

QBQ0221 2024 - AULA PRÁTICA 1

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 (3-5 integrantes/grupo), 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, 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 (centrífugas, 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(a) professor(a) 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 1:

ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

I. OBJETIVO

Analisar uma amostra de proteínas por SDS-PAGE.

II. FUNDAMENTOS

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 à supressão das correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura e 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 das cadeias entre si, formando um gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas.

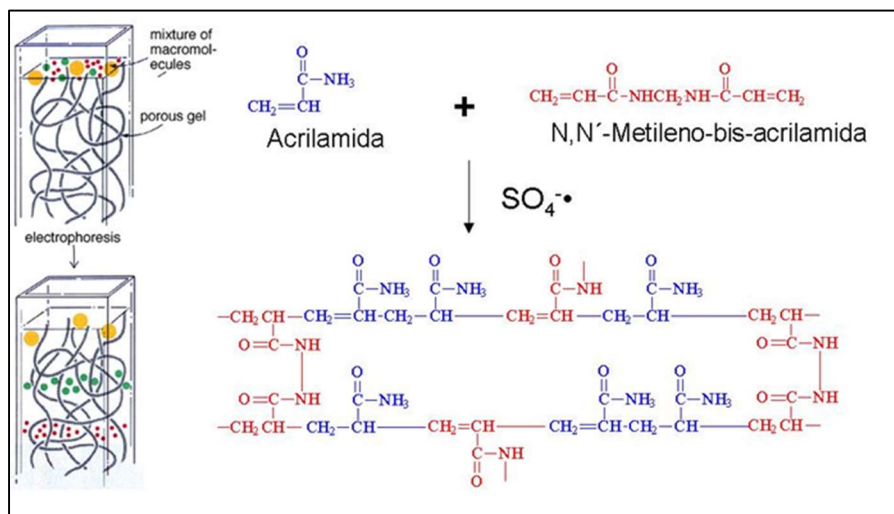


Figura 1 – Esquerda: ação de peneiramento de um gel poroso de acrilamida. Direita: formação de um gel de poliacrilamida. O tamanho do poro pode ser controlado pelo ajuste da concentração do monômero ativado (acrilamida, em azul) e do interligante (bis-acrilamida, em vermelho).

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 β -mercaptoetanol, que reduz as pontes de dissulfeto existentes nas proteínas.

III. MATERIAL

Para a cultura de bactérias:

E. coli

Meio LB

- 10 g/L de Triptona
- 5 g/L de Extrato de levedura
- 10 g/L de NaCl
- 1mM IPTG

Solução de lise

Tampão de lise (pH=8,0)

10 mM Tris-HCl

4% (m/v) SDS

150 mg de pérolas de vidro

Ajustar pH para 8,0

Para o SDS-PAGE:

Tampão de amostra (*Laemmli buffer*)

2 % dodecil sulfato de sódio

10 % glicerol

5 % beta-mercaptoetanol (adicionar somente no dia de uso)

0,01 % Azul de Bromofenol (1,0 mL),

50 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

24,7 mM Tris-HCl

14,4 g de glicina

0.1 % de SDS

Ajustar o volume de água destilada para 1000 mL

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

1. Obtenção das bactérias (este procedimento foi feito anteriormente à aula)

1.1. Inocular 500 mL de meio LB com a *E. coli* e incubar a 37 °C com agitação até densidade ótica 0,8 a 600nm (DO₆₀₀). Separa 10mL para amostra não induzida. Adiciona IPTG para 1mM final para indução da proteína recombinante e incuba a 37 °C por mais 4 horas.

1.2. Imediatamente após o crescimento, centrifugar os 10 mL da cultura induzida e não induzida de bactérias, ressuspender as células coletadas em 1 mL de meio de cultura e transferi-las para um tubo de micro centrífuga de 2 mL. Centrifugar de novo, remover sobrenadante e congelar as bactérias em freezer - 80°C até o uso.

