

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SDS-PAGE E WESTERN BLOT

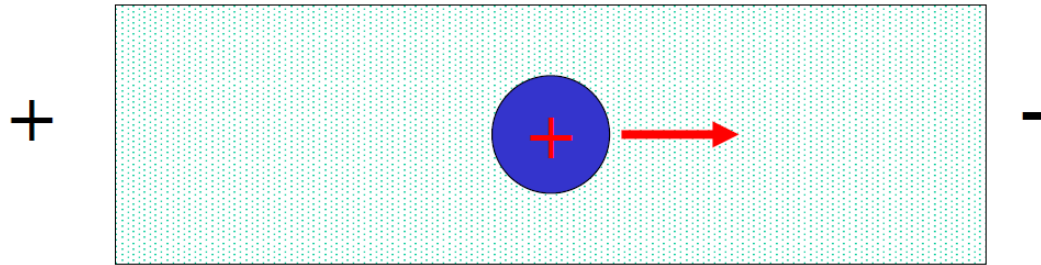
01-JUN-2022

QBQ 1453 – Química Diurno

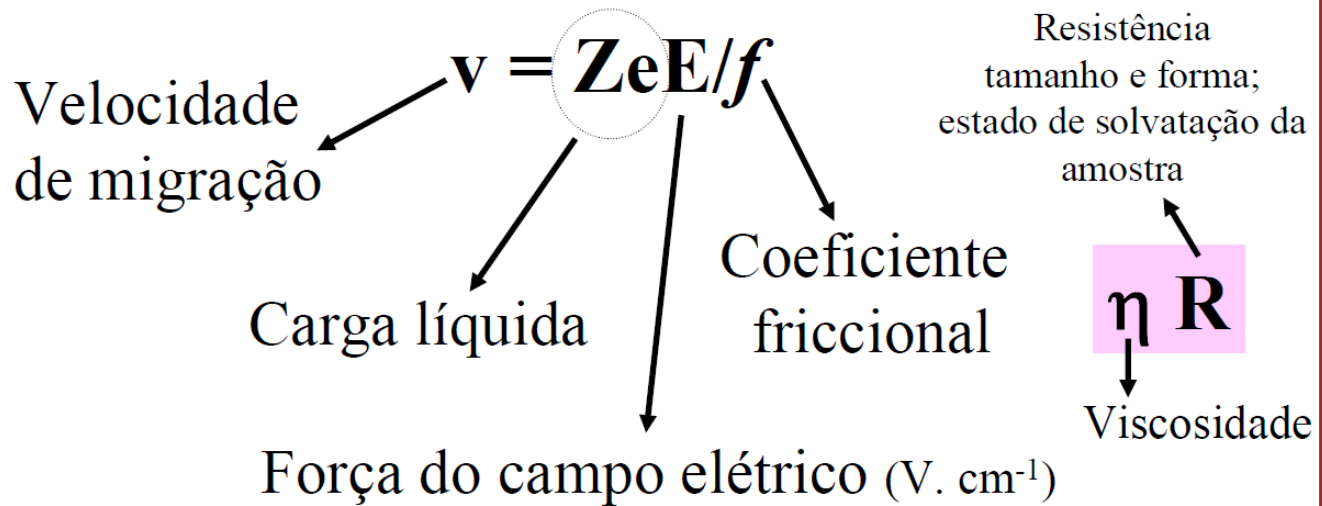
Eletróforese de proteínas

- Electro + phórēsis (grego) = movimento
- Eletróforese refere-se ao movimento de moléculas frente a um campo elétrico.
- A eletróforese em gel ou papel é uma técnica muito útil em laboratório para analisar e separar proteínas (e outras macromoléculas...).

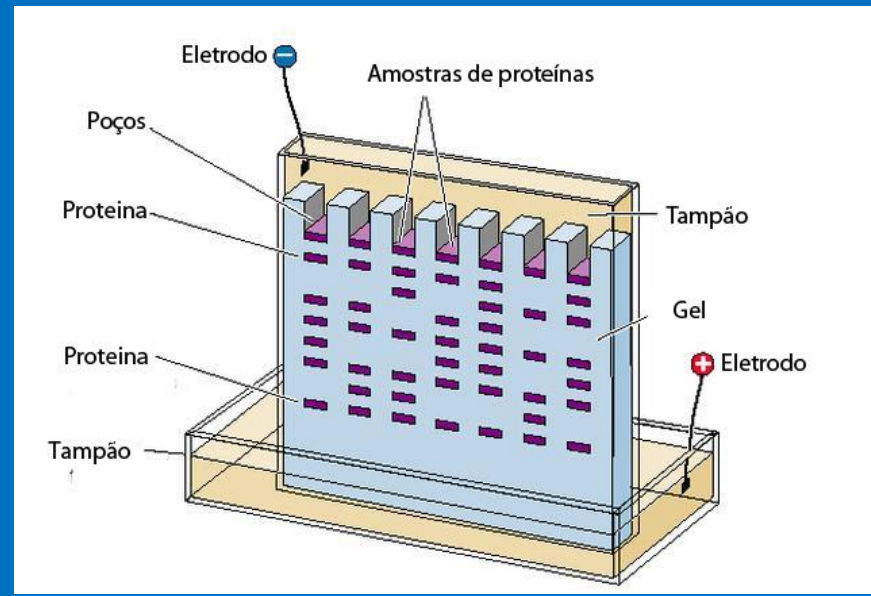
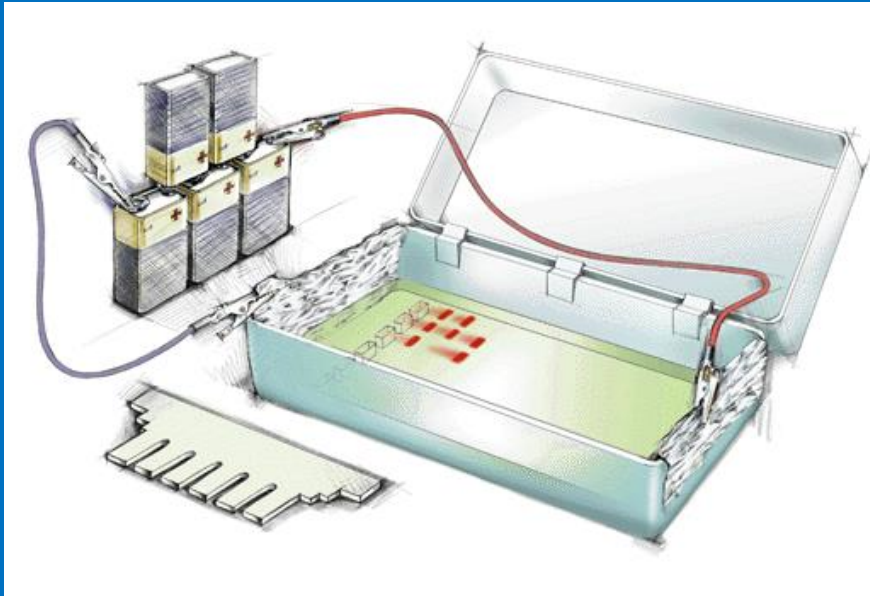
Teoria



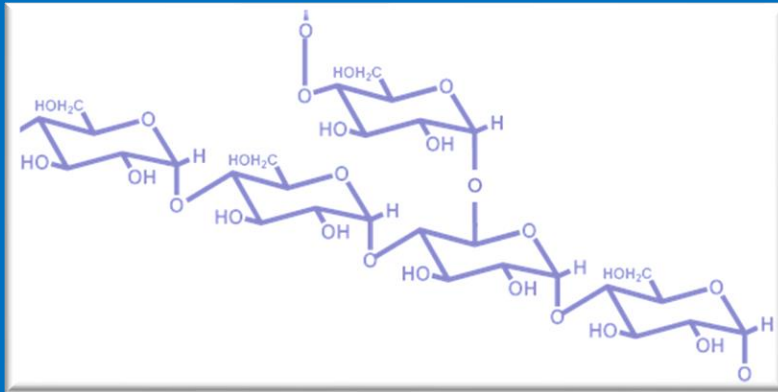
Mobilidade eletroforética (μ) = $v/E = Z/f$



