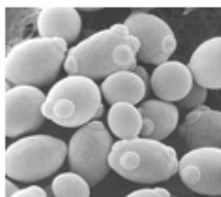


QBQ0316 - Bioquímica Experimental (2020)

# **Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE)**

# O que será feito na parte experimental: extração, purificação, quantificação e caracterização da alfa-glicosidase (maltase) de levedura.

Cultura de leveduras  
*S. cerevisiae*



Aula 2

Lise celular

Aula 3

Dosar proteína e atividade  
enzimática no lisado total

Aula 4, 5, 6

Purificar sequencialmente  
a proteína de interesse:

- Precipitação com Sulfato de amônio
- Cromatografia troca iônica

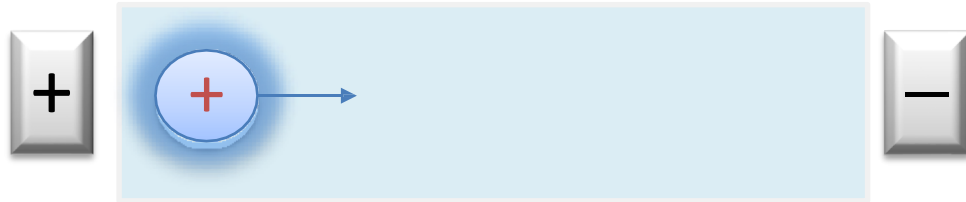
Avaliar o enriquecimento e  
recuperação da atividade enzimática  
ao longo das etapas de purificação

Avaliar as proteínas presentes na  
fração purificada por eletroforese  
em gel (SDS-PAGE)

Caracterizar a  
atividade  
enzimática na  
fração purificada:  
pH ótimo, inibição

# 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:

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

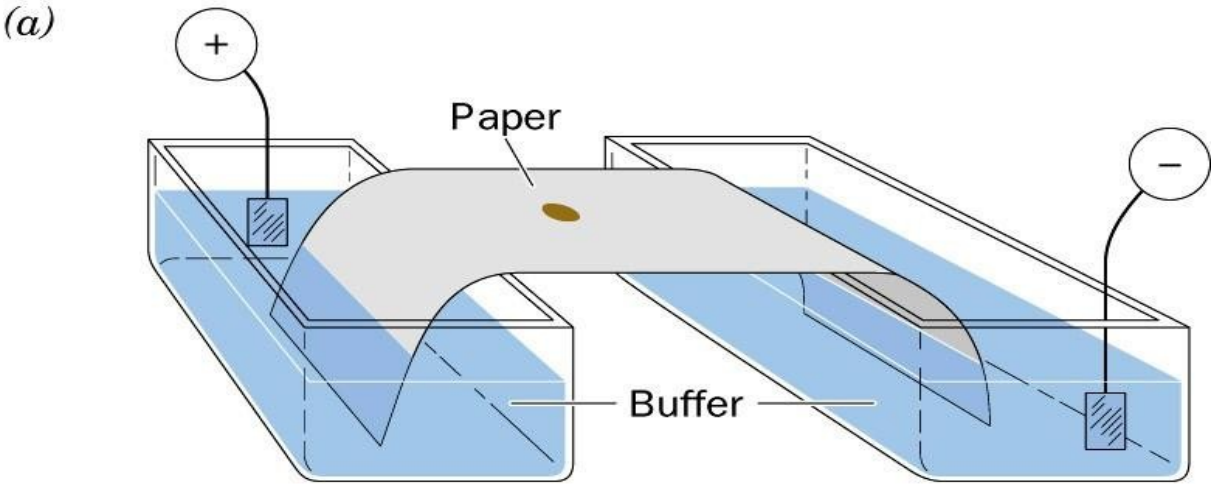
$f$  = coeficiente friccional =  $6\pi\eta r$   
[resistência encontrada pelo íon;  
dependente da viscosidade do  
meio( $\eta$ ) e do tamanho e forma do  
íon, ( $r$ ) ]

$$\mu = \frac{qE}{fE}$$

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

# SUPORTES PARA ELETROFORESE

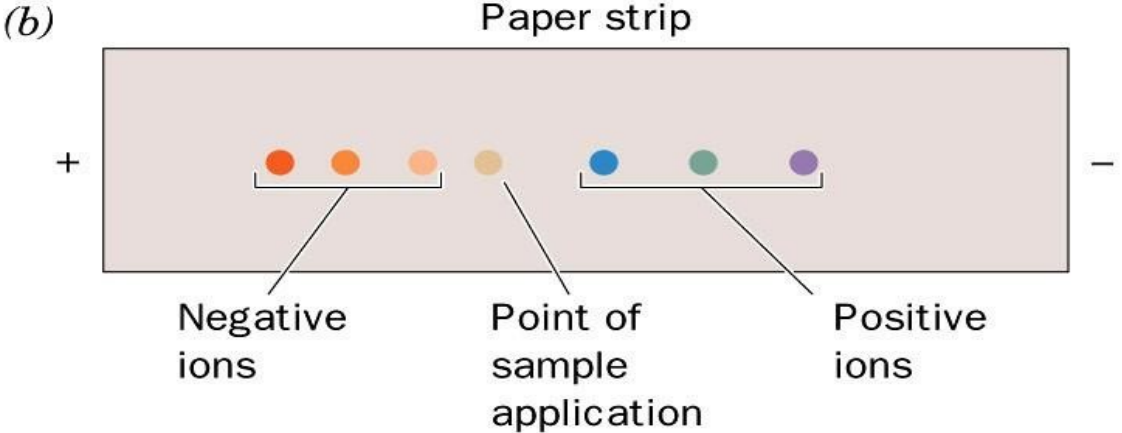
Papel



Gel de Agarose

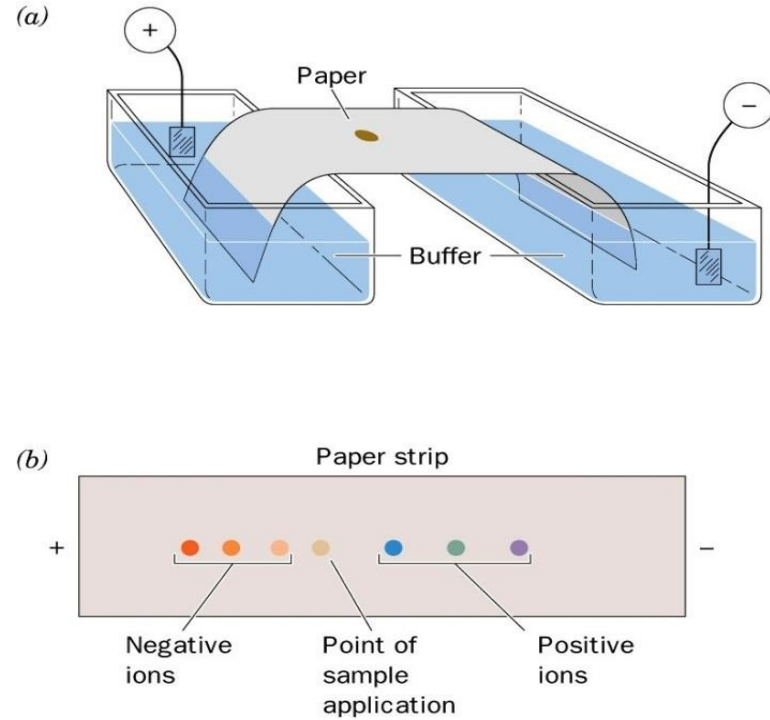
Manutenção do pH

Gel de Poliacrilamida



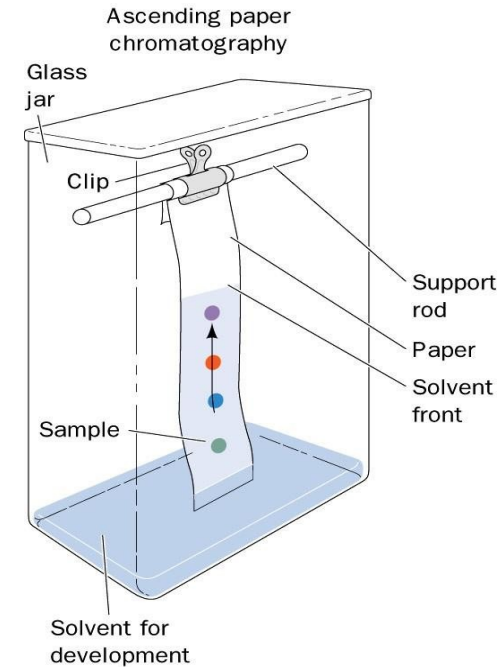
# ELETROFORESE E CROMATOGRAFIA SÃO BASEADAS EM DIFERENTES PRINCÍPIOS

## Eletroforese



Mobilidade depende da **carga** e **forma** da molécula....