2. Obtenção das bactérias (comece aqui)

2.1. Adicione ao **tubo 1** (amostra não induzida) contendo precipitado de bactérias 400 µL de **solução de lise** e 150 mg de pérolas. Agite com o auxílio do vórtice de tubos 5 vezes por 30 s cada. No intervalo de agitação, deixe a amostra 3 0s no gelo.

2.2. Adicione ao **tubo 2** (amostra induzida) contendo precipitado de bactérias 400 µL de **solução de lise** e 150 mg de pérolas de vidro. Agite com o auxílio do vórtice de tubos 5 vezes por 30 s cada. Incube no banho-maria fervente (~100°C) por 10 minutos. Atenção, feche bem o tubo para não perder sua amostra!!!! Antes de prosseguir, mostre o tubo para os professores ou monitores.

2.3. Centrifugue os tubos a 12.000 rpm por 5 min para retirar os fragmentos celulares. *Peça auxílio para uso da centrífuga, os tubos devem estar balanceados no rotor. Remova o tubo cuidadosamente para que o pellet não ressuspenda.* Após a centrifugação, retire cuidadosamente 200uL do sobrenadante (cuidado para não aspirar o pellet) do tubo 1 e transfira para o tubo marcado como **S1** (sobrenadante 1) e o sobrenadante do tubo 2 transferindo-o para o tubo **S2**. Mantenha esses tubos no gelo.

3. Montagem do gel de poliacrilamida (este procedimento foi feito anteriormente à aula)

3.1. 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.

3.2. Prepare a solução para o gel de separação (10 % acrilamida, contendo 0,1 % SDS, 1.5 mm de espessura) (ou gel de corrida, ou “running”), pipetando as soluções na ordem abaixo:

- 6,00 mL água bidestilada
- 4,95 mL da mistura 30% acrilamida/ 0,8% bisacrilamida (solução A)
- 3,75 mL de tampão (4x concentrado) 1,5 M Tris-Cl pH 8,8 (solução B)
- 0,15 mL 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 (peça ajuda!), seque a água que permanece sobre o gel polimerizado com um papel de filtro.

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 tampão 1,5 M Tris-Cl pH 6,8 (solução C)
- 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. O gel será guardado em geladeira até a aula.

4. 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) **(continue aqui)**

4.1. 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.

4.2. Monte o aparato para eletroforese conforme instruções e adicione na cuba o tampão de corrida até cobrir os poços.

4.3. Marque quatro novos tubos para cada amostra, agora com: S1a, S1b, S2a e S2b.

S1a: Adicione 10 µl de amostra S1, 20 µl de água e 15 µl de tampão de amostra.

S1b: Adicione 5 µl de amostra S1, 25 µl de água e 15 µl de tampão de amostra.

S2a: Adicione 10 µl de amostra S2, 20 µl de água e 15 µl de tampão de amostra.

S2b: Adicione 5 µl de amostra S2, 25 µl de água e 15 µl de tampão de amostra.

Incube-os a em banho fervente por 5 min. **Atenção**, feche bem os tubos para eles não abrirem durante a fervura!!! Coloque os tubos no gelo por 1 min para resfriá-los e faça uma breve centrifugação de 20 s (*spin*) em minis centrifugas que estão presentes nas bancadas.

4.4. Aplique no gel 20 µL de cada amostra, de acordo com a ordem (escolha os poços melhores):

- Marcador de peso molecular (fornecido pela professora/monitores; não é necessário aquecer)
- Amostra S1a
- Amostra S1b
- Amostra S2a
- Amostra S2b