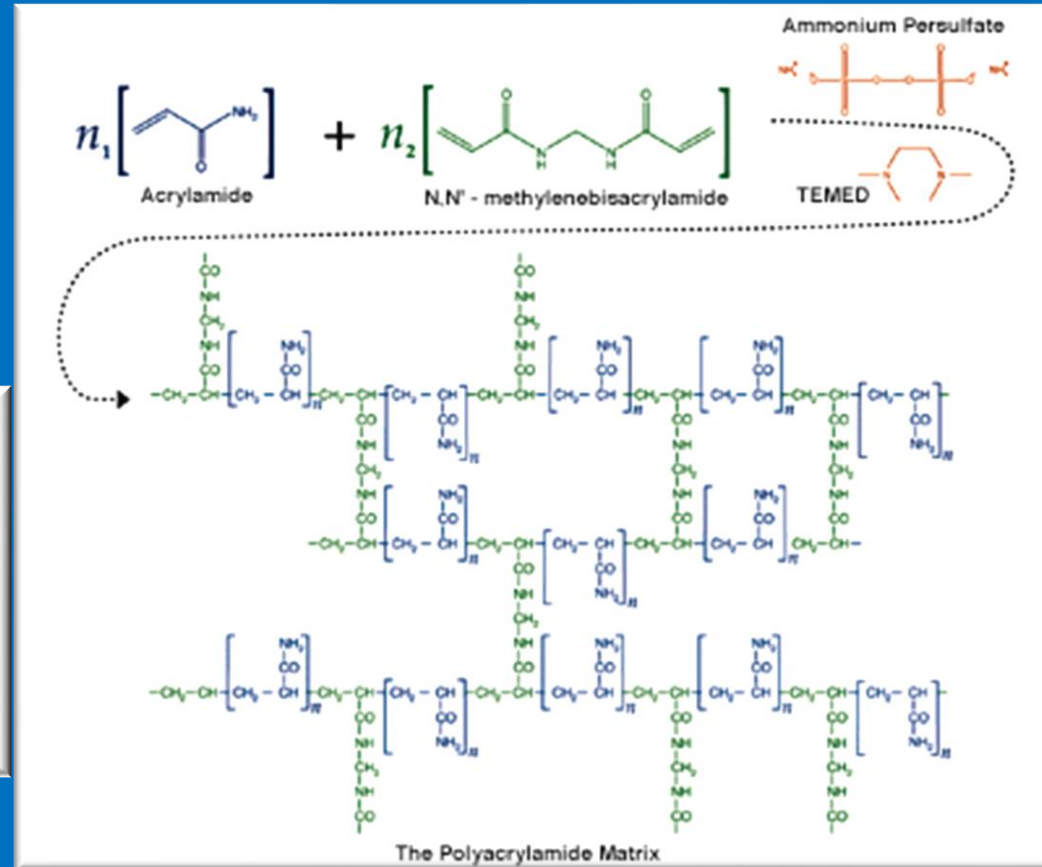
Eletroforese Vertical ou Horizontal



O meio: papel, agarose, acrilamida



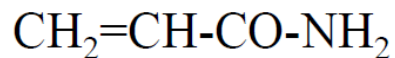
Agarose



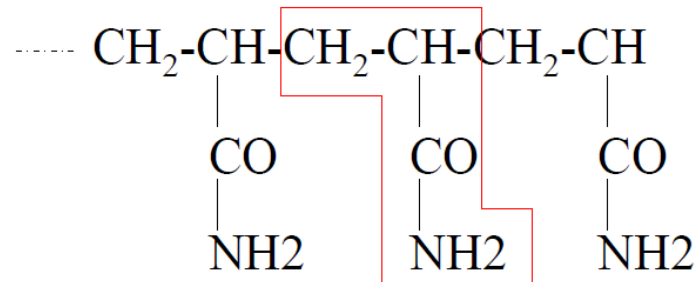
Acrilamida + bis-acrilamida

Geis de poliacrilamida

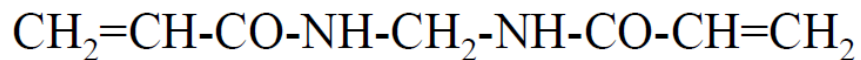
acrilamida



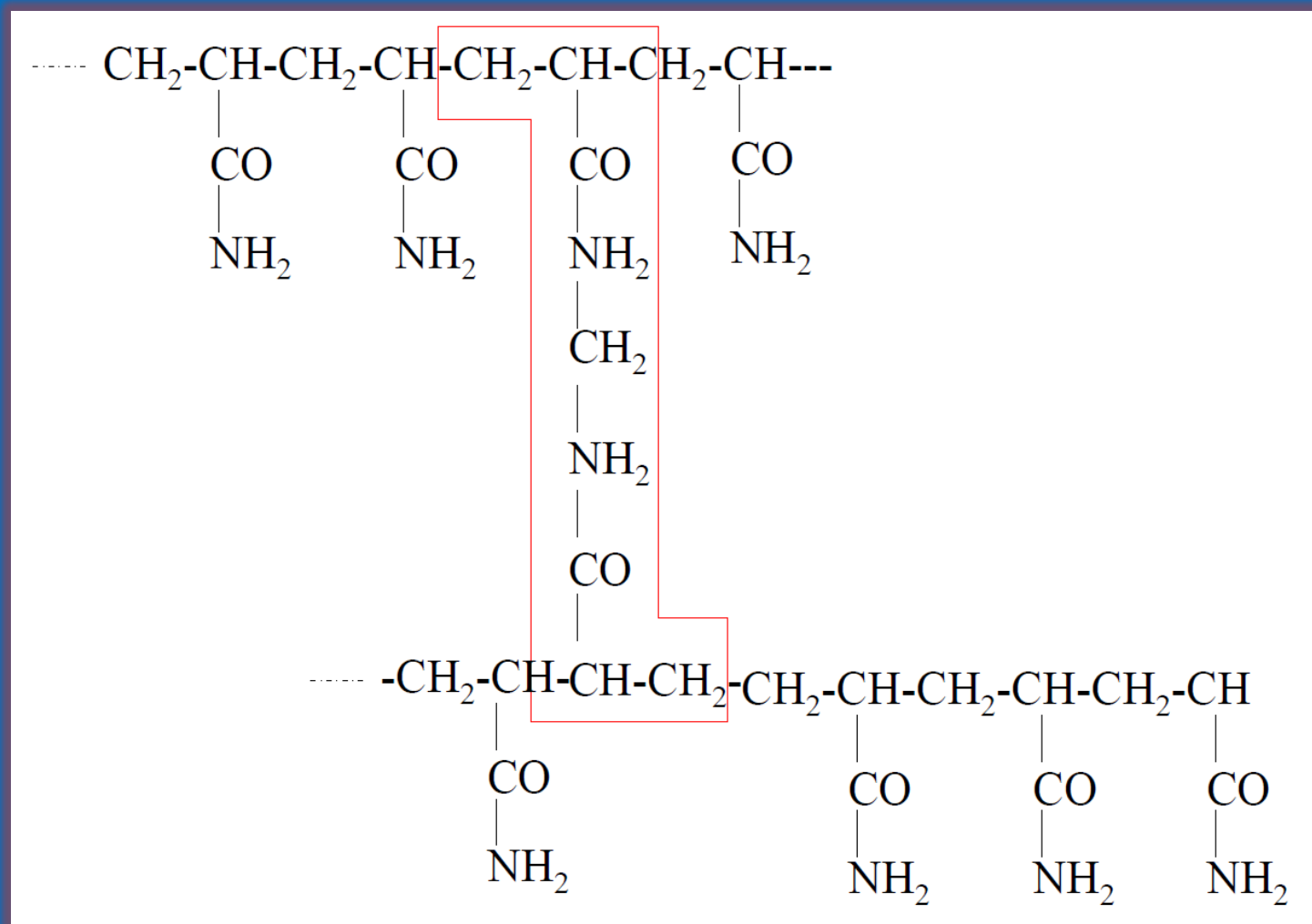
poliacrilamida



Bis-acrilamida



A concentração e a relação acrilamida:bis-acrilamida determinam o tamanho dos poros do gel



Como as proteínas migram num gel de poliacrilamida?