## Cromatografia



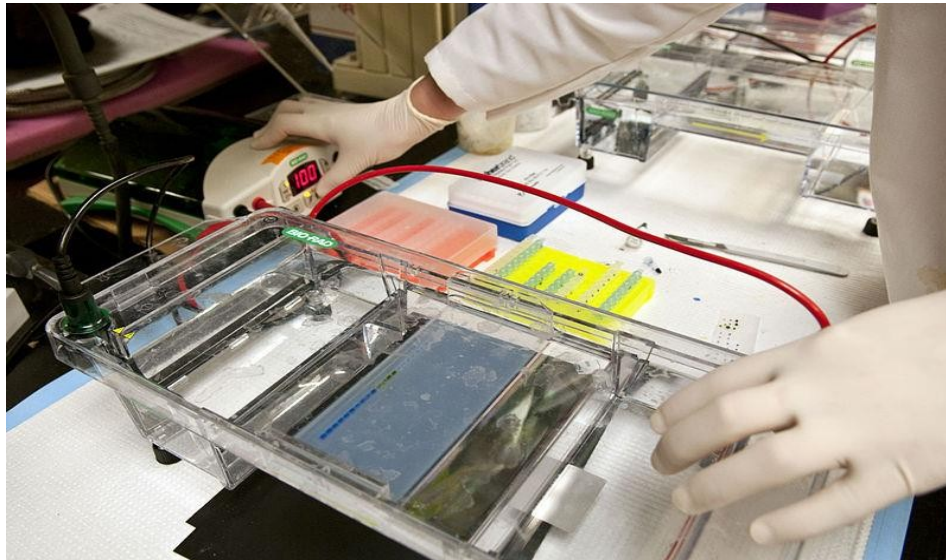
Mobilidade depende da **interação** **relativa da molécula** com a fase estacionária e a fase móvel...

# SUPORTES PARA ELETROFORESE

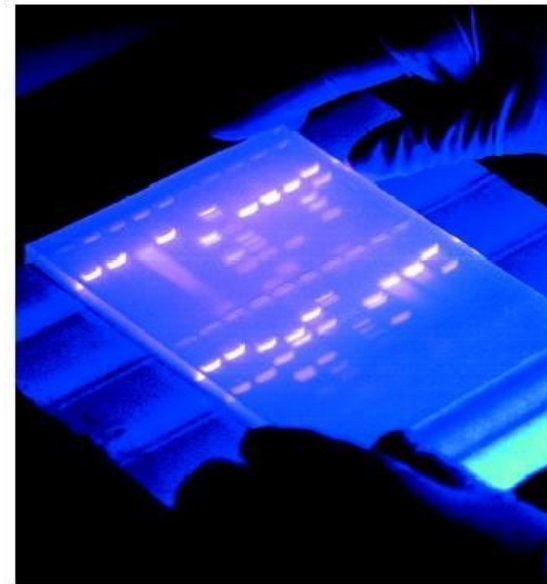
A agarose é uma mistura de polissacarídeos isolados de algas.

Gel de Agarose

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)



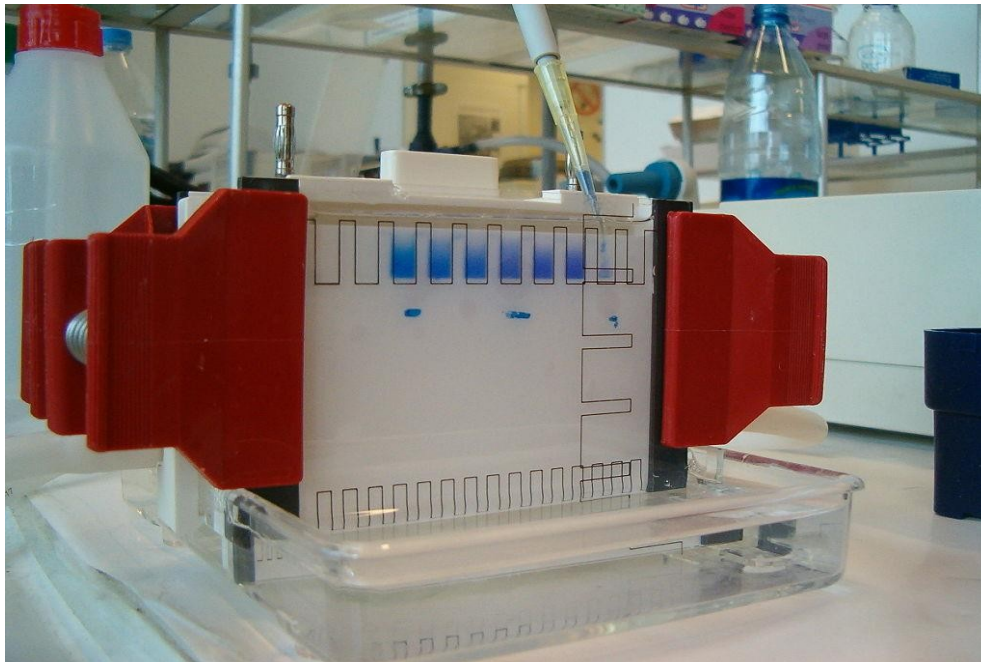
<http://www.biologyreference.com/Dn-Ep/Electrophoresis.html>

# SUportes PARA ELETROFORESE

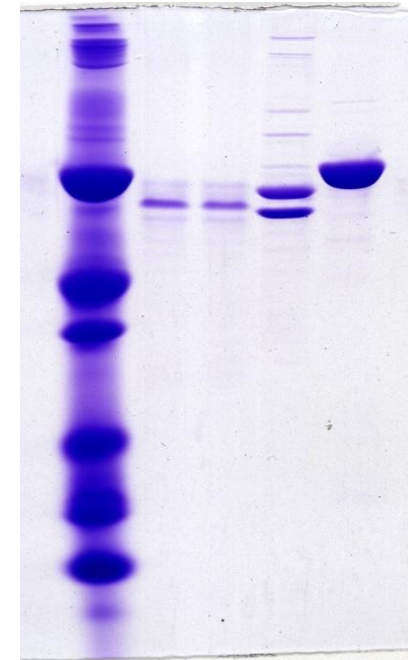
Gel de Poliacrilamida

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

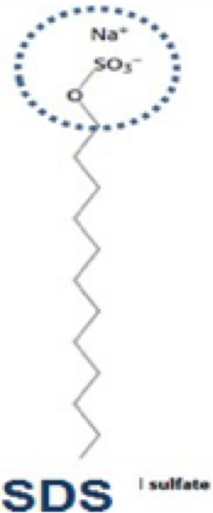
Eletroforese

- Nativa (não desnaturante)  
separação por carga, massa molecular e forma

(SDS-PAGE)

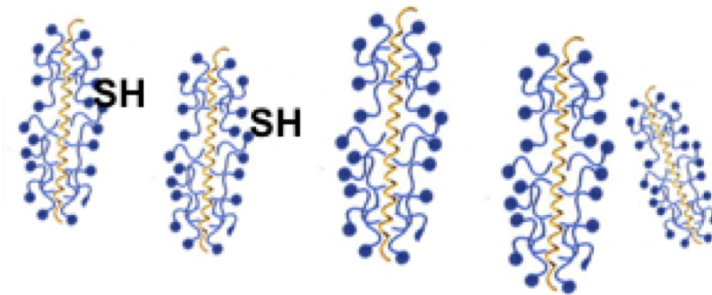
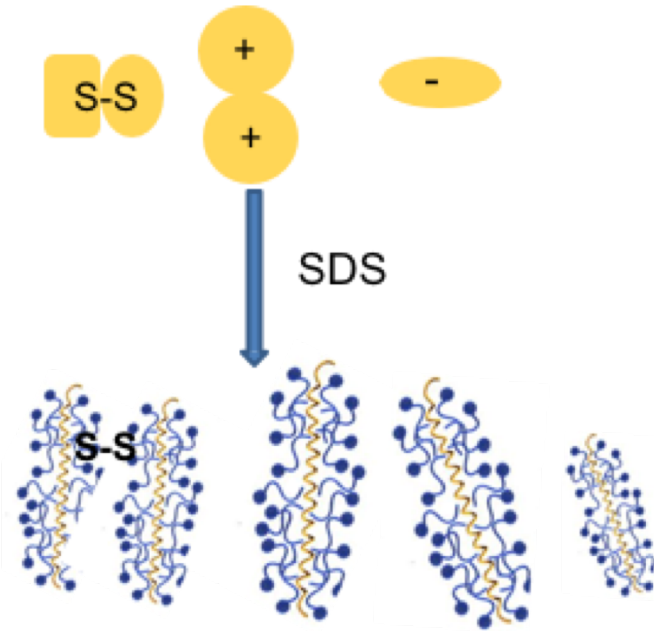
Desnaturante

- Não Redutora  
separação por massa molecular
- Redutora  
pontes dissulfeto S-S são reduzidas por agentes redutores beta mercapto-etanol (HS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ou ditioneitol (DTT)



