



Universidade Federal do ABC - UFABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas - CCNH
Bacharelado em Biotecnologia

NHZ6006-18

2026-Q1

Proteínas Recombinantes

APOSTILA DE AULAS PRÁTICAS

Prof. Dr. Sergio Daishi Sasaki
Prof. Dr. Tales Alexandre da Costa e Silva

Santo André
2026

Sumário

1.	CALENDÁRIO ACADÊMICO (2026/1).....	3
2.	CRONOGRAMA DAS AULAS PRÁTICAS	4
3.	SEGURANÇA E NORMAS DE TRABALHO NO LABORATÓRIO.....	5
4.	TIPO DE AVALIAÇÃO – ENTREGA DOS RELATÓRIOS	6
5.	ROTEIRO PARA ELABORAÇÃO DOS RELATÓRIOS DA AULA PRÁTICA.....	6
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
	AULA 1 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E GRAU DE PUREZA DE DNA	9
	AULA 2 - ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	11
	AULA 3 – TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES.....	1
	AULA 4 - CONTAGEM DE CÉLULAS TRANSFORMANTES E PCR DE COLÔNIAS	5
	AULA 5 - AVALIAÇÃO DA PCR DE COLÔNIAS POR GEL DE AGAROSE E INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS PARA MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL.	7
	AULA 6 - MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL (EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL).....	10
	AULA 7 – INOCULAÇÃO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	12
	AULA 8A – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS POR MEIO DO SDS-PAGE	13
	AULA 8B – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS POR MEIO DO SDS-PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLICRIAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO)	16

1. CALENDÁRIO ACADÊMICO (ANO / QUADRIMESTRE) – 2026-1

1º quadrimestre 2026	FEVEREIRO							
	Dom	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	
	1	2	3	4	5	6	7	1
	8	9	10	11	12	13	14	2
	15	16	17	18	19	20	21	3
	22	23	24	25	26	27	28	4
	14 a 18 - Carnaval							
	MARÇO							
	Dom	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	
	1	2	3	4	5	6	7	5
	8	9	10	11	12	13	14	6
	15	16	17	18	19	20	21	7
	22	23	24	25	26	27	28	8
	29	30	31					9
	ABRIL							
	Dom	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	
				1	2	3	4	9
	5	6	7	8	9	10	11	10
	12	13	14	15	16	17	18	11
	19	20	21	22	23	24	25	12
	26	27	28	29	30			
	03 - Paixão de Cristo							
	08 - Feriado municipal em SA e recesso em SBC							
	21 - Tiradentes							
	MAIO							
	Dom	Seg	Ter	Qua	Qui	Sex	Sab	
						1	2	
	3	4	5	6	7	8	9	
	10	11	12	13	14	15	16	
	17	18	19	20	21	22	23	

2 Início do quadrimestre
 Dias letivos
 Feriados

Dias letivos

Dias letivos
 Feriados
 Reposição de feriados

2. CRONOGRAMA DAS AULAS PRÁTICAS

Data	Práticas as sextas-feiras Campus S.A. Bloco A Laboratório L404-3
06/02/26	Aula 1 - Determinação da concentração e grau de pureza de DNA
13/02/26	Aula 2 - Eletroforese de DNA em gel de agarose
20/02/26	Aula 3 – Transformação de bactérias competentes Entrega dos relatórios das práticas: 1 e 2.
27/02/26	Aula 4 - Contagem de células transformantes e PCR de colônias.
06/03/26	Aula 5 – Avaliação da PCR de colônias e inoculação para minipreparação plasmidial.
13/03/26	Aula 6 - Minipreparação plasmidial
20/03/26	Aula 7 - Inoculação para expressão de proteínas. Entrega dos relatórios das práticas: 3 a 6.
27/03/26	Aula 8A - Preparo de SDS-PAGE e da amostra de expressão.
10/04/26	Aula 8B – SDS-PAGE corrida e coloração
17/04/26	Entrega dos relatórios das práticas: 7 e 8.

3. SEGURANÇA E NORMAS DE TRABALHO NO LABORATÓRIO

Leia integralmente o *Guia de Segurança, Experimentos e Atividades (3ªed.)* da disciplina de Base Experimental das Ciências Naturais.