As propriedades que afetam a migração num gel de poliacrilamida:

1. Tamanho (massa molecular)
2. Carga (pI)

$$\text{Log } V = \text{Log } V_0 - kC$$

k = constante proporcional ao peso molecular
 C = concentração do gel

Migração no gel

Migração sem o gel

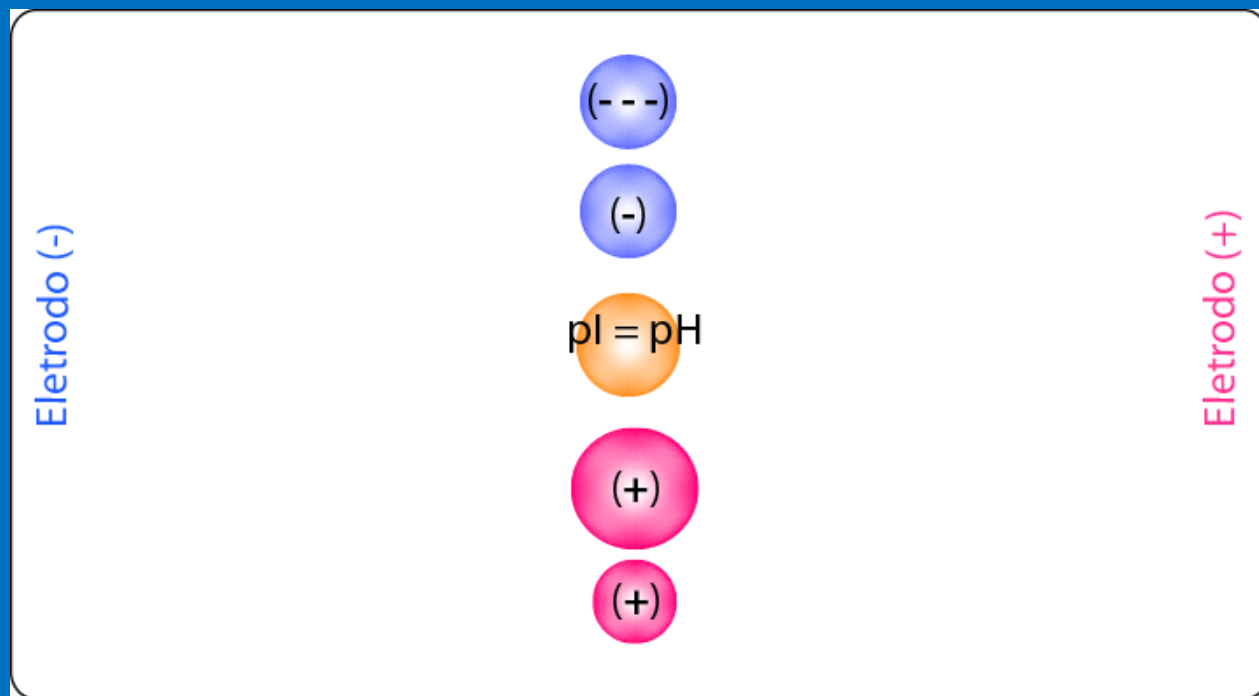
Porém, V é proporcional a carga (Z) e proteínas apresentam diferentes cargas...

Eletroforese de proteínas em condições nativas

Eletroforese em condições **não-desnaturantes** (nativas)



separação por carga e peso molecular (simultaneamente)

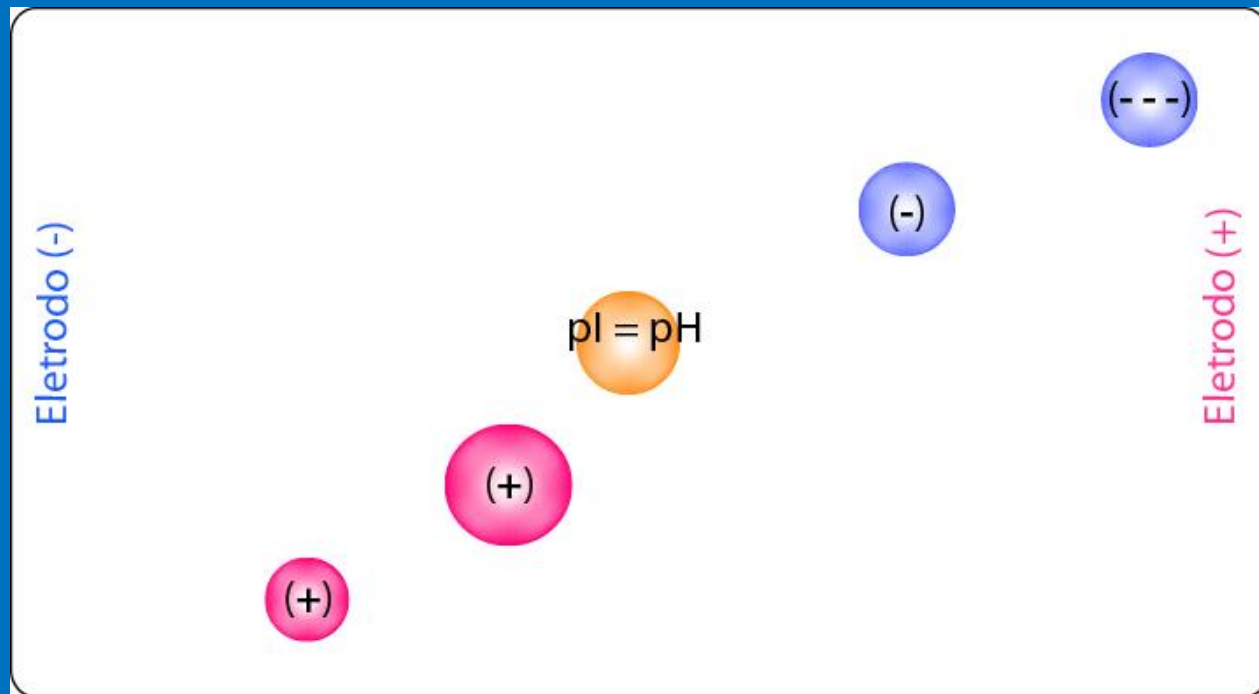


Eletroforese de proteínas em condições nativas: muitas variáveis...

Eletroforese em condições não-desnaturantes (nativas)

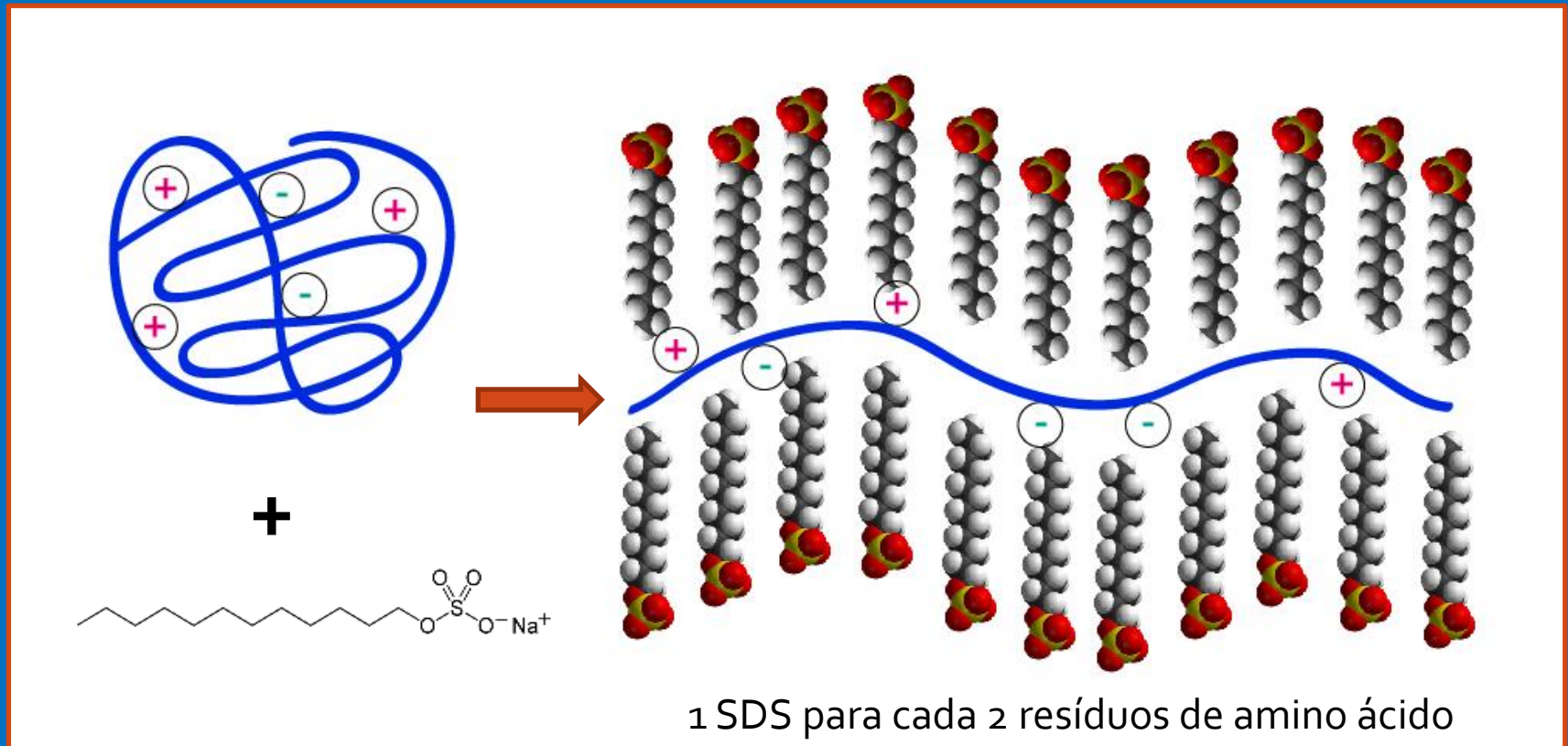


separação por carga e peso molecular (simultaneamente)