*desnatura proteínas tornando-as lineares e carregadas negativamente*

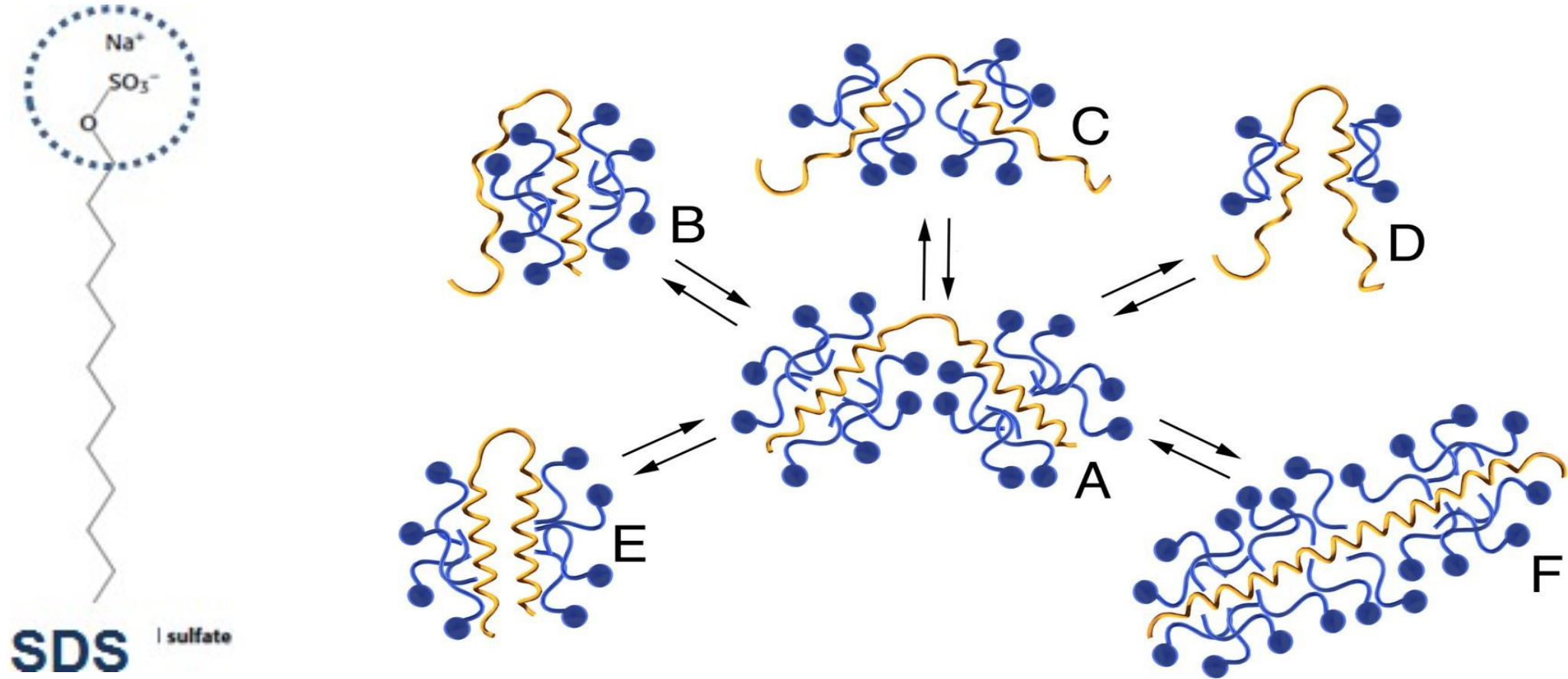
Dodecil sulfato de Sódio





# SDS-PAGE

-O SDS confere carga negativa à todas as proteínas



Rath A et al. PNAS 2009;106:1760-1765

Augusto\_  
15

# SDS-PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

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

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

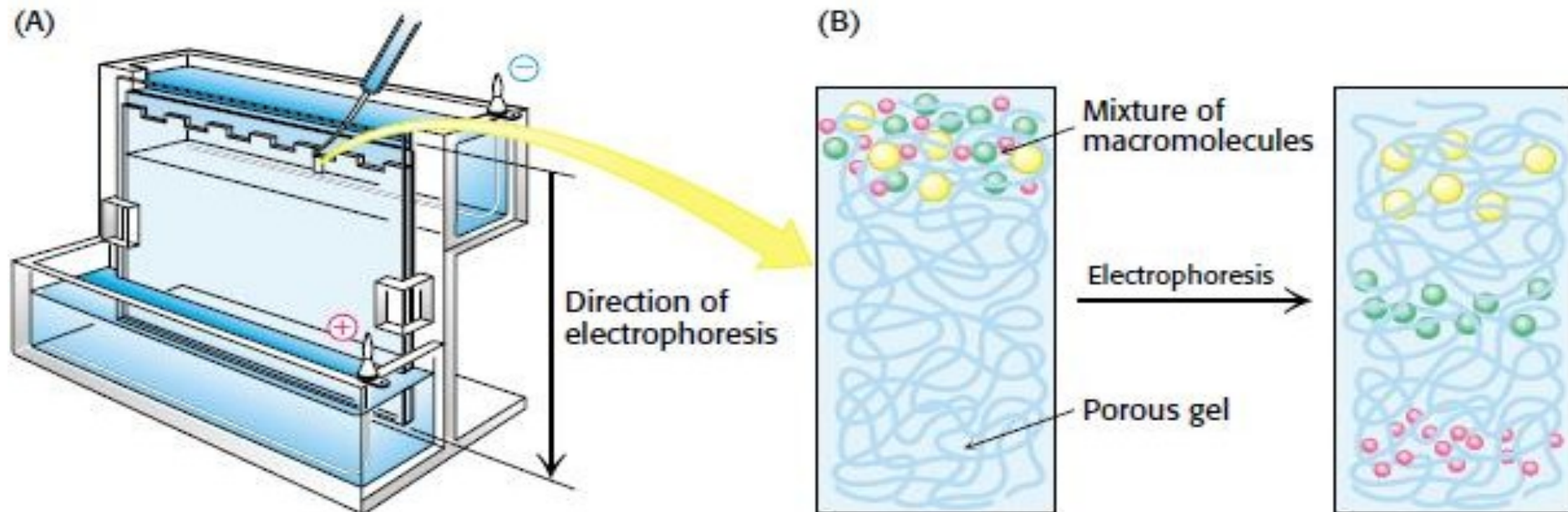
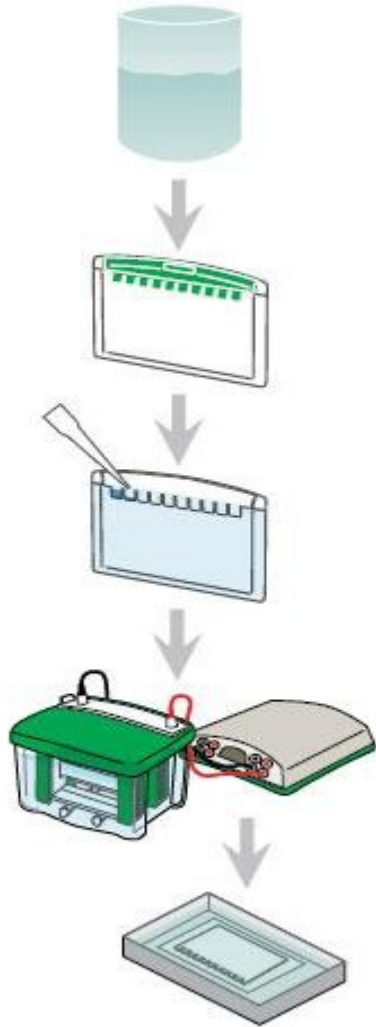


Figura – Livro Stryer

# ETAPAS EM UM SDS-PAGE



1) Preparo do gel

2) Preparo das amostras

3) Montagem do aparato de eletroforese

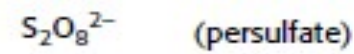
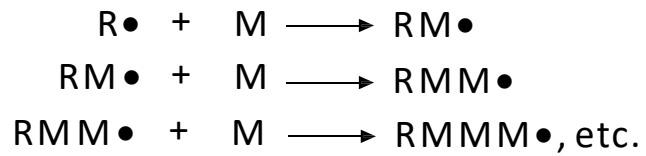
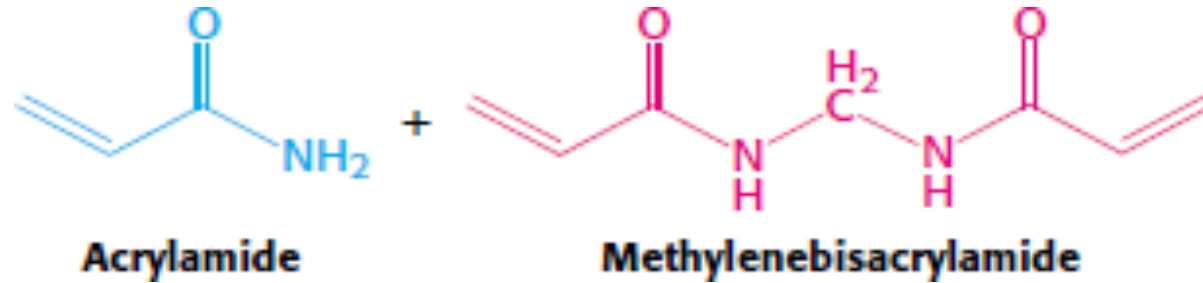
4) Aplicação das amostras