Destacamos:

A. Segurança nos Laboratórios:

- Conheça a localização dos chuveiros de emergência, extintores e lavadores de olhos.
- Use sempre avental, mantenha os cabelos presos e use calçados fechados, mesmo na aula reservada para o preparo da prática seguinte;
- Os óculos são obrigatórios!
- Usar a capela sempre que possível;
- Nunca pipete com a boca, não cheire, nem experimente os produtos químicos;
- Coma e beba, só fora do laboratório;
- Consulte o professor cada vez que notar algo anormal ou imprevisto;
- Comunique qualquer acidente, por menor que seja ao professor;
- Se utilizar chama, mantenha longe de qualquer reagente!
- Nunca brinque no laboratório;
- Evite o contato de qualquer substância com a pele;
- Nunca aqueça o tubo de ensaio, apontando a extremidade aberta para um colega ou para si mesmo.
- Cuidado ao aquecer vidro em chama: o vidro quente tem exatamente a mesma aparência do frio.

B. Procedimentos gerais:

- Siga rigorosamente as instruções fornecidas pelo professor.
- Pesquise sempre a toxicidade dos reagentes antes das práticas.
- Nunca abra um recipiente de reagente antes de ler o rótulo.
- Evite contaminar reagentes, nunca retorne o excedente aos frascos de origem.
- Adicione sempre ácidos à água, nunca água a ácidos.
- Não coloque nenhum material sólido dentro da pia ou nos ralos.
- Não coloque resíduos de solventes na pia ou ralo; há recipientes apropriados para isso.
- Não atire vidro quebrado no lixo comum. **Deve haver um recipiente específico para fragmentos de vidro.**
- Verifique se as conexões e ligações estão seguras antes de iniciar uma reação/destilação
- Ao terminar a prática, lave o material utilizado e deixe-o em ordem.

4. TIPO DE AVALIAÇÃO – ENTREGA DOS RELATÓRIOS

Não haverá prova prática, porém a prova poderá conter conteúdo abordado em sala nas práticas. A avaliação será realizada pela entrega dos relatórios (Ver item 5), a seguir, quanto a elaboração dos relatórios). Cada grupo será responsável por imprimir o roteiro, realizar a aula proposta, responder às questões sugeridas e entregar os respectivos relatórios. A entrega deve ser feita em grupos sendo 01 (um relatório por grupo), contendo o nome completo e RA de cada um dos integrantes do grupo. Máximo de 5 alunos por grupo. **Os relatórios deverão ser entregues na data estipulada pelo professor via email ou Moodle.**

5. ROTEIRO PARA ELABORAÇÃO DOS RELATÓRIOS DA AULA PRÁTICA

A. Estrutura do relatório

O relatório deve ser apresentado em papel branco, formato A4 (21 cm x 29,7 cm), digitados na cor preta, utilizando fonte **Times New Roman ou Arial**, **tamanho 12**, com **espaçamento entre linhas de 1,5**, no formato **Justificado**. As **legendas das Figuras e Tabelas** devem ser escritas usando a mesma fonte do texto, **tamanho 10**, **espaçamento simples e centralizados**.

As folhas devem apresentar margens esquerda e superior de 3 cm; direita e inferior de 2 cm. Todas as folhas do relatório devem ser numeradas sequencialmente, levando em consideração a Capa e o número de páginas do Sumário, contudo, estes não devem ter numeração. A numeração iniciará na Introdução.

O trabalho deve conter no **máximo 5 páginas enumeradas**. O trabalho deverá ser entregue impresso e apresentar a seguinte estrutura:

1.1 CAPA

1.2 INTRODUÇÃO

1.3 OBJETIVOS

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.6 CONCLUSÕES

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

➤ **CAPA**

Elemento obrigatório, sobre a qual se imprimem as informações indispensáveis à sua identificação (Nome e RA dos componentes do grupo). As informações são transcritas na seguinte ordem:

- nome da instituição e da disciplina;
- nomes completos dos alunos e RA;
- título da aula prática: em letras maiúsculas
- data da aula prática.

➤ **INTRODUÇÃO**

Parte inicial do texto, que contém a delimitação do assunto tratado e outros elementos necessários para apresentar o tema do relatório. Todo texto que for utilizado na introdução que vier de alguma obra tais como: normas, livros, artigos e notas de aula, devem ser citados no texto e registrado na referência bibliográfica. A citação pode também ser na forma de numeração, entretanto, é esta numeração que deve constar no capítulo de referências.

➤ **OBJETIVOS**

Descrever os objetivos da aula prática realizada.

➤ **MATERIAL E MÉTODOS**

Deverá abordar os materiais utilizados nas aulas práticas, bem como, os equipamentos.

➤ **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os resultados deverão ser apresentados na forma de *tabelas*, *gráficos* e *imagem*, quando for o caso, seguida de discussão técnica e crítica sobre os mesmos.

➤ **CONCLUSÕES**

Expor as conclusões diante dos resultados obtidos e esperados durante o experimento realizado e responder as questões. Trata-se de uma síntese conclusiva do que foi obtido em resultados e discussões.