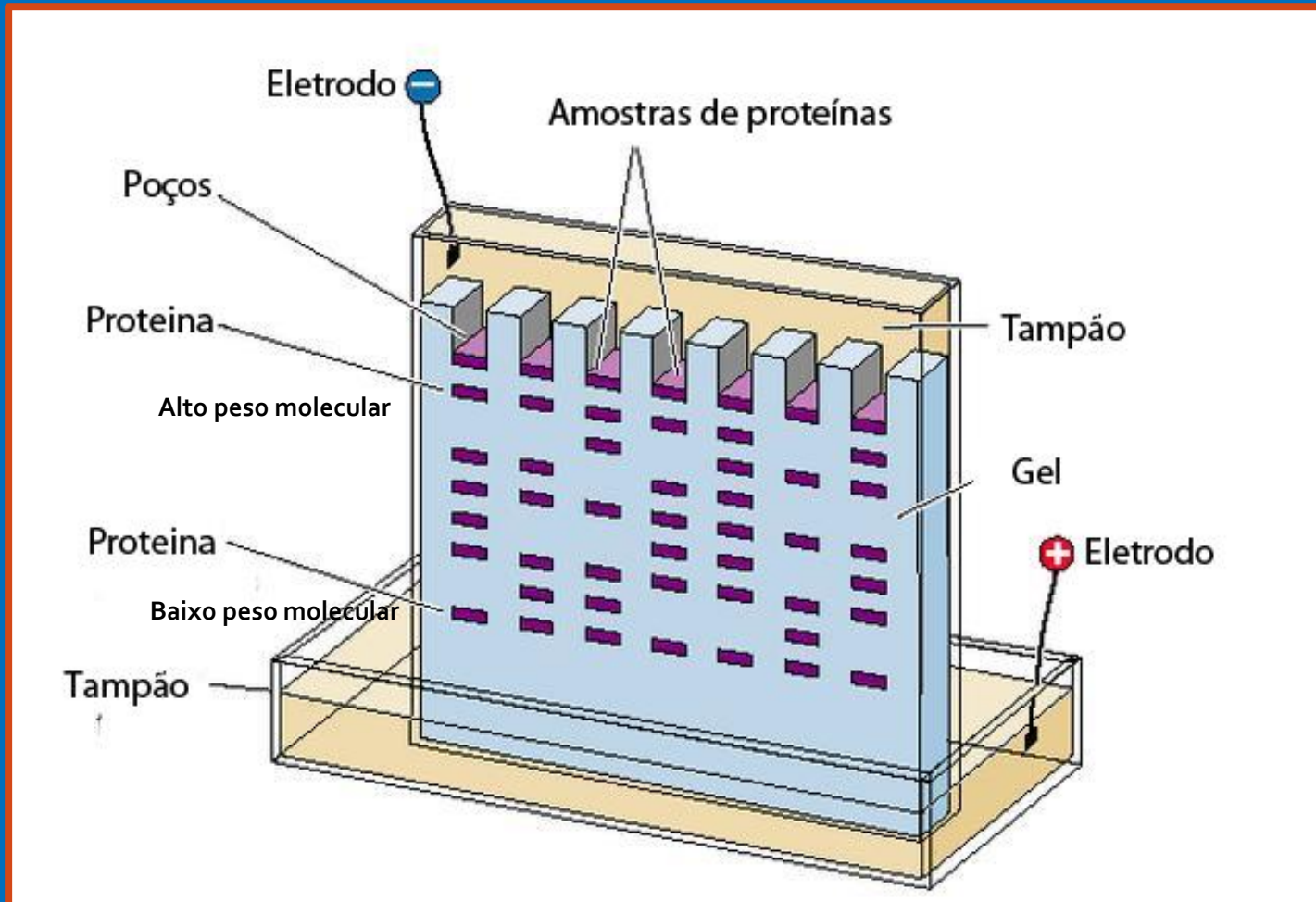


Eletroforese de proteínas em condições desnaturantes

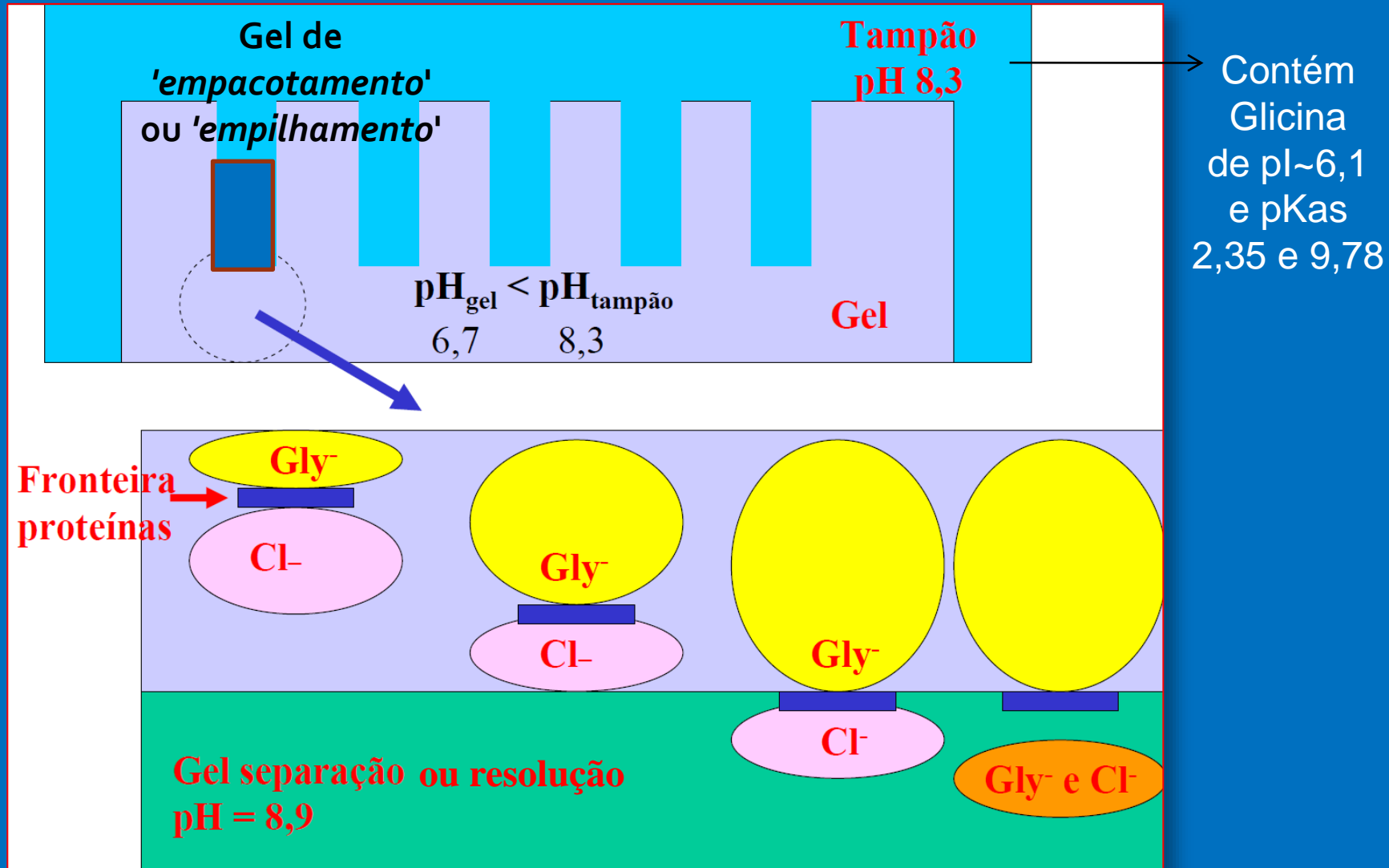
Proteínas desnaturadas com SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio) podem ter o mesmo V_o !