- 4.5. Nos poços sem amostra, aplique 20 µl de tampão de amostra para treino. Deixem todos os membros do grupo fazer a aplicação pelo menos uma vez.
- 4.6. 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). Atenção, conecte os polos corretamente, tanto ao encaixar a tampa da cuba, quanto ao conectar os fios na fonte de energia.
- 4.7. Interrompa a eletroforese, retire o gel do sanduíche de vidro com cuidado (use luvas!), lave abundantemente com água destilada com auxílio de pisseta, e mergulhe-o na solução de coloração (use a capela) por 20 min. O gel ficará completamente azul.
- 4.8. Descarte a solução de coloração no recipiente indicado, na capela. Lave cuidadosamente com água para retirar o excesso de solução.
- 4.9. Deixe o gel mergulhado em água. Para acelerar o processo de lavagem, o gel poderá ser aquecido em microondas. Caso haja tempo em aula o grupo pode começar este procedimento. Caso contrário, o gel poderá ser descolorado por incubação durante toda a noite.
- 4.9. Tire uma foto do seu gel para o relatório (mesmo que no dia seguinte).

5. Determinação da concentração de proteína nos extratos de *E. coli* (

Objetivos: Quantificar colorimetricamente proteínas nos lisados de *Escherichia coli*.

Reagentes Materiais e Aparelhagem: água destilada; espectrofotômetro; albumina 0,2 g/L; vórtice; lisado de *E. coli* (S1 e S2); pipetadores; reagente de Bradford.

Preparo do reagente de Bradford (**feito anteriormente à aula**):

1. Dissolva 50 mg de Coomassie Blue G250 em 50ml de metanol
2. Adicione 100ml de H₃PO₄ a 85% à solução da etapa 1
3. Adicione a solução do passo 2 em 500ml de H₂O e misture
4. Filtrar para remover partículas não solubilizadas ou precipitadas
5. Adicione mais 350ml de H₂O

Comece o item 5 aqui

5.1 Curva padrão para dosagem de proteínas

O padrão é uma solução de albumina bovina de concentração conhecida (1,0 mg/mL) e o reagente que revela a quantidade proteína é o reagente de Bradford.

1. Numere/nomeie os tubos conforme a tabela abaixo.
2. Adicionar em cada tubo os volumes de albumina e água* estipulado na Tabela 1.
3. Adicionar o reagente de Bradford.
4. Homogeneizar em vórtice.
5. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente
6. Transferir 200 uL para microplaca de 96 poços

Importante: pipetar todos os tubos em duplicata para leitura, tome nota de em quais poços da placa foram colocadas as respectivas amostras.

Tabela 1

tubos	albumina 0,2 g/L (μ L)	água (μ L)	reagente de Bradford (mL)
branco	0	100	1,0
1	10	90	1,0
2	20	80	1,0
3	30	70	1,0
4	40	60	1,0
5	50	50	1,0
6	60	40	1,0
7	70	30	1,0
8	80	20	1,0

7. Faça uma diluição 40x (1:39) das suas amostras S1 e S2, da seguinte forma:

DS1 (diluição de S1): 10 μ l de amostra S1 + 390 μ l de água destilada

DS2 (diluição de S2): 10 μ l de amostra S2+ 390 μ l de água destilada

8. Nomeie os tubos e os prepare conforme a tabela 2 abaixo:

	<i>Amostra DS1 (μl)</i>	<i>Água (μl)</i>	<i>reagente de Bradford (mL)</i>
DS1a	100	0	1,0
DS1b	50	50	1,0
	<i>Amostra DS2 (μl)</i>	<i>Água (μl)</i>	<i>reagente de Bradford (mL)</i>
DS2a	100	0	1,0
DS2b	50	50	1,0

9. Homogeneizar em vórtice.

10. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente

11. Transferir 200 μ l para microplaca de 96 poços

Importante: pipetar todos os tubos em duplicata para leitura, tome nota de em quais poços da placa foram colocadas as respectivas amostras.

12. Ler as absorvâncias a 595 nm.

1. a) O que é SDS-PAGE? 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) Por que há SDS no gel?
2. Monte uma figura com a foto do gel do seu grupo. Indique claramente as canaletas (nomeando ou numerando-as) e faça uma legenda explicando o que é cada amostra.
3. Fazer o gráfico de absorbância versus ug/mL de proteína e quantificar as amostras DS1a-c e DS2a-c. Qual a concentração de proteína nos tubos S1 e S2?