➤ **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Elemento obrigatório, que consiste na relação das obras consultadas e citadas no texto, de maneira que permita a identificação individual de cada uma delas. As referências devem ser organizadas conforme aparecem no texto e utilizando o sistema numérico de chamada ou em ordem alfabética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Para as atividades teóricas e práticas da disciplina

Fundamentos teóricos e detalhes experimentais

1. David Nelson and Micheal Cox, Lehninger Principios de Bioquímica, (2014).6 edição, W. H. Freeman and Company
2. Donald Voet and Judith G. Voet, Bioquímica (2010), 4 edição, Wiley
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. & Walter P. (2015). Biologia Molecular da Célula. 6a Ed. Artmed P. Alegre. 1396p.
4. Lodish HF, Berk A, Kaiser CA. (2008). Molecular Cell Biology. 6a. Ed. W. H. Freeman. 1150p.
5. Cooper GM, Hausman RE. (2006). A Célula. Uma abordagem molecular. 3a. Ed. Artmed. 736p.
6. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (Pags.: E5)
7. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: A.3D.1-A.3D.3)

Informações técnicas (propriedades físicas, toxicidade, preço, nomenclatura)

1. CRC Handbook of Chemistry and Physics
2. Aldrich Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment
3. IUPAC Gold Book - <http://goldbook.iupac.org/>

Bases de Dados/Referências

1. The Web os Science (www.isiknowledge.com)
2. NCBI National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
3. SciELO - Scientific Electronic Library Online (www.scielo.org)
4. PubMed - (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)

AULA 1 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E GRAU DE PUREZA DE DNA

1. INTRODUÇÃO

O método mais usado para a determinação do grau de pureza de DNA é o método espectrofotométrico. Uma vez determinado o grau de pureza da amostra, a concentração pode ser avaliada também por espectrofotometria, no caso de amostras puras, ou por intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo, se a amostra estiver contaminada com as impurezas habituais resultantes dos protocolos de extração: proteínas, fenol, agarose e RNA.

Na análise espectrofotométrica, a absorvância a 260 nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos, sendo a seguinte a proporcionalidade:

ABSORVÂNCIA	EQUIVALÊNCIA
260 nm	~50µg/mL dsDNA
	~37µg/mL ssDNA
	~40µg/mL ssRNA
	~20µg/mL oligonucleótidos em cadeia simples

Para a determinação do grau de pureza, faz-se a leitura da absorvância a 280 nm que é proporcional à quantidade de proteínas e fenol e a 320 nm que é proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes". O grau de pureza é frequentemente calculado através da relação A_{260}/A_{280} que deve ser entre 1,8 e 2,0. Para valores inferiores a 1,8, considera-se a amostra contaminada com proteína e fenol.

Em amostras contaminadas ou muito diluídas (<250ng DNA/mL) a concentração é determinada por emissão de fluorescência por intercalação selectiva de brometo de etídeo. Este método pode ser realizado em simultâneo com a análise da amostra por eletroforese, bastando usar um padrão conveniente, aparelhagem de leitura de fluorescência em géis e "software" de tratamento de imagem.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 1 - Ligar o espectrofotômetro e regular para 260 nm.
- 2 - Fazer o zero de absorvância com 1ml de água ultra-pura em cubeta de quartzo.
- 3 - Em um tubo de 1,5 mL preparar a amostra que será quantificada, adicionar 998 µL de água ultra-pura e, depois, 2 µL do DNA a quantificar (diluição de 500 x). Tapar o tubo e inverter várias vezes para misturar.
- 4 - Transferir a amostra diluída para a cubeta e realizar a leitura a 260 nm, 280 nm e 320 nm, se o aparelho permitir.
- 5 - Caso o aparelho não permita realizar as leituras simultaneamente repetir as leituras a 280 nm e 320 nm.

Significado e conversão para concentração das leituras de absorvância de amostras de ácidos nucleicos.

Absorbância	Significado	Equivalências e intervalo de confiança
A_{260}	Proporcional à concentração de ácidos nucleicos	$A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 50\mu\text{g/ml dsDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 37\mu\text{g/ml ssDNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 40\mu\text{g/ml ssRNA}$ $A_{260}=1 \Leftrightarrow \sim 20\mu\text{g/ml de oligonucleótidos em cadeia simples}$
A_{280}	Proporcional à concentração de fenol e proteínas	$1,8 < A_{260}/A_{280} < 2$; corresponde a DNA ou RNA puros
A_{320}	Proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes"	

3. Material necessário por grupo:

- 1 – Cubeta de quartzo.
- 2 – Tubos eppendorf.
- 3 – Estante para tubo eppendorf.
- 4 – Kit de pipetadores e ponteiras.