5) Separação das amostras no gel de eletroforese

6) Revelação do gel de eletroforese

[https://www.youtube.com/watch?v=\\_8xftsClwYo](https://www.youtube.com/watch?v=_8xftsClwYo)

# PREPARAÇÃO DO GEL



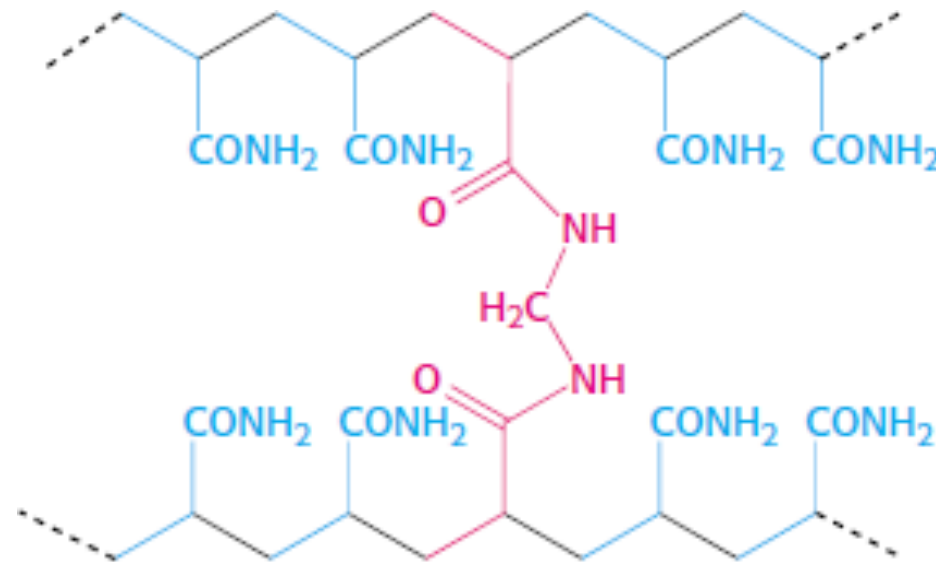
**Catalisador**

**TEMED**

OU

**Riboflavina+luz**

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



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

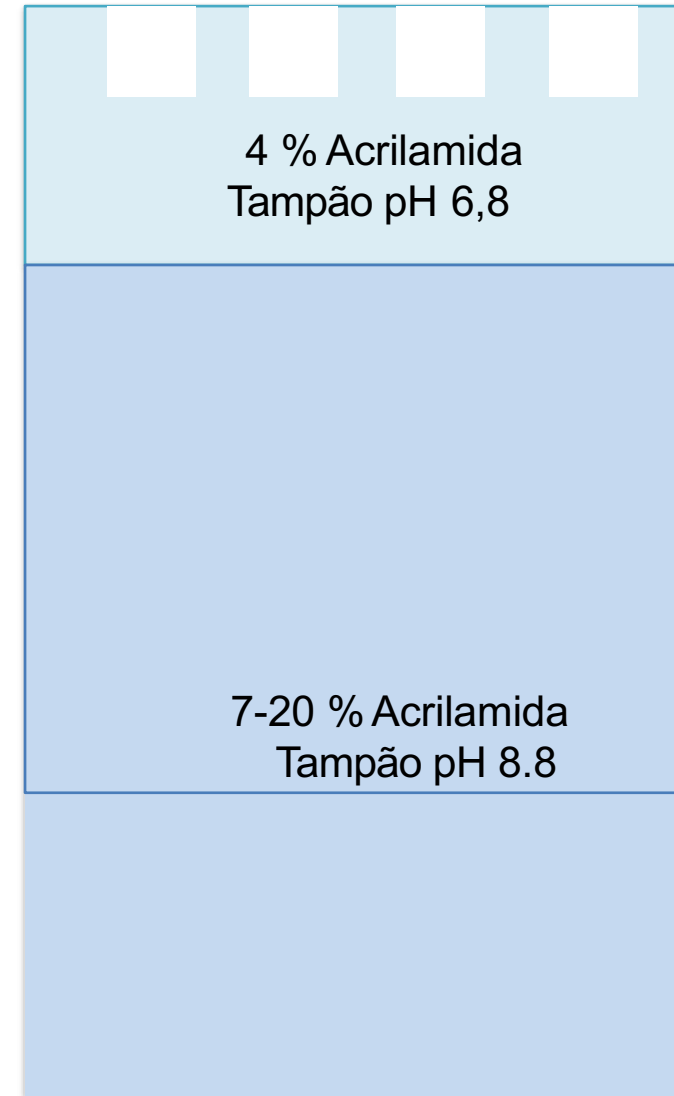
# SDS-PAGE

## 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

## 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



No gel de Empilhamento...

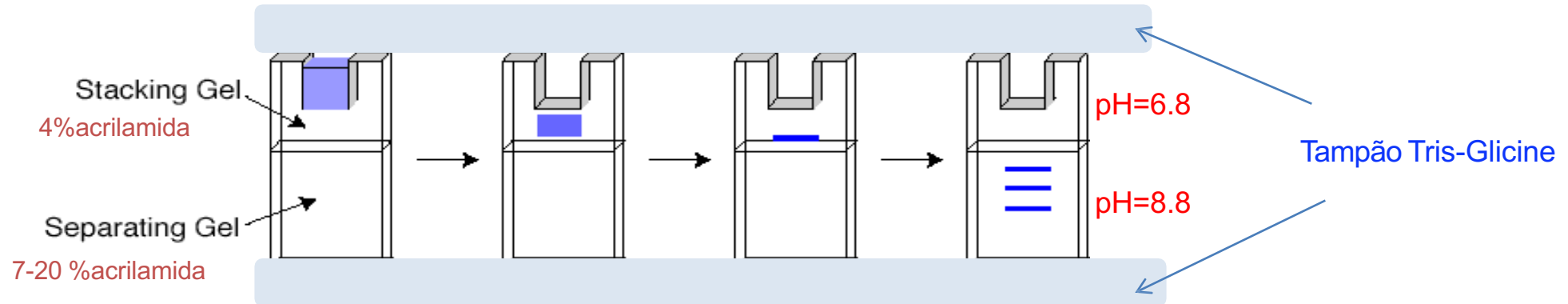
Direção da eletroforese



Gly Gly Gly Gly Gly  
Gly Gly Gly Gly  
Gly Gly Gly Gly Gly  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-

Gly (pI=6,1) parcialmente dissociado em pH 6.8 (carga zero + carga -1)

As proteínas se concentram em uma banda fina no gel de empilhamento aumentando a resolução



No gel de Separação...

Direção da eletroforese



Gly Gly Gly Gly Gly  
Gly Gly Gly Gly  
Gly Gly Gly Gly Gly  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-  
Cl- Cl- Cl- Cl- Cl-

Gly (pI=6,1) Praticamente dissociado pH 8.8 (carga -1)

# SDS-PAGE

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



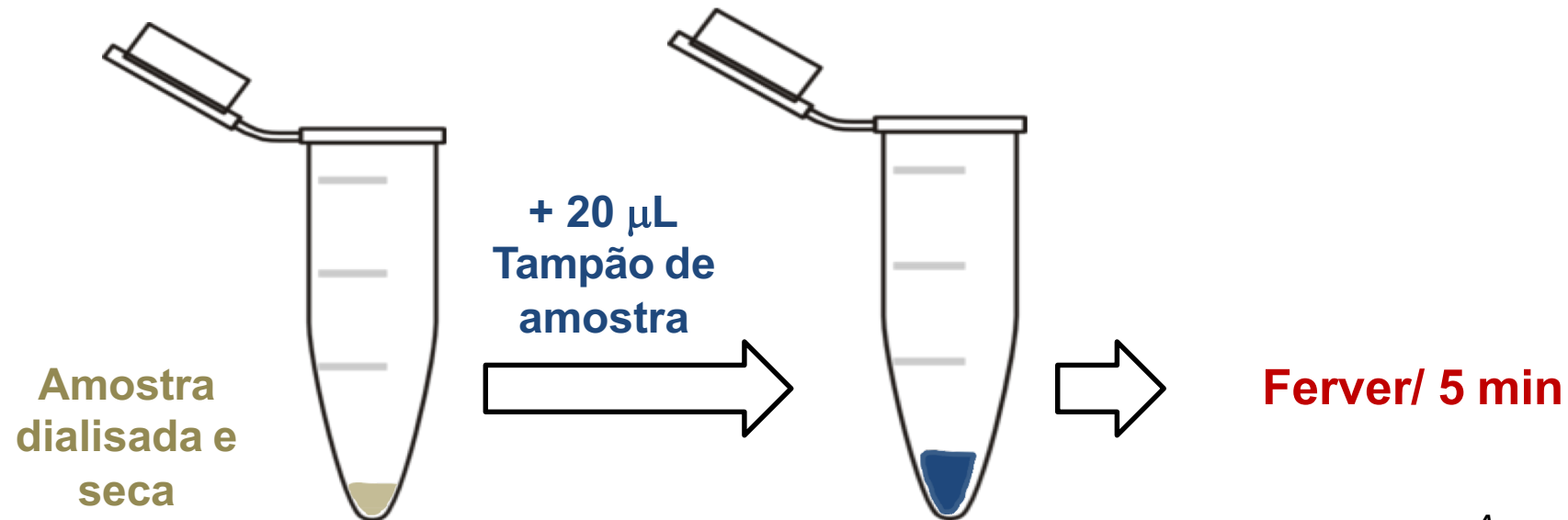
<http://bitesizebio.com/3285/sds-page-the-easy-way-to-find-the-wells/>