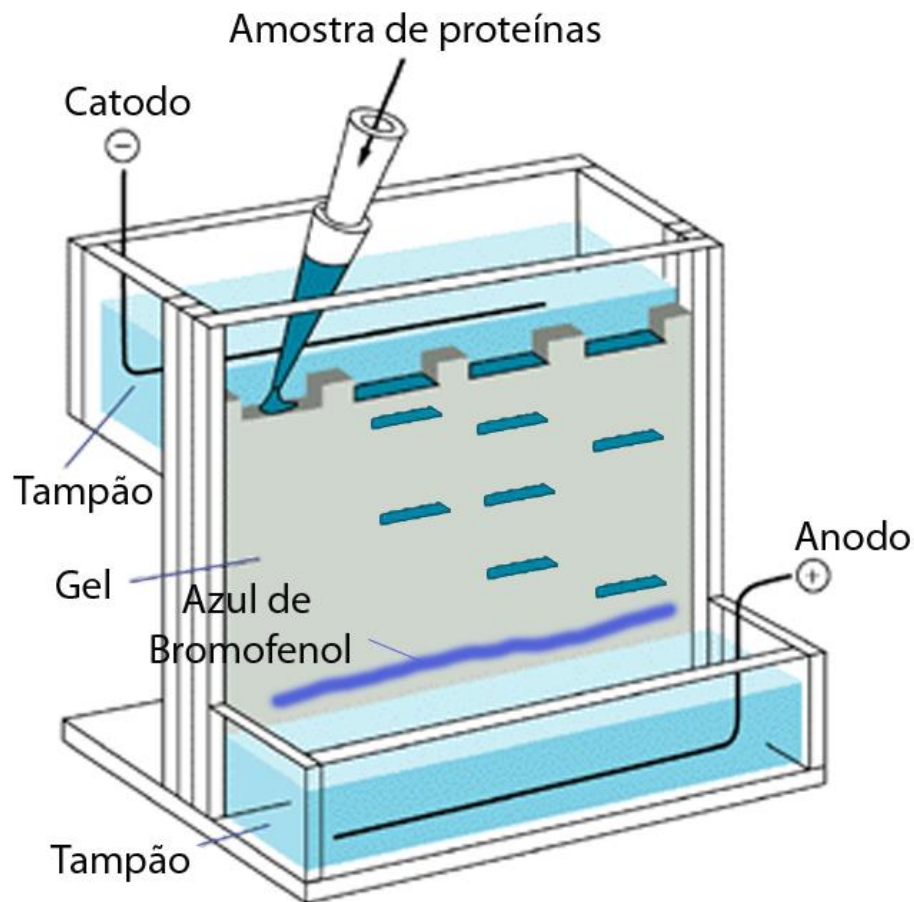
Eletoforese de proteínas em condições desnaturantes podem ser separadas em gel de poliacrilamida de acordo com o peso molecular



SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)



A migração das proteínas é proporcional ao peso molecular

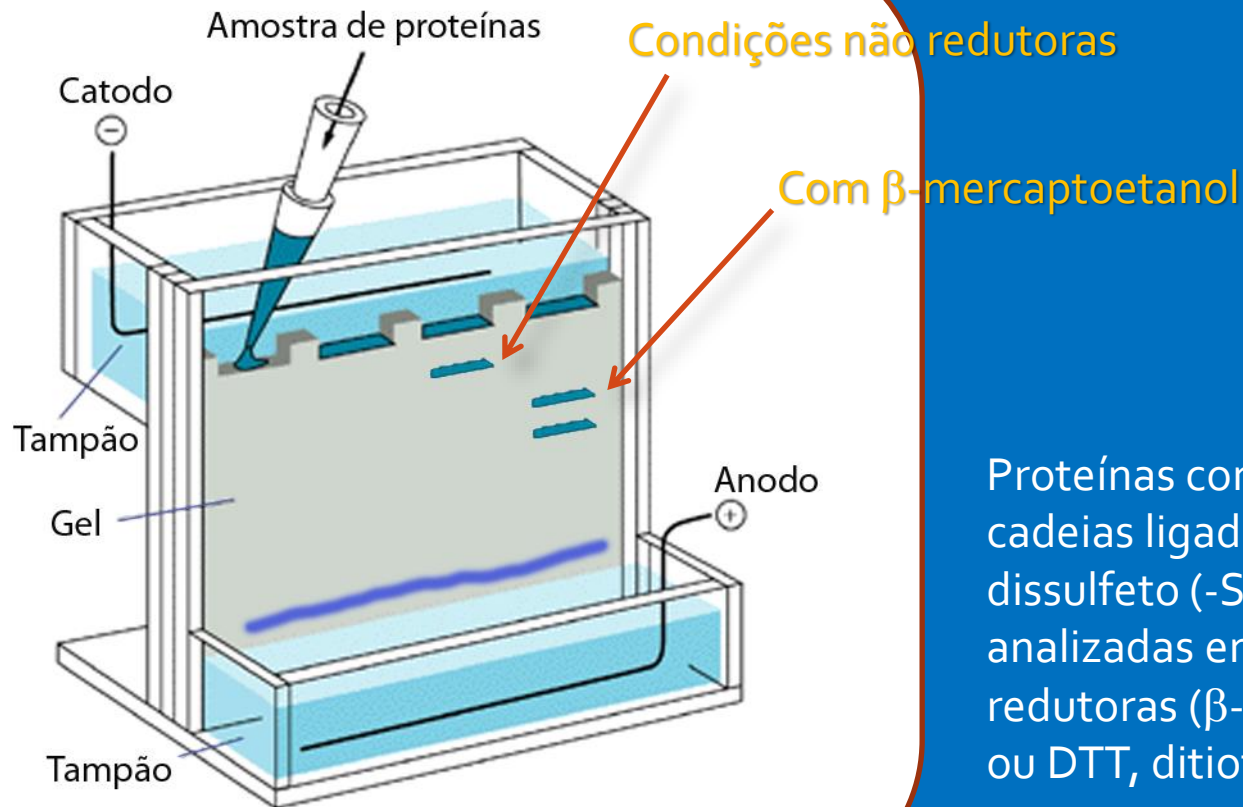


$$\text{Log } V = \text{Log } V_0 - kC$$

V_0 igual para todas as proteínas, portanto, $\text{Log } V$ é proporcional a massa da proteína

k = constante ~ peso molecular
 C = concentração do gel

Estrutura quaternária da proteína: quantas cadeias?