4. Equipamento necessário:

- 1 – Espectrofotômetro UV.

5. Exercícios:

- 1 – Determine a concentração das amostras de DNA fornecidas e a relação A_{260}/A_{280}
- 2 – Discutir em grupo que amostra está mais concentrada e qual a mais “pura”.

6. Referências

1. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (Pages: E5)
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pages: A.3D.1-A.3D.3)

AULA 2 - ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

1. INTRODUÇÃO

A eletroforese de DNA consiste na separação de diferentes fragmentos de DNA de acordo com as suas diferentes mobilidades num campo elétrico. A eletroforese pode ser analítica, tendo como objetivo a análise de determinada amostra de DNA, por identificação de fragmentos constituintes, quantificação e determinação do peso molecular. Por outro lado, a eletroforese pode ser preparativa quando o objetivo é a separação e purificação de determinada fração ou fragmento que façam parte de uma amostra.

Num campo elétrico, definido pela diferença de potencial em Volts e pela distância entre os eletrodos em centímetros (V/cm), as moléculas de DNA migram para o eletrodo positivo devido às cargas negativas dos grupos fosfato. Esta migração é retardada pelo atrito das moléculas com o suporte da eletroforese.

Como a relação carga/massa é igual para diferentes fragmentos de DNA, o parâmetro principal a condicionar a migração de DNA numa mesma eletroforese é a dimensão dos fragmentos.

Para o planeamento de uma eletroforese é preciso ter em conta todos os fatores que influenciam a migração de DNA de modo a aproveitar melhor possível as potencialidades desta técnica, dentre estes destacam-se:

A. Peso molecular

Fragmentos lineares de DNA em cadeia dupla migram através duma matriz de gel a velocidades inversamente proporcionais ao $\log_{10}$ do número de pares de bases devido a um maior atrito com a matriz com o aumento do tamanho.

B. Concentração da agarose

Pelas mesmas razões da influência do peso molecular na mobilidade, o aumento da concentração da agarose leva ao retardamento da migração eletroforética. A linearidade entre migração X peso molecular é, também, alterada pelo que se deve adaptar este parâmetro à gama de tamanhos de fragmentos que se pretende resolver.

C. Conformação do DNA

Consideram-se três conformações do DNA: forma I é o DNA circular fechado (cccDNA ou "covalently closed circular DNA"); forma II é o DNA circular com uma quebra numa ligação fosfodiéster ("nicked"); forma III é o DNA linear em cadeia dupla (dsDNA ou "double stranded DNA"). Duma maneira geral, sob condições usuais, cccDNA migra mais rapidamente do que fragmentos do mesmo tamanho de dsDNA porque a conformação circular tem menor raio hidrodinâmico devido aos super-enrolamentos.

Na forma II, os enrolamentos desaparecem por causa da quebra duma ligação fosfodiéster o que faz com que seja a forma mais lenta em eletroforese.

D. Voltagem aplicada

Em voltagens mais elevadas os fragmentos maiores tendem a migrar a velocidades maiores do que as previstas na relação linear migração X peso molecular. Assim, as eletroforeses destinadas à separação de fragmentos de elevado peso molecular devem ser feitas a voltagens inferiores.

E. Composição do tampão de eletroforese

Os tampões mais usados neste tipo de eletroforese são o tris/acetato (TAE) e o tris/borato (TBE). O TBE tem maior capacidade tamponante, no entanto, deve ser evitado em eletroforeses preparativas com purificação de DNA a partir de géis de agarose.

F. Presença de brometo de etídeo

O brometo de etídeo tem a propriedade de se intercalar entre pares de bases do DNA, conferindo maior rigidez e comprimento à molécula. Isto faz com que a migração das formas de DNA II e III seja menor. Quanto ao cccDNA, a intercalação de brometo de etídeo introduz enrolamentos positivos, diminuindo o número de enrolamentos negativos que existem espontaneamente. Isto faz com que a migração seja menor porque a molécula aumenta o seu raio hidrodinâmico. No entanto, com o aumento da concentração de brometo de etídeo e após adquirir o estado de ausência de enrolamentos, a molécula começa a diminuir o raio hidrodinâmico porque aumentam os enrolamentos, desta vez, no sentido positivo. Assim, a migração passa a ser mais rápida.