# SDS-PAGE

## 2) Preparo das amostras

### TAMPÃO DE AMOSTRA (Laemmli buffer)

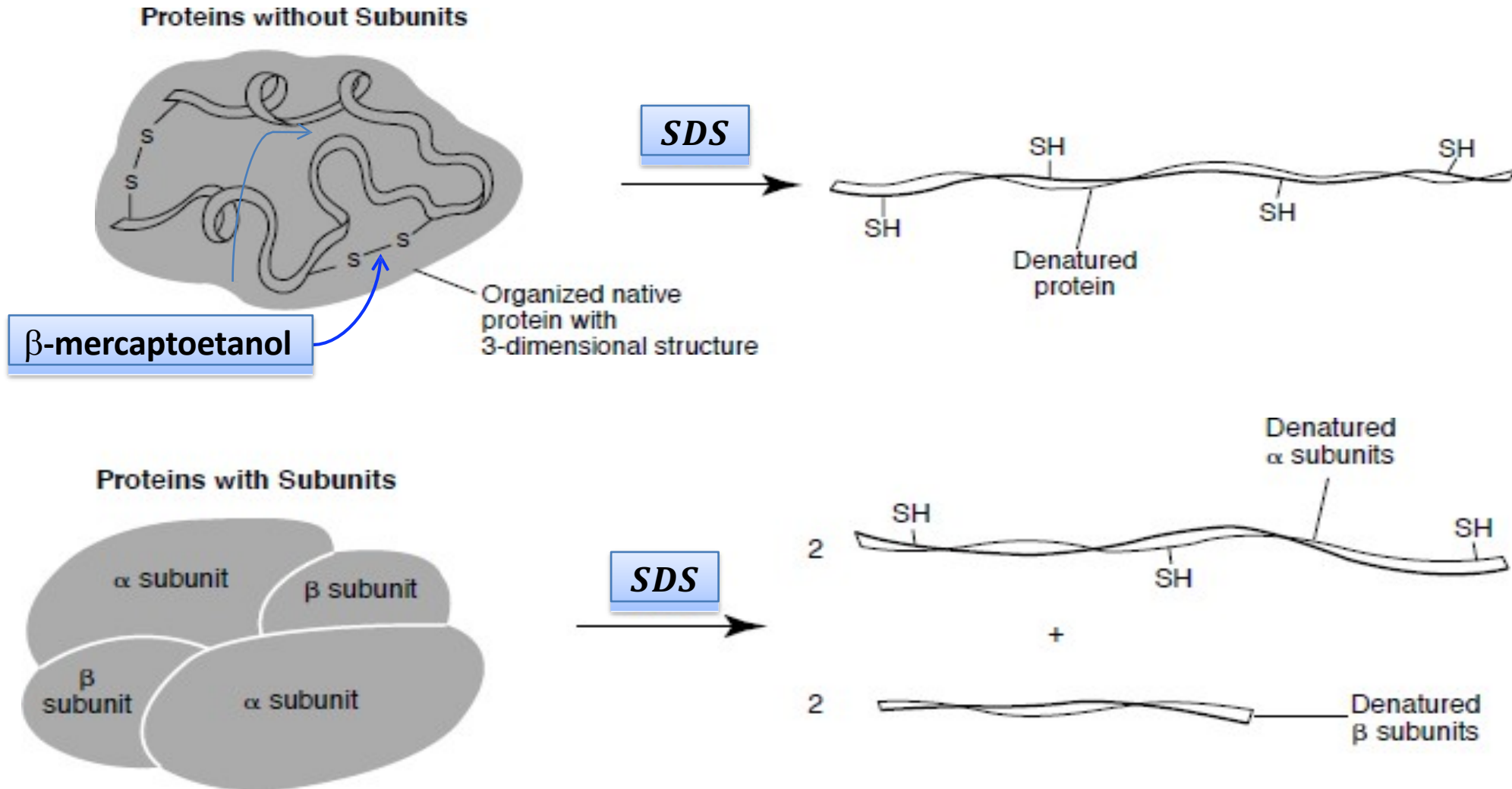
Água	3,55 mL
Tampão Tris 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
Glicerol <i>umenta a densidade da amostra</i>	2,50 mL
SDS 10 % <i>desnatura proteínas</i>	2,00 mL
Azul de bromofenol <i>corante, marca a frente de corrida do gel</i>	0,20 mL
$\beta$ -mercaptoetanol <i>reduzir pontes dissulfeto</i>	0,05 mL



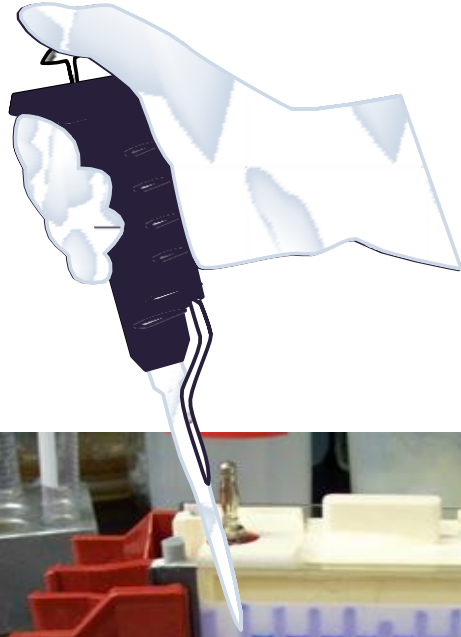


# SDS-PAGE

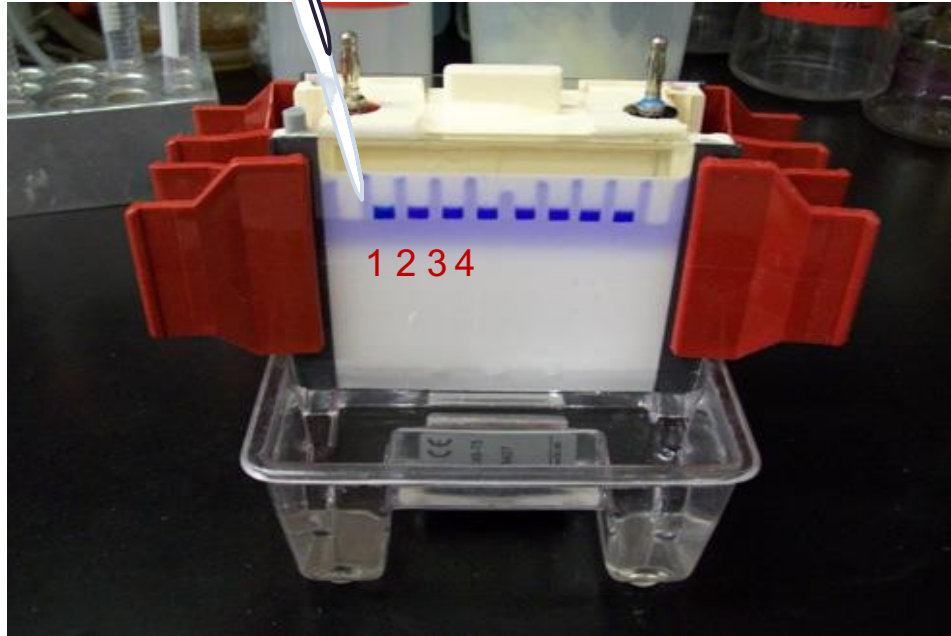
Aquecimento e SDS desnaturam a proteína  
Beta-mercaptoetanol reduz as pontes de dissulfeto



# SDS-PAGE



Aplicar as amostras com cuidado!