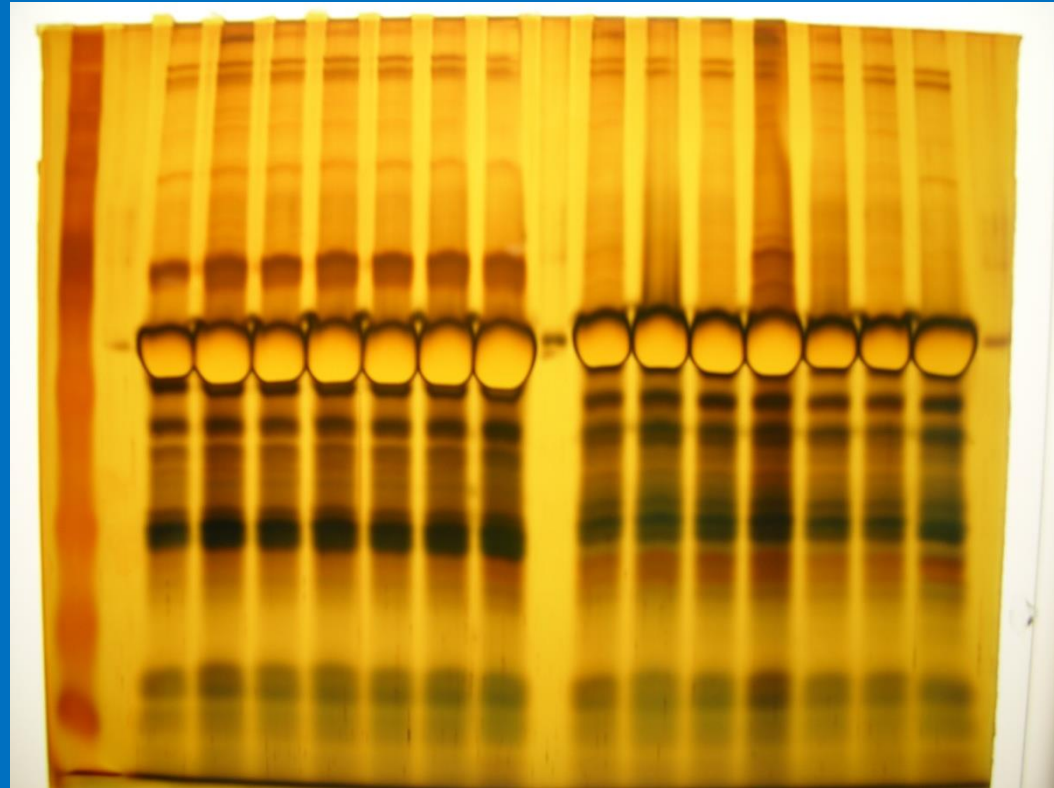


Proteínas contendo múltiplas cadeias ligadas por pontes de dissulfeto (-S-S-) podem ser analisadas em condições redutoras (β -mercaptoetanol ou DTT, ditioneitol).

As proteínas podem ser visualizadas com coomassie ou coloração com prata

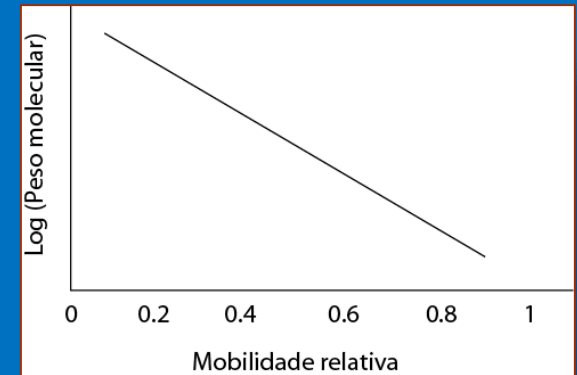
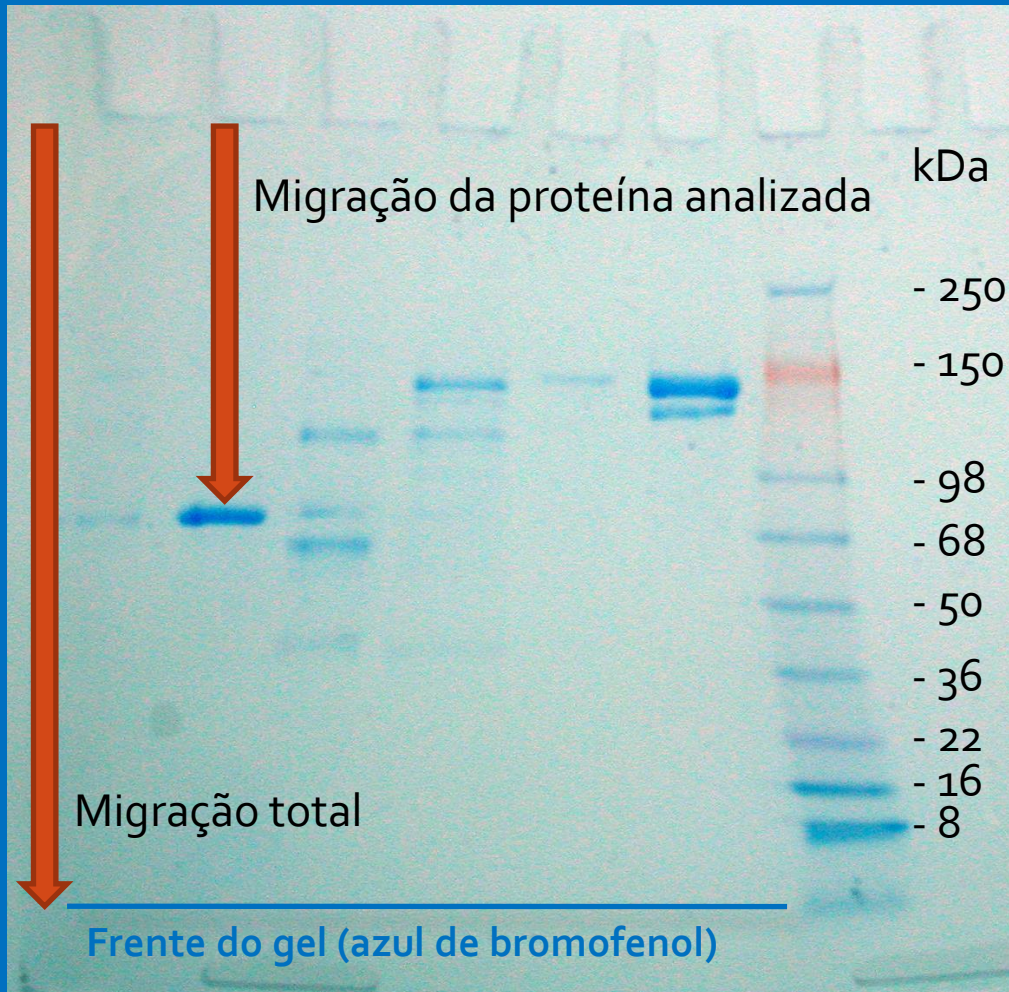


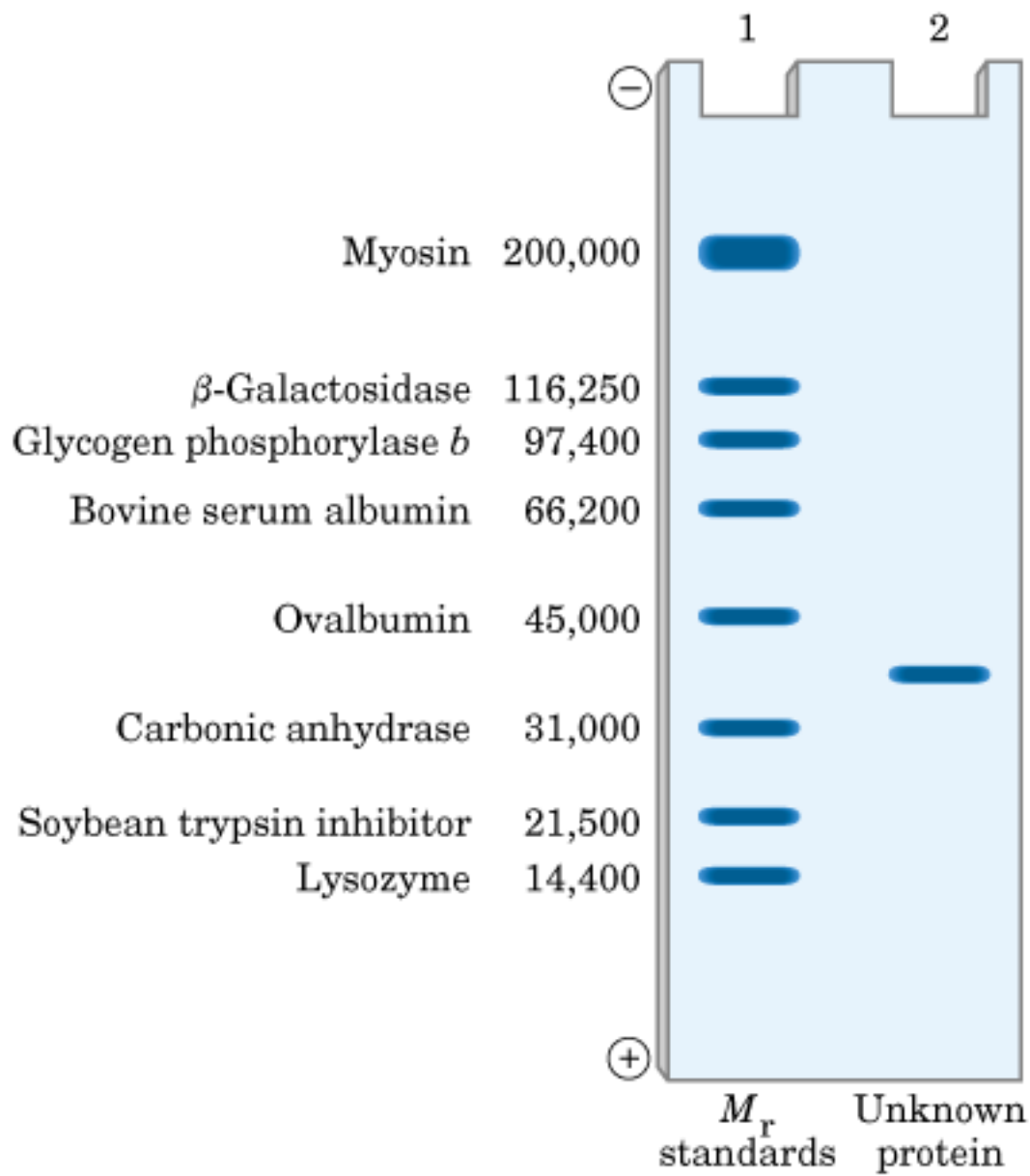
As proteínas são fixadas ao gel com metanol e coradas com coomassie R (reagente de Bradford).



