

**Aula Prática 7: ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE**

A. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida- SDS (SDS-PAGE)

(Vide preparação do gel em anexo)

Analisaremos as amostras coletadas na aula anterior (antes e após a purificação) em SDS-PAGE, sendo:

- 1) Cultura bacteriana antes da indução da expressão;
- 2) Cultura bacteriana 16 h após a indução da expressão;
- 3) Extrato proteico solúvel da cultura bacteriana 16h após a indução da expressão;
- 4) Extrato proteico insolúvel da cultura bacteriana 16h após a indução da expressão;
- 5) Proteína purificada do extrato proteico.

- 1) Nas aulas anteriores, foram preparados 5 tubos contendo as amostras e o tampão da amostra (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 4% (m/v) de SDS; 20% (v/v) de glicerol; 1% (v/v) de β -mercaptoetanol; e 0,03 mM de azul de bromofenol). **Nesta aula**, ferva as amostras por 5 min.
- 2) Aplique as amostras no gel de poliacrilamida, o qual já está preparado na cuba e submerso em tampão adequado (25 mM de Tris-HCl; 250 mM de glicina; e 0,1% de SDS, pH 8,8).
- 3) Aplique uma diferença de potencial de 100 V por 15 min para as proteínas se empilharem, o que será visível pela formação de uma linha azul fina.
- 4) Após o empilhamento, aplique uma diferença de potencial de 120 V por aproximadamente 1h30min para as proteínas migrarem através do gel de separação.
- 5) Retire o gel da cuba e coloque-o, por 10 min sob agitação, em solução corante para as proteínas (0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R250 em 90 mL de metanol : água (1:1); e 10 mL ácido acético).
- 6) Retire o excesso do corante lavando com água. Aqueça o gel em água no microondas por 5 min para descoloração. Repita o procedimento de descoloração por mais 2 vezes (totalizando ~15 min de aquecimento no microondas).

B. Questões

- 1) Na eletroforese de proteínas, utiliza-se o gel de poliacrilamida. Como é formado este polímero e em que se baseia a separação das proteínas?
- 2) A técnica de SDS-PAGE (**SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis**) é rotina quando se deseja separar proteínas em função de sua massa. Como o SDS funciona?
- 3) Outro reagente comum, utilizado apenas no tampão da amostra, é o β -mercaptoetanol? Qual seu papel?
- 4) Qual a diferença entre o gel de empilhamento e o gel de separação?
- 5) Por que as amostras proteicas devem ser fervidas junto com tampão de amostra antes de serem aplicadas no gel?

ANEXO

Preparo do gel de poliacrilamida

➤ **Gel de separação: 15%**

- 2,44 mL de acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%
- 0,92 mL de 2 M de Tris-HCl pH 8,8
- 48,8 µL de SDS 10%
- 1,45 mL de água milli-Q
- 30 µL de persulfato de amônio 10%
- 5,6 µL de TEMED

O gel de separação foi adicionado entre as placas do aparato e, para retirar bolhas, 100 µL de água destilada foram adicionados sobre o gel. Após a polimerização, a água foi retirada e a superfície do gel de separação foi seca com papel filtro.

➤ **Gel de empilhamento (em cima do gel de separação): 3%**

- 200 µL de acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%
- 83,7 µL de 2 M de Tris-HCl pH 6,8
- 13,3 µL de SDS 10%
- 1,17 mL de água milli-Q
- 11,1 µL de persulfato de amônio 10%
- 2,2 µL de TEMED

O gel de empilhamento foi adicionado sobre o gel de polimerização e, logo em seguida, o pente para criar os poços de aplicação foi colocado. Após a polimerização, o pente foi retirado e o aparato contendo o gel foi submergido em tampão para corrida dentro de uma cuba para eletroforese de proteínas.