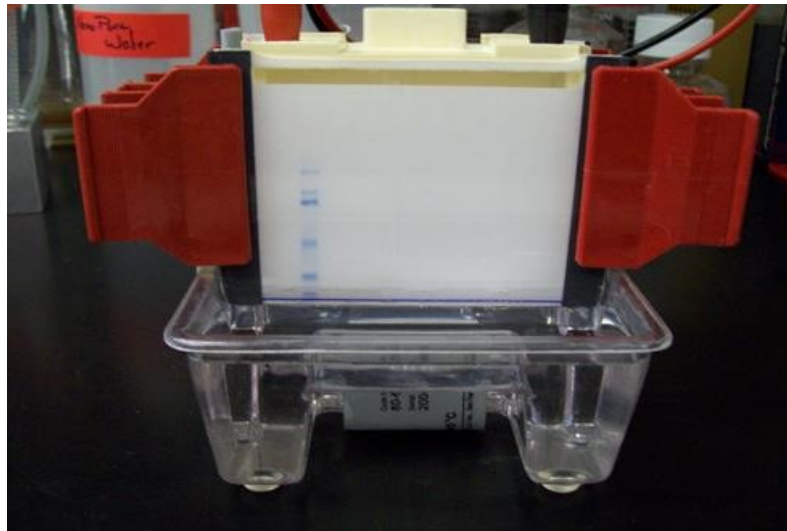
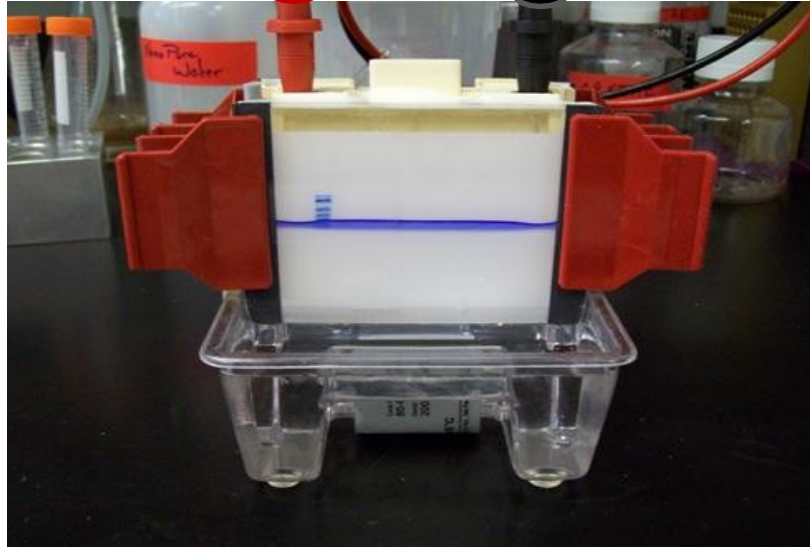


- 1: Padrão de peso molecular
- 2: Lisado centrifugado
- 3: Material DEAE

# SDS-PAGE

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

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



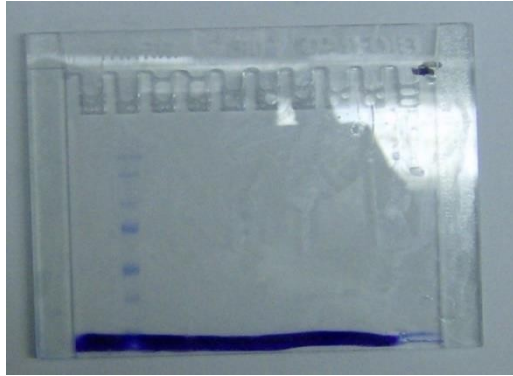
Ligar a fonte e aguardar a migração da proteína até o final



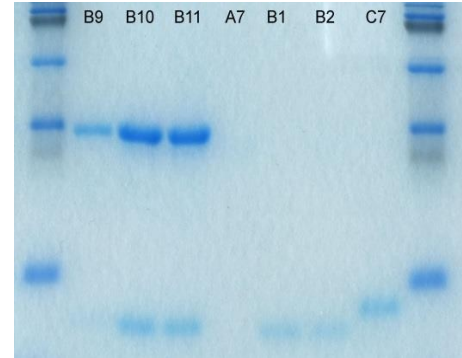
Augusto\_  
15

# 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 (immublotting)

## -Usos de SDS-PAGE

-Acompanhar a expressão e/ou purificação de proteínas

-Determinar massas moleculares de proteínas

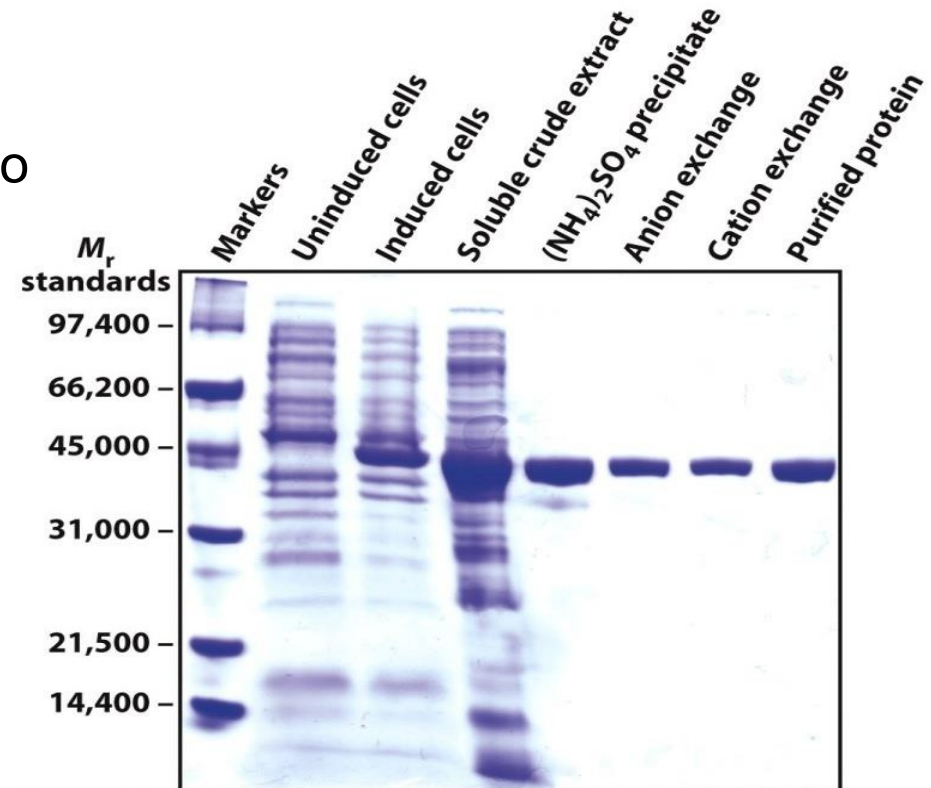
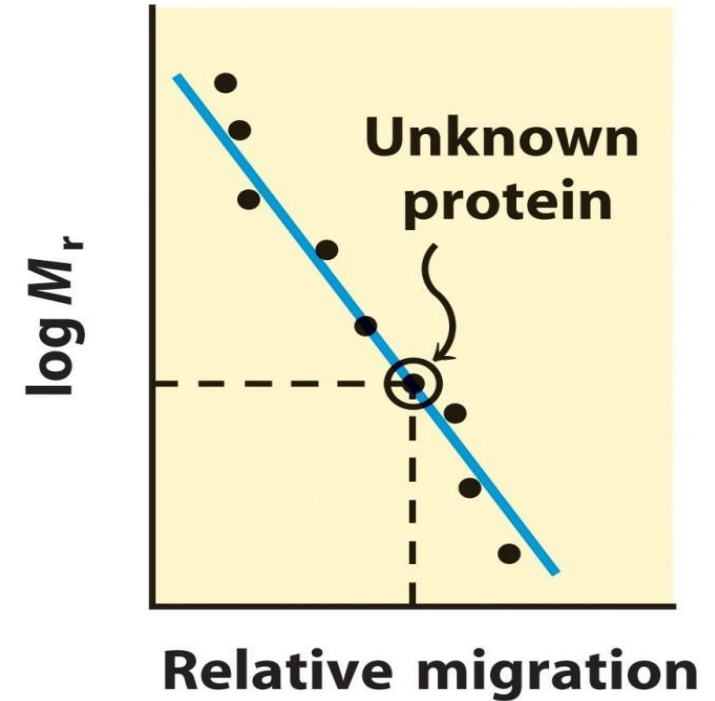
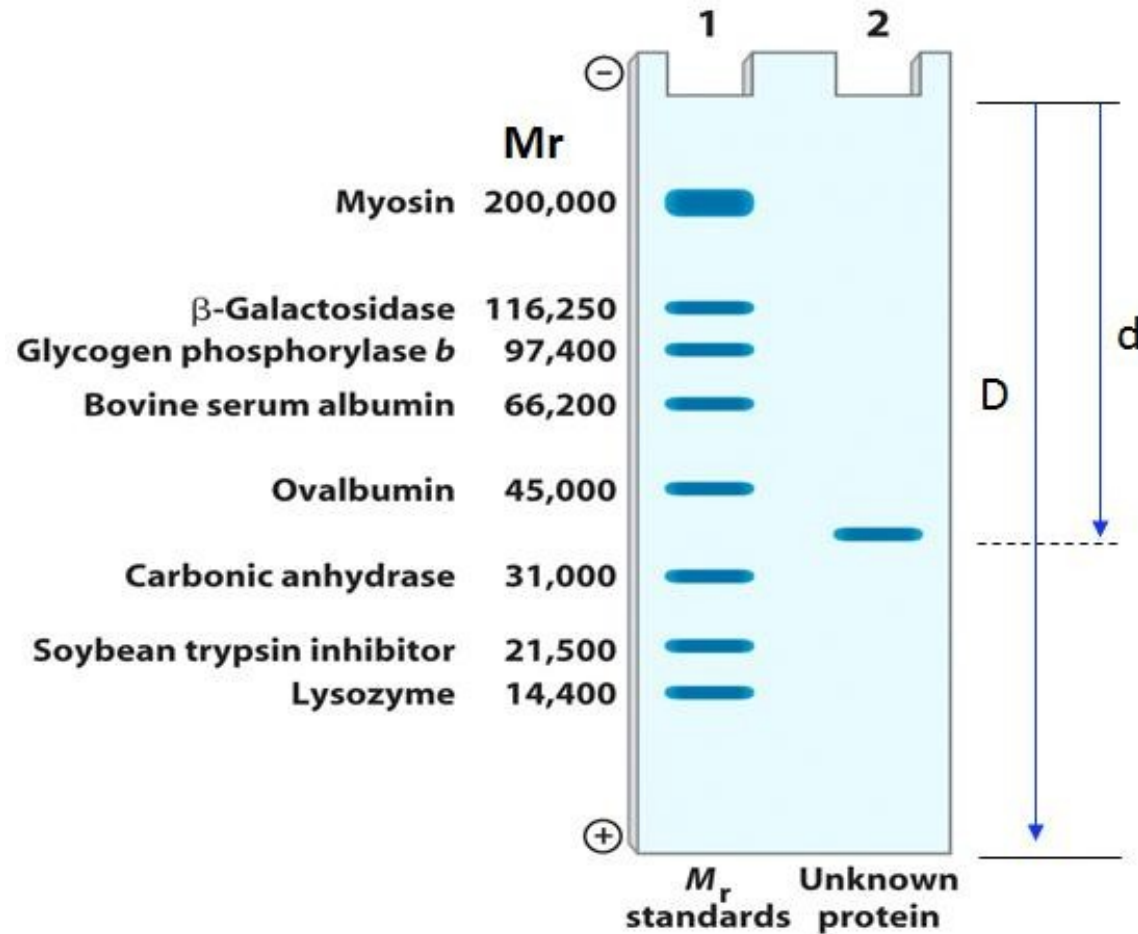