Para a visualização do DNA, após a corrida, usa-se o brometo de etídeo como corante específico do DNA porque tem a capacidade de se intercalar entre pares de bases. Sob radiação ultra-violeta, o brometo de etídeo emite fluorescência, surgindo corado apenas o DNA. Este corante pode ser incorporado no tampão com a vantagem de se poder parar a corrida, verificar se a migração foi ou não suficiente, e, se necessário, continuar a eletroforese. No entanto, por razões de segurança, pode-se corar o gel apenas no fim da corrida. Para este caso é particularmente conveniente a adição de um corante (azul de bromofenol ou xileno de cianol) às amostras para uma avaliação correta da migração: o xileno de cianol migra juntamente com fragmentos de ~5Kb enquanto que o azul de bromofenol migra juntamente com fragmentos de ~0,5Kb. Outros intercalantes de DNA têm sido comercializados para substituição do brometo de etídeo, em nossa aula utilizaremos o SYBR Safe. Este reagente é uma molécula de cianina desenvolvida como corante de ácido nucléico em biologia molecular. O SYBR Safe se liga ao DNA. O complexo corante e DNA quando iluminado com luz UV ou luz azul, absorve luz e emite luz verde visível.

Com o recurso à eletroforese, podem-se separar fragmentos de DNA desde 5bp até 10.000 Kb. Fragmentos de 5bp até 500bp são bem separados com géis de poliacrilamida que têm a capacidade de distinguir fragmentos que diferem em apenas um par de bases.

Os géis de agarose (ágar purificado) são utilizados para fragmentos de 100 bp até 50Kb,

desde que se adapte a concentração de agarose à dimensão dos fragmentos a separar. Para fragmentos de dimensões superiores a 50 Kb, recorre-se a técnicas de eletroforese em campo pulsado: FIGE - "fieldinversion gel electrophoresis" e CHEF - "contour-clamped homogeneous field electrophoresis".

Nestes tipos de eletroforese, há aplicação alternada de campos elétricos com sentidos e/ou direções diferentes de modo a provocar a contração e extensão das longas moléculas de DNA a separar durante a migração para o pólo positivo, fazendo com que estas tenham um movimento denominado reptação.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. Preparação do gel de agarose:

1 – Preparar uma solução de agarose em tampão TAE com concentração final de 1,0% (p/v). Aquecer a mistura em microondas, com agitação frequente, até toda a agarose se ter dissolvida.

2 – Quando o gel estiver mais ou menos a 50 °C, temperatura suportável, adicionar o reagente SYBR safe, de modo a diluir 10000x, para 50 mL de gel usar 5 uL.

3 - Colocar a forma do gel de eletroforese no respectivo suporte de preparação do gel, ou na cuba de eletroforese. Colocar o pente em posição conveniente na forma para um correto posicionamento dos poços: distância à extremidade e à base do gel.

4 - Verter a agarose dissolvida na forma até uma altura de ~5mm. Eliminar bolhas de ar que se tenham formado, aspirando com uma micropipeta e deixar solidificar à temperatura ambiente.

5 - Quando o gel se tiver formado, retirar lentamente o pente para não danificar os poços, colocar o gel com a forma na cuba de eletroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eletrodo negativo, e adicionar tampão TAE até ~1mm acima do gel.

B. Preparação das amostras:

6 - Para cada amostra, misturar num microtubo:

- 100-500 ng de DNA
- 4 µl de tampão de amostra (5x conc.)
- água ultra-pura q.s.p. 20 µl

7 - Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos.

8 - Colocar a tampa da cuba. Verificar que as amostras estão colocadas do lado do polo negativo (eletrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do polo positivo (eletrodo de cor vermelha).

9 - Ligar os cabos à fonte de eletricidade. Ligar a fonte e regular para uma voltagem de 1-

5V/cm (distância medida entre os eletrodos). Verificar se há desprendimento de bolhas dos eletrodos devido à eletrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correto.

10 - Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente elétrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. 11 - Examinar o gel à radiação ultra-violeta e fotografar para arquivar.

As amostras serão fornecidas pelo docente da disciplina.

3. Material necessário por grupo:

- 1 – Kit Pipetadores e ponteiros diversas
- 2 – Tampão de amostra.
- 3 – Água deionizada autoclavada (alíquota de 1mL)
- 4 – Tampão TAE
- 5 – Agarose
- 6 – SYBR safe
- 7 – Amostra – fornecida pelo docente.

4. Equipamentos

- 1 – Microondas
- 2 – Cuba de eletroforese horizontal (gel de agarose de DNA)
- 3 – Fonte da cuba de eletroforese
- 4 – Fotodocumentador UV.

5. Meios de cultura e soluções, previamente preparadas

- **Tampão TAE (solução "stock" 50x conc.):**

Tris base 242g;
ácido acético glacial 57,1ml;
EDTA 0,5M (pH8,0), 100ml;
água ultra-pura q.b.p. 1000ml.