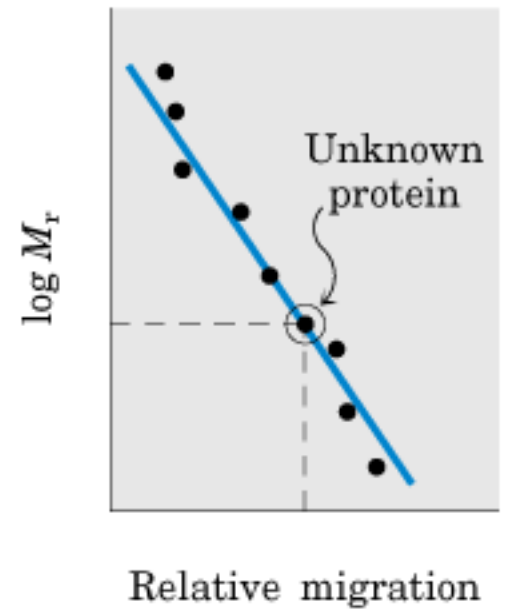
Íons de prata formam um complexo com proteínas e podem ser utilizados para coloração de géis.

Mobilidade relativa = migração proteína/migração total



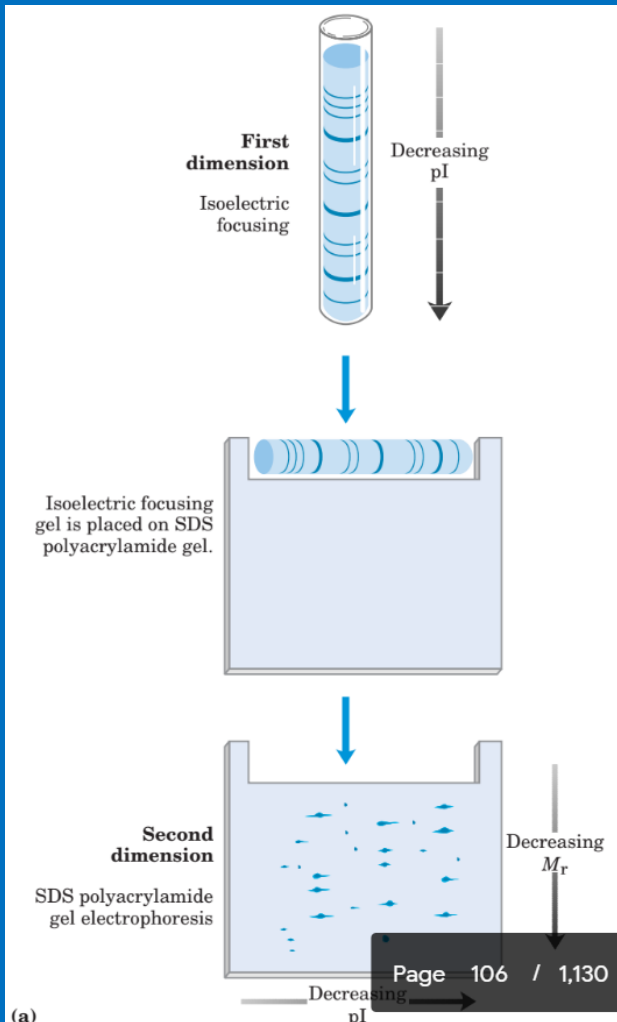


(a)



(b)

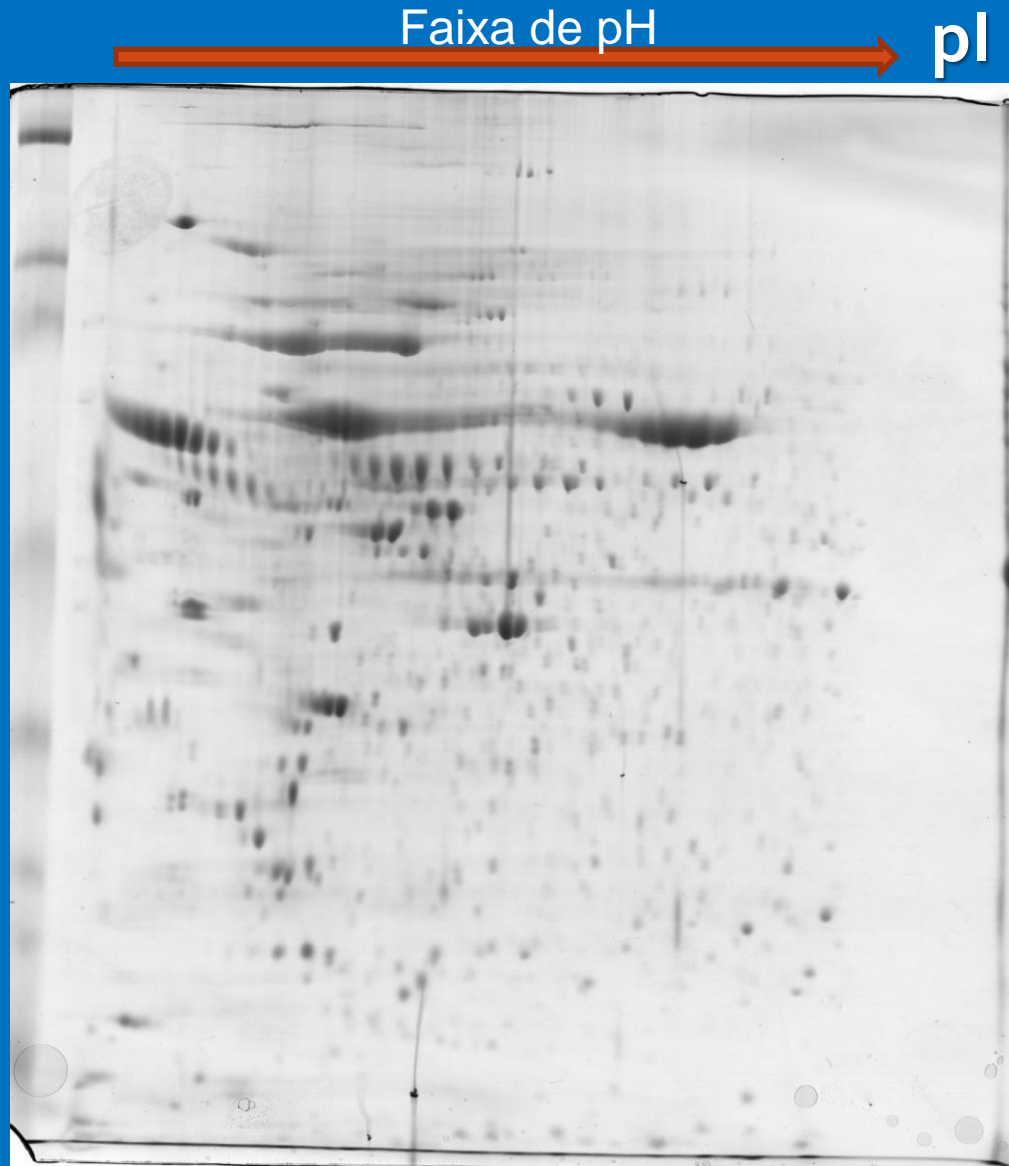
A revolução da proteômica: eletroforese bidimensional



(+)

(-)