Figure 3-18b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# DETERMINAR MASSA MOLECULAR RELATIVA



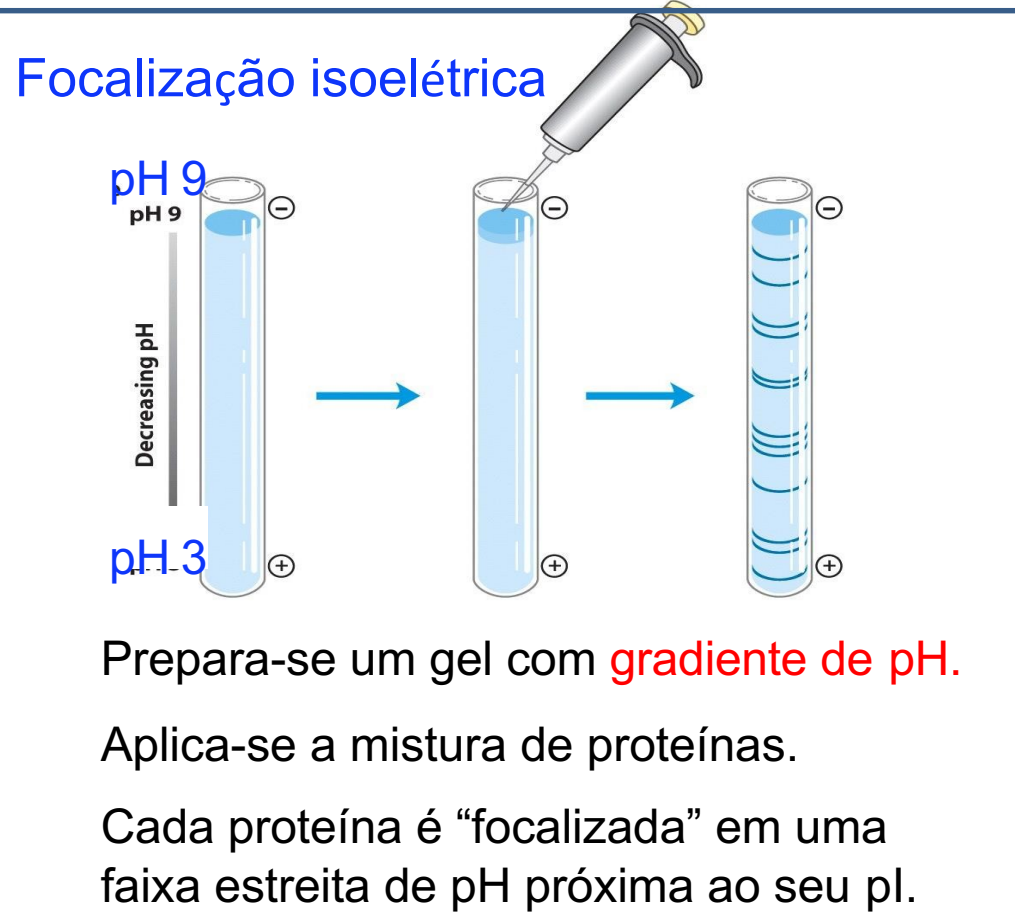
$$R_m = d/D$$

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

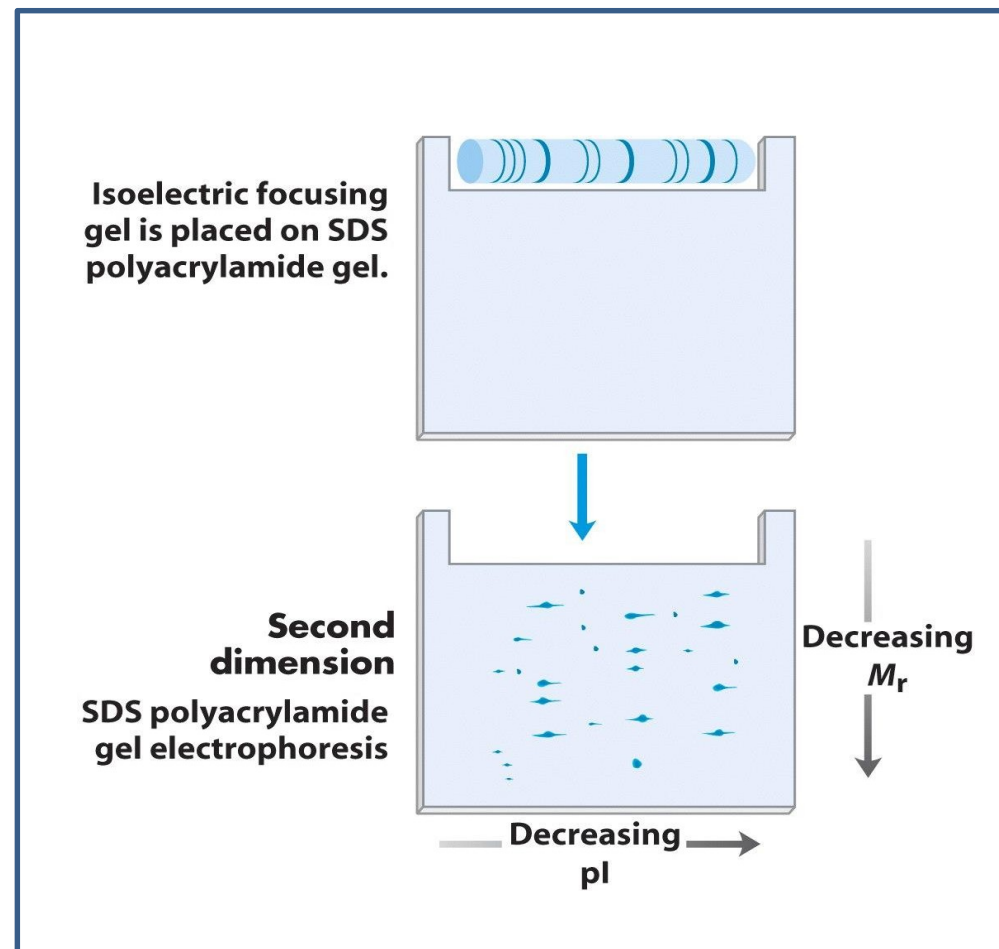
# ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