- **Tampão de amostra (5x conc.):**

Azul de bromofenol 0,25% (p/v);
xileno de cianol FF 0,25% (p/v);
glicerol 30% (p/v).

6. Exercícios:

- 1 – Comparar as bandas de DNA das amostras fornecidas com o marcador de pares de base de DNA e determinar o tamanho (em pares de base) dos fragmentos de DNA das amostras.

2 – Discutir em grupo o resultado obtido conforme informações transmitidas na aula pelo professor.

7. Referências

1. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (Pages.: 6.3-6.20).
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pages.: 2.5.1-2.5.9)

AULA 3 – TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

1. INTRODUÇÃO

Transformação é o processo de introdução de DNA em células. A primeira descrição de transformação de *E. coli* data de 1970 quando Mandel e Higa demonstraram que células de *E. coli* tratadas com soluções geladas de cloreto de cálcio e depois brevemente aquecidas, podiam importar para o seu interior DNA do bacteriófago λ . Embora nunca se tenha conseguido compreender o mecanismo de transformação, está bem estabelecido que a exposição de células de *E. coli* a cátions a baixas temperaturas induz um estado de competência em que as células são capazes de importar DNA exógeno. Através de experimentação empírica, o processo de transformação foi modificado para melhorar a eficiência e reprodutibilidade de modo a adaptar esta técnica à rotina da biologia molecular.

Assim, foram feitas modificações no tempo de exposição das células ao íon cálcio; foram usados outros íons como o rubídio, manganês e potássio; e adição de outros compostos como o dimetilsulfóxido ou ditiotreitol. Muitas das alterações introduzidas levaram a uma melhoria da eficiência embora, por vezes, sem se conseguir explicar as razões, sendo frequente a adoção de protocolos diferentes de acordo com o laboratório e, também, de acordo com o experimentador. O processo químico de transformação mais usado é o método com cloreto de cálcio. Neste método, as células são cultivadas até o meio da fase exponencial e lavadas e concentradas com uma solução de cloreto de cálcio. O DNA é adicionado à suspensão e depois as células são sujeitas a um choque térmico. Após breve incubação em meio não seletivo, são espalhadas em placa com meio seletivo.

Outro processo de transformação muito usado é a eletroporação, tendo sido originalmente desenvolvido para a transformação de células eucariotas. Nesta técnica é aplicado um campo eléctrico forte e breve à suspensão de células com DNA o que levará, eventualmente, à abertura de poros na membrana celular através dos quais entram os plasmídeos. Para *E. coli*, o campo eléctrico é de $\sim 12,5 \text{KV/cm}$ e a descarga eléctrica através dos eléctrodos aumenta rapidamente até ao máximo de voltagem. Posteriormente, a voltagem decresce exponencialmente, sendo o tempo de pulso, normalmente, de $\sim 5 \text{ mseg}$ (mili segundos). O pulso eléctrico é caracterizado por dois parâmetros: a força do campo eléctrico, e o tempo. A força do campo eléctrico é regulada previamente no aparelho para a voltagem pretendida e o tempo constante do pulso é determinado pela resistência do circuito e pela capacitância.

Normalmente, para bactérias, a resistência é regulada para 200Ω e a capacitância para $25\mu\text{F}$, obtendo-se, assim, um tempo de pulso de $\sim 5 \text{ mseg}$. Na preparação de células competentes faz-se a lavagem e concentração das células em água ultrapura para que a suspensão celular tenha o mínimo de condutividade eléctrica e, posteriormente, ressuspende-se o sedimento em glicerol 10% que atuará como estabilizador osmótico.

Na transformação com o método do cloreto de cálcio podem-se obter eficiências superiores a 10^8 transformantes/ μgDNA . No entanto, na rotina laboratorial é de esperar obter 10^6 a 10^7 transformantes/ μgDNA , sendo essencial para a eficiência os seguintes fatores: colheita das células em fase exponencial, manutenção das células em gelo, contato prolongado das células com cloreto de cálcio, uso de reagentes de máxima pureza e limpeza do material. Se qualquer destes parâmetros não for cumprido com rigor (por exemplo, a existência de impurezas nos reagentes, de restos de detergente no material de vidro ou uma subida momentânea da temperatura das células), a eficiência da transformação pode ser drasticamente reduzida. Por eletroporação, a transformação é efetuada com uma eficiência que poderá ser da ordem de 10^{10} transformantes/ μgDNA desde que se cumpram com rigor todos os parâmetros referidos para o método com cloreto de cálcio. Para ambos os métodos de transformação, é possível preparar as células competentes previamente e congelá-las a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem que haja perda de competência.

