo, a resina deve sempre se manter no fundo do tubo. Ao retirar o sobrenadante, pipete devagar e com cuidado, para a resina não subir na ponteira. Caso isso aconteça, centrifugue novamente por 1 min.

### 2. Condicionamento das resinas

2.1. Para condicionar as resinas que já estão nos tubos Eppendorfs, adicione em cada uma delas 200 µL de tampão de condicionamento/lavagem, e em seguida agite por alguns segundos no vórtex e centrifugue a 10.000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, com muito cuidado, para não perturbar a resina, retire o sobrenadante e descarte-o. **Repita essa etapa mais uma vez.**

### 3. Mistura das enzimas com as resinas

- 3.1. Em um microtubo a parte (identificado), misturar 300 µL de 1 mg/ml de Lisozima com 300 µL de 1 mg/ml CynD;
- 3.2. Após misturar ambas enzimas, adicionar 200 µL da mistura em cada tubo contendo as resinas (DEAE e CM);
- 3.3. Agite mistura de enzimas com as resinas por alguns segundos no vórtex. Depois inverter os tubos múltiplos vezes por um minuto.
- 3.4. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos. Este procedimento vai separar a fase sólida (resina) da maior parte da fase líquida.
- 3.5. Após centrifugação, com muito cuidado para não perturbar a resina no fundo dos tubos, colete 20 µL do sobrenadante de cada tubo e transfira para o tubo correspondente de **sobrenadante (SN-DEAE ou SN-CM)** contendo tampão de amostra. Descarte o restante do sobrenadante, tomando cuidado para não descartar a resina.
- 3.6. Do restante da mistura de enzimas (que não passou pela resina), transferir 20 µL ao tubo **Mistura de Lisozima e CynD (Lis+CynD)** contendo tampão de amostra.

#### 4. Lavagens das resinas

- 4.1. Adicione 200 µL do tampão de condicionamento/lavagem às resinas. Em seguida, agite os tubos por alguns segundos no vortex, inverter manualmente por um minuto e centrifugue a 10.000 rpm por 2 minutos. Descarte o sobrenadante.
- 4.2. Repita o item 4.1.
- 4.3. Repita o item 4.1, porém ao final da centrifugação colete 20 µL do sobrenadante de cada resina correspondente e transfira para os tubos correspondentes de **lavados (LV-DEAE ou LV-CM)**, contendo tampão de amostra. Descarte o restante do sobrenadante.

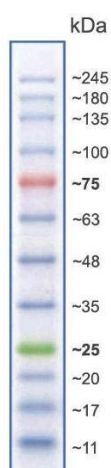
#### 5. Eluição das proteínas

- 5.1. Adicione 200 µL do tampão de eluição às resinas. Em seguida, agite os tubos por alguns segundos no vórtex. Iverter os tubos manualmente por 1 minuto e centrifugue a 10.000 rpm por 2 minutos. Colete 20 µL do sobrenadante de cada resina correspondente e transfira para os tubos correspondentes de **Eluição (EL-DEAE e EL-CM)** contendo tampão de amostra. Descarte o restante do sobrenadante.
- 5.2. Incube todas as amostras por 5 min a 85°C. Guarde-as num saquinho tipo ZipLock. Etiquete o saco com o nome do grupo e entregue aos monitores ou professores. As amostras serão armazenadas a -20°C até a próxima aula. Continue com a montagem do gel de empilhamento.



## Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) - Dia 2

- 6.1. Desembrulhe o sistema e marque com uma caneta o final de cada dente do pente. Remova o pente com cuidado, mantendo-o na posição horizontal para que os dentes do gel não entortem.
- 6.2. Monte o aparato para eletroforese conforme instruções e adicione na cuba o tampão de corrida até cobrir os poços.
- 6.3. Incube as amostras de proteína preparadas na aula anterior a 85°C por 5 min. Centrifugue por 2 min a 12.000 rpm.
- 6.4. Aplique no gel 20 µL de cada amostra, de acordo com a ordem (escolha os poços melhores):
  - MW = Marcador de peso molecular (fornecido pela professora/monitores; não é necessário aquecer)
  - Lis+CynD
  - SN-DEAE
  - LV-DEAE
  - EL-DEAE
  - SN-CM
  - LV-CM
  - EL-CM
- 6.5. Nos poços sem amostra, aplique 20 uL de tampão de amostra.
- 6.6. Conecte a cuba na fonte de eletroforese, aplique a tensão de 150 V e aguarde até que o azul de bromofenol do tampão de amostra se aproxime da base do gel (cerca de 1h).
- 6.7. Interrompa a eletroforese, retire o gel do sanduíche de vidro com cuidado (use luvas!) e mergulhe-o na solução de coloração (use a capela), incubando na estufa a 85°C por 5-10 minutos. O gel ficará completamente azul.
- 6.8. Descarte a solução de coloração no recipiente indicado, na capela. Lave cuidadosamente com água para retirar o excesso de solução.
- 6.9. Coloque sobre o gel a solução de descoloração e incube novamente a 85°C, por 15 minutos, agitando cada 5 min. O “fundo” do gel deve descorar e as bandas devem aparecer azuis. Se necessário, incube mais tempo ou troque a solução de descoloração.
- 6.10. Tire uma foto do seu gel para o relatório. Não é necessário escrever Introdução, Material e Métodos e Resultados no relatório, apenas siga o roteiro abaixo.



Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE de Tris-glicina

## **V. ROTEIRO PARA O RELATÓRIO E QUESTÕES COMPLEMENTARES**

1. Baseado nas sequências do CynD e da lisozima da clara do ovo da galinha, calcular os seus pesos moleculares e seus pIs estimados?
2. a) Monte uma figura com a foto do gel do seu grupo. Indique claramente as canaletas (nomeando ou numerando elas) e faça uma legenda explicando o que é cada amostra. Na Figura, indicar os pesos moleculares dos marcadores na primeira canaleta. Também indicar com uma seta a posição esperada para a migração da CynD e Lisozima.  
  
b) O grupo obteve sucesso na separação da CynD e do Lisozima usando DEAE-celulose? Usando CM-celulose? Em cada caso, explicar suas conclusões baseado na evidência contida na sua Figura do gel. Se teve um resultado inesperado, explicar o que pode ter acontecido de errado e quais as modificações que poderiam ser feitas para melhorar o resultado.
3. a) Qual o princípio da técnica usada para a purificação das duas proteínas? Explique porque foi usado um tampão com pH 8.0. Também explique porque foi usado tampões com diferentes concentrações de NaCl em cada etapa de purificação. b) Desenhar a estrutura de DEAE-celulose e da CM-celulose. c) Faça um desenho da interação, se tiver, da CynD ou Lisozima com as resinas.
4. Olhe a sequência no C-terminal da CynD. Essa sequência pode ser utilizada para separar CynD da lisozima empregando uma outra técnica de cromatografia? Explique como será feito este experimento? Como será feita a eluição da CynD?
5. Compare os pesos moleculares da CynD e lisozima. Essas diferenças podem ser utilizadas para separar CynD e da lisozima empregando uma outra técnica de cromatografia? Explique como será feito este experimento? O que será a ordem de eluição das proteínas neste experimento?
6. a) O que é eletroforese?  
  
b) Qual a função do gel de empilhamento?  
  
c) E do gel de separação (ou de resolução)?  
  
d) Observe os diferentes pHs das soluções B e C utilizadas para fazer os géis de resolução e de empilhamento, respectivamente. Por que o gel de empilhamento e o gel de resolução possuem pHs diferentes?  
  
e) Porque há SDS no gel?
7. Se você não tivesse a informação da sequência, seria possível estimar o peso molecular das proteínas purificadas com a estratégia utilizada na aula prática? Como?