## Otimiza a separação de proteínas

Primeira dimensão- separação de acordo com o pI

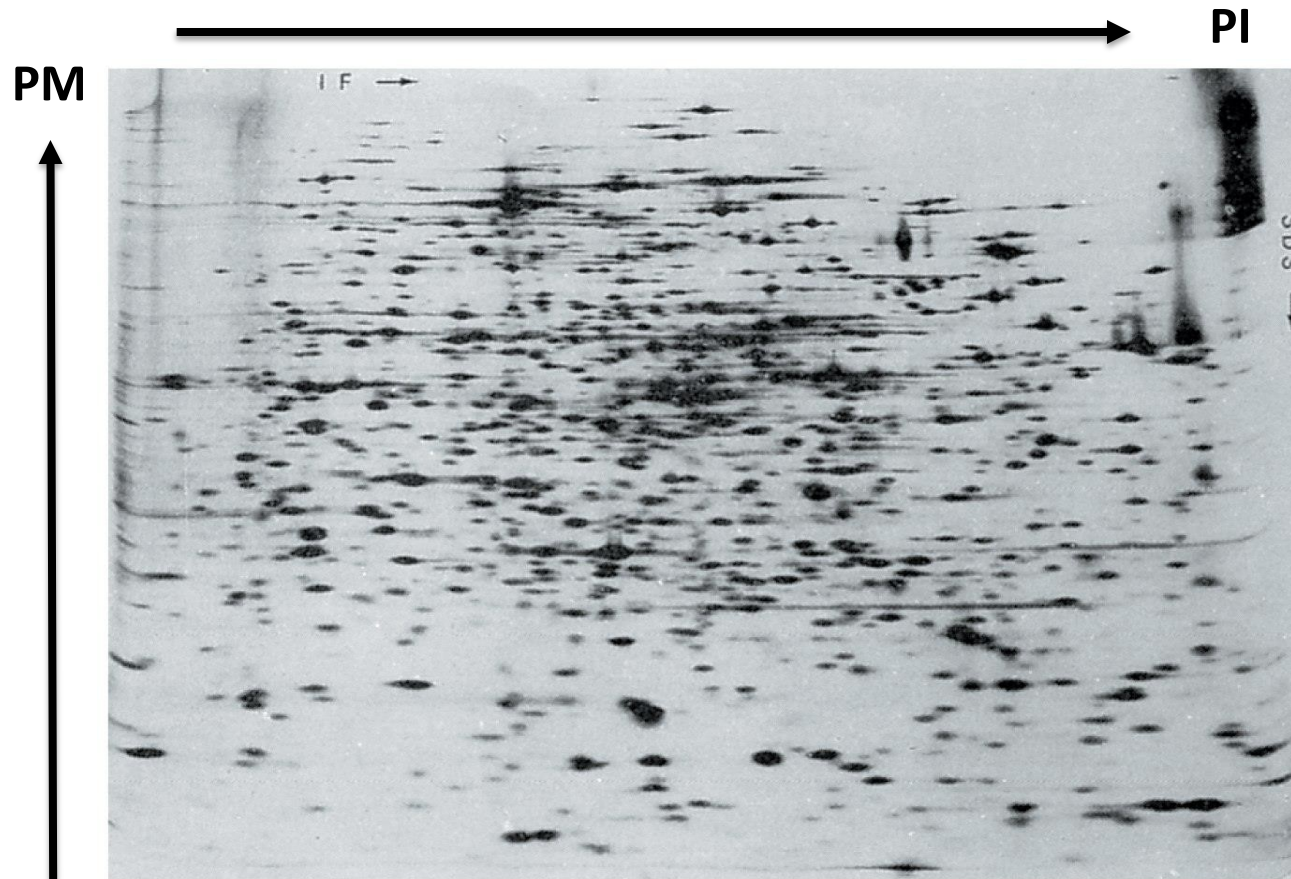


Segunda dimensão- separação de acordo com a massa molecular



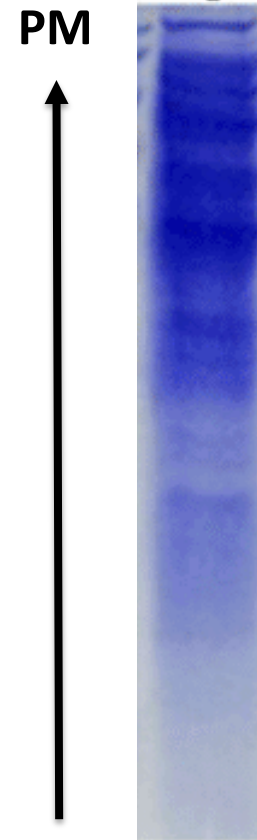
# ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

Eletoforese em gel bidimensional  
das proteínas de E. coli



Mais de 2,000 proteínas são visualizadas

SDS-PAGE

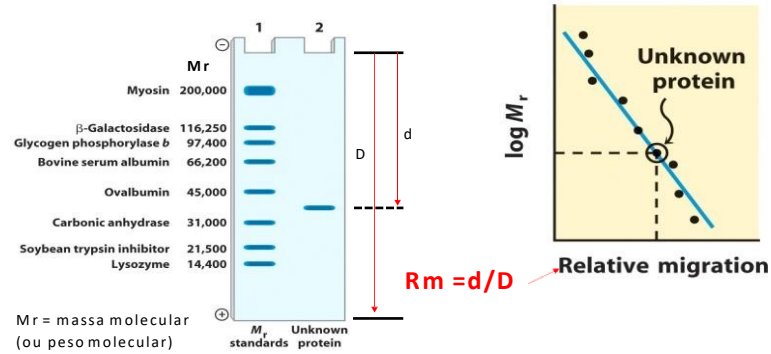


- Utilizada para comparar níveis de expressão de proteínas
- Proteínas podem ser identificadas por revelação com anticorpos.
- Proteínas podem ser identificadas por espectrometria de massas.

# COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PARA DETERMINAR A MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS

## SDS-PAGE

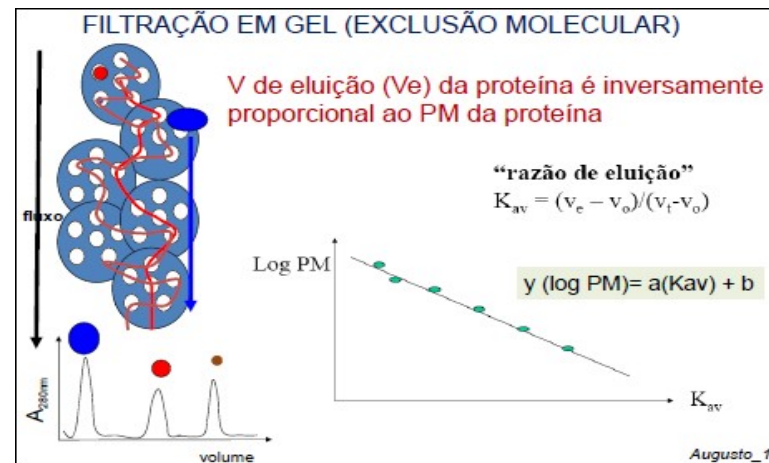
Migração relativa



Precisão  
 $\pm 10\%$

## Cromatografia de Exclusão

Eluição relativa



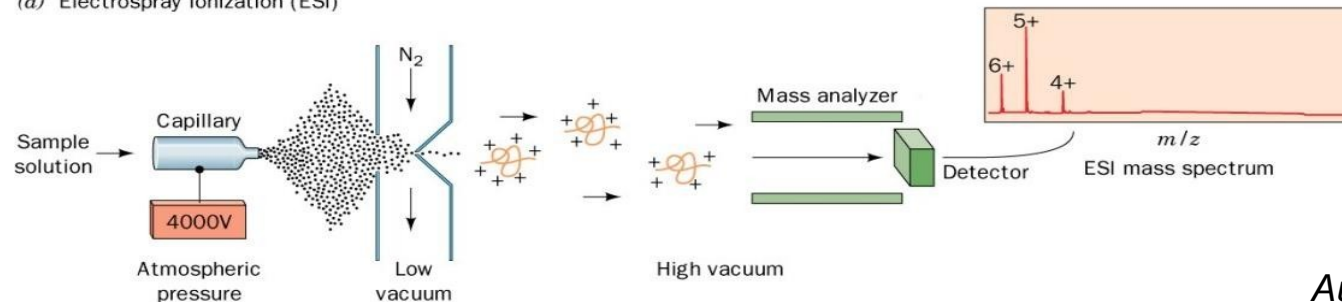
Precisão  
 $\pm 10\%$

## Espectrometria de Massas

Método bastante sensível

Valores de massa/carga bastante precisos

(a) Electrospray ionization (ESI)



Precisão  
 $\pm 0.001\%$