Para ambos os métodos considerados, há variações de eficiência, em maior ou menor grau, em função do tamanho e concentração do plasmídeo e da estirpe bacteriana. Por isso, cada tipo de experiência de transformação deve ser precedida por um estudo de eficiência para otimizar o protocolo. Imediatamente a seguir à transformação (choque térmico no método do cloreto de cálcio ou descarga eléctrica na eletroporação), é adicionado meio não seletivo às células e procede-se a uma incubação breve (30-60min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que ocorra expressão do gene plasmídico de resistência ao antibiótico, de modo a haver suficiente proteína sintetizada para conferir resistência no momento em que as células forem espalhadas no meio seletivo.

No caso frequente de selecção de transformantes resistentes à ampicilina, o gene plasmídico que confere a resistência codifica uma enzima (β -lactamase) que degrada o antibiótico. Depois de sintetizada, esta enzima é segregada para o exterior celular, formando-se uma zona em redor das colónias de transformantes com menor concentração do antibiótico ao fim de mais de 16 horas de incubação.

Assim, em placas com incubação muito prolongada, pode ocorrer o surgimento de colónias satélite, identificáveis por serem muito pequenas comparadas com as colónias de transformantes, e que são resultantes do desenvolvimento de células não transformantes que, deste modo, são viáveis. O problema que estas colónias satélites poderão provocar é o de dificultar a repicagem dos transformantes para sua recuperação, bastando, para ultrapassar esta situação, analisar as placas com menos tempo de incubação.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. Transformação de *Escherichia coli* / Transformação química com CaCl₂

I) Preparação de células quimio-competentes:

Obs: A etapa I, preparação de células competentes será feita previamente pelo docente do curso.

- 1 - Inocular 50 mL de meio LB (em Erlenmeyer de 250 mL) com uma só colônia da estirpe de *E. coli*. Incubar durante a noite a 37 °C, a 250 r.p.m.
- 2 - Inocular 400 mL de LB (em Erlenmeyer de 2000mL) com 4 mL da cultura e incubar nas mesmas condições de temperatura e agitação até DO590 de 0,375.
- 3 - Transferir a cultura para 8 tubos de 50 mL de polipropileno pré-arrefecidos e deixar no gelo durante 5-10min.
- 4 - Centrifugar a 1600g durante 7 min, a 4 °C.
- 5 - Ressuspender lentamente cada sedimento em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada.
- 6 - Centrifugar a 1100g, 5 min a 4 °C.
- 7 - Ressuspender cada sedimento em 10 mL de solução de CaCl₂ gelada. Manter a suspensão em gelo durante 30 min.
- 8 - Centrifugar a 1100g, 5 min a 4 °C.
- 9 - Ressuspender cada sedimento em 2 mL de solução de CaCl₂.
- 10 - Distribuir alíquotas de 250 µL por microtubos esterilizados e arrefecidos. Congelar imediatamente a -70 °C.

II) Transformação das células competentes:

- 11 - Descongelar uma alíquota de células competentes em banho de gelo e colocar 50 µL em um microtubo arrefecido. Manter no gelo.
- 12 - Adicionar 10 ng de DNA (5 a 15 µL) e misturar com movimentos circulares da ponta da micropipeta. Manter em gelo durante 10 min.
- 13 - Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo em um banho a 42 °C e deixar durante 90 segundos. Em seguida transferir para banho de gelo e deixar 3 a 5 minutos.
- 14 - Adicionar 1 mL de meio LB. Incubar 60 min, 37 °C a 250 r.p.m.
- 15 – Espalhar 100 uL do meio contendo as células competentes em placa de LB suplementado com o antibiótico apropriado (canamicina). **Esta será a Placa 1.**
- 16 - Em seguida, centrifugar o tubo contendo as bactérias restantes por 5000 g x 2 minutos, retirar 800 uL do meio de cultura e resuspender as células no restante de meio, repetir passo 15. **Esta será a placa 2.**
- 17 - Incubar a 37 °C durante 12 a 16 horas.

Fazer um controle (negativo) com células competentes sem adição de DNA

Eficiência esperada: 10⁷-10⁸ transformantes/µg pDNA.

3. Material utilizado por grupo

- 1 – Uma alíquota de bactérias competentes
- 2 – Uma alíquota de plasmídeo.
- 3 – Duas placas de meio LB-ágar contendo canamicina.
- 4 – Meio LB líquido.
- 5 – Pipetadores e ponteiros diversas.
- 6 – Microesferas ou alça de Drigalski para espalhar as bactérias
- 7 – Bico de Bunsen.
- 8 – Gelo em recipiente.

4. Equipamentos

- 1 – Banho maria ou banho seco para tubos de 1,5 mL, para 42°C.
- 2 - Incubadora do tipo shaker para agitar as células a 250 rpm, a 37°C.
- 2 – Estufa para incubar as placas LB-ágar contendo as bactérias transformadas.