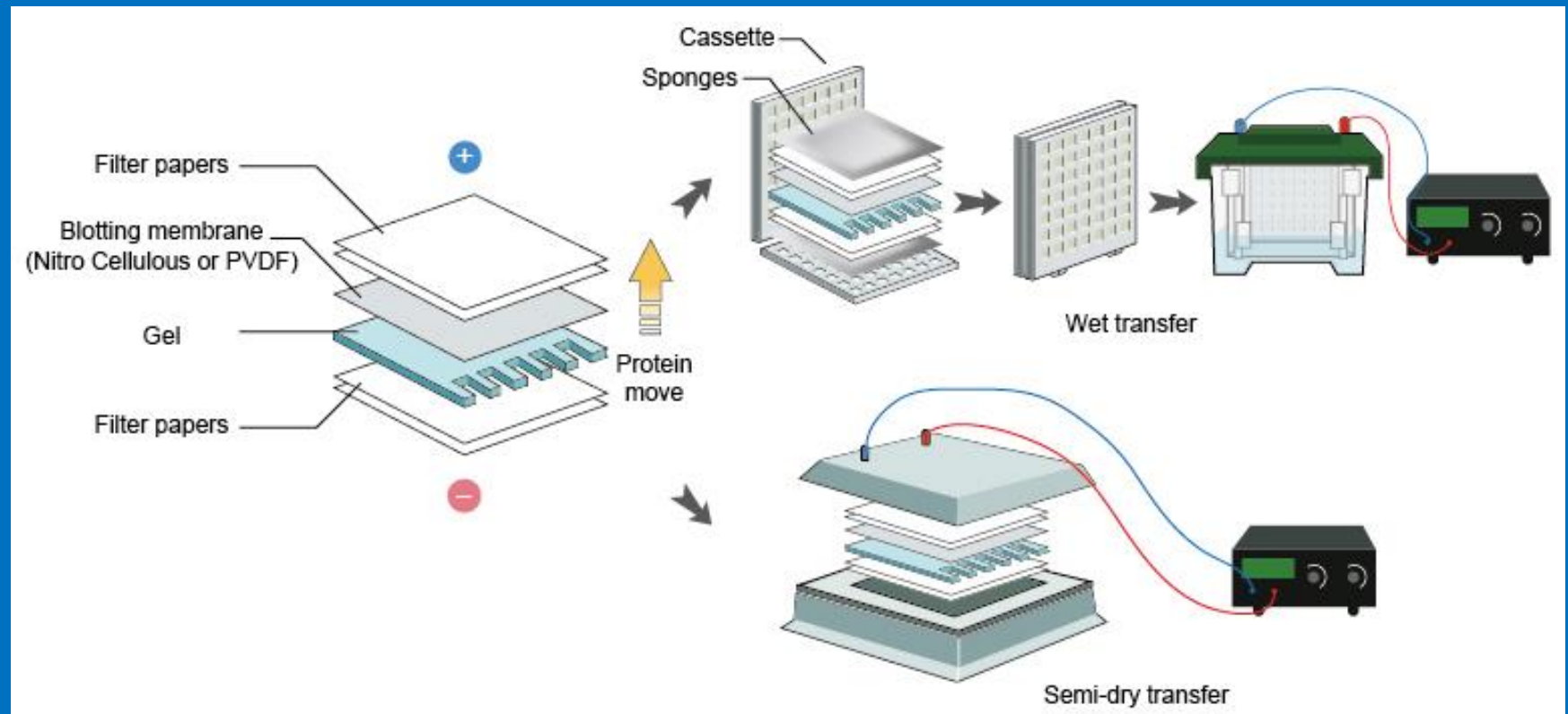
Peso molecular



Immunoblotting ou Western blotting

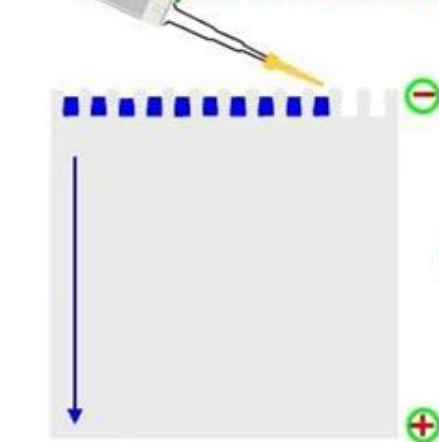
- O *western blot* (imunoblot de proteínas) é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas numa amostra de um homogenato de tecidos biológicos ou extratos. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas nativas pela sua estrutura tridimensional ou proteínas desnaturadas pelo comprimento da sua cadeia polipeptídica. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose ou PVDF), sendo esta a técnica de blotting ou transferência. Uma vez na membrana, são usados anticorpos específicos para a proteína alvo.

Immunoblotting ou Western blotting

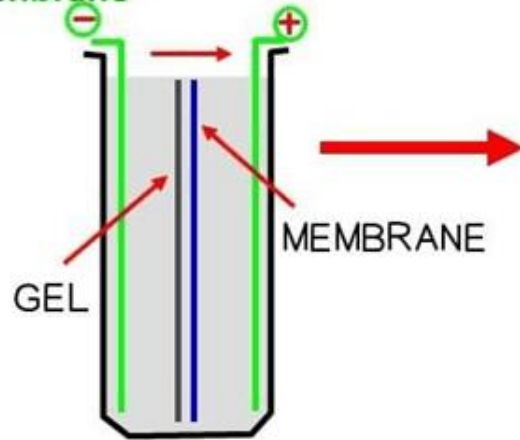


Western Blotting Procedure

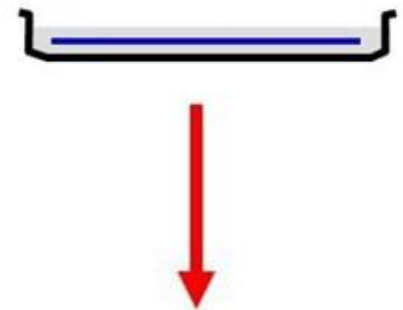
1. Load and separate protein samples on SDS-PAGE



2. Electrophoretically transfer fractionated proteins onto PVDF membrane



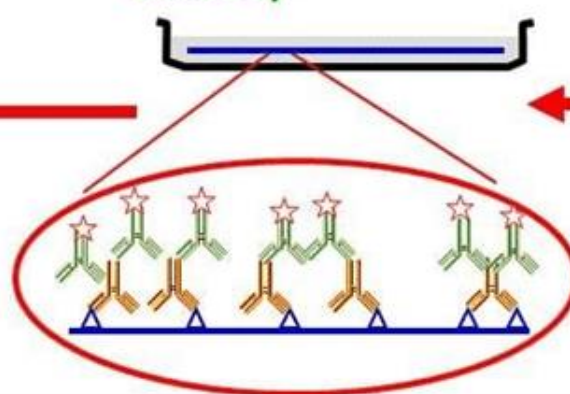
3. Block the membrane with neutral protein (BSA or milk casein)



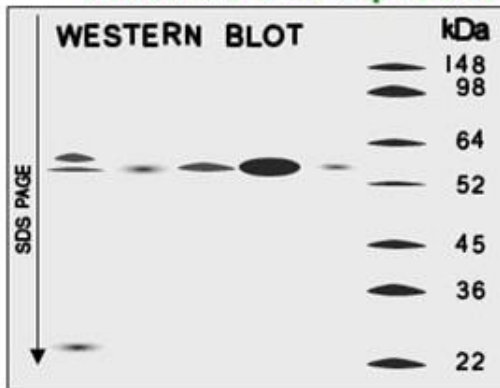
4. Incubate the membrane with primary antibody specific to target protein



5. Incubate the membrane with HRP-labeled secondary antibody specific to primary antibody



6. Incubate the blot with chemiluminescent HRP substrate and expose to film



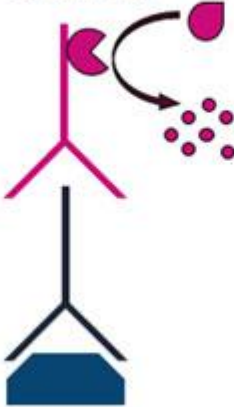
Detecção

Radioactive detection

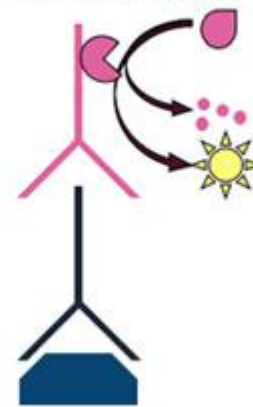


Enzymatic detection

Colorimetric



Chemiluminescent



Fluorescent detection