5. Exercício

- 1 – Contar as bactérias de cada placa, relacionar com a quantidade de DNA utilizado na transformação.

6. Referências

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 13.7.1-13.7.10)
2. Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK
3. <https://www.addgene.org/> (protocolos para muitas aplicações em biologia molecular).

Meios de cultura e soluções

A. Meio LB ("Luria broth"):

Tryptone 1% (p/v); extracto de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v); ajustar pH 7,5 com NaOHaq.; autoclavar 20 min, 120°C, 1bar.

B. Solução de CaCl₂:

CaCl₂ 60mM; glicerol 15% (p/v)

C. LB sólido com canamicina:

Meio LB; agar 2% (p/v); autoclavar a 120 °C, 1bar durante 20 min.

Antes da distribuição pelas placas, esfriar o meio e adicionar ampicilina (estoque 100mg/ml esterilizada por filtração), para uma concentração final de 100 µg/ml, exemplo; para 100 mL de meio LB-ágar usar 100 uL de solução stock de ampicilina. Guardar as placas a 4 °C.

AULA 4 - CONTAGEM DE CÉLULAS TRANSFORMANTES E E PCR DE COLÔNIAS

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Parte A:

Avaliação da eficiência de transformação

- 1 - Contar as colônias que cresceram nas placas da aula anterior.
- 2 - Para avaliar a relação entre a quantidade de plasmídeo utilizado na transformação e a formação de colônias será usada a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de transformação} = \text{número de colônias} / \text{quantidade de DNA utilizado}$$

Parte B:

PCR de colônias

- 1 – Adicionar 20 uL de água autoclavada em tubos de 1,5 mL.
- 2 – Tocar uma colônia da placa contendo as bactérias transformadas com os constructos recombinantes BmTIsint-pET26B com um palito de dente autoclavado ou ponteira autoclavada. Uma vez tocado na colônia, o palito/ ponteira deve ser mergulhado em um dos tubos contendo 20 uL de água, girar o palito/ponteira várias vezes na água para retirar o material bacteriano. Se necessário, como controle negativo, tocar um palito estéril em uma placa de meio de cultura LB-ágar com ampicilina (placa mestre).
- 3 – Após retirar o material microbiano da colônia, aquecer o tubo a 80 °C por 10 minutos para lisar as células.
- 4 – Centrifugar por 10 minutos a 5,000 g.
- 5 – Transferir **10 uL** para o tubo de reação de PCR.
- 6 – A mistura da reação de PCR para cada amostra será:

Reagente	Quantidade
Amostra (DNA molde/amostra de bactérias)	10 uL
Tampão 10x	5 uL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 uL
dNTPs (10 mM)	1 uL
Oligonucleotídeo T7 promoter (100 uM)	1 uL
Oligonucleotídeo T7 reverso (100 uM)	1 uL
Taq DNA polimerase	0,3 uL
H ₂ O	30,2 uL
Volume final de reação	50 uL

7 – O mix de reação será preparado previamente, adicionar à amostra 40 uL do mix de reação.

A reação de PCR será realizada em termociclador segundo o seguinte protocolo:

- 1 94 °C – 5 minutos
- 2 35 ciclos (94 °C – 30 segundos, 46 °C – 30 segundos, 72 °C – 1 minuto)
- 3 72 °C – 5 minutos
- 4 4 °C – ∞

2. Material necessário por grupo

- 1 – Tubos de 1,5 mL
- 2 – Tubos para reação de PCR
- 3 – Pipetadores (P20, P10) e ponteiros
- 4 – Palitos de dente autoclavados ou ponteiros autoclavados
- 5 – Placa LB-ágar-canamicina
- 6 – Lamparina

3. Equipamentos

Termociclador (aparelho para reação de PCR)

Análise do resultado da PCR

Na próxima aula prática faremos a corrida do gel de agarose 1% dos produtos de PCR das reações da presente aula.

4. Referências

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 13.7.1-13.7.10)
2. Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK
3. <https://www.addgene.org/> (protocolos para muitas aplicações em biologia molecular).

AULA 5 - AVALIAÇÃO DA PCR DE COLÔNIAS POR GEL DE AGAROSE E INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFORMADAS PARA MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL

Parte A:

Análise em gel de agarose das amostras da PCR de colônias

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparação do gel de agarose:

O gel será preparado de acordo com o protocolo da aula prática 2, no entanto o intercalante de DNA utilizado será o Gel Red.

Preparação das amostras:

1 - Para cada amostra, misturar num microtubo:

10 uL de cada reação

4 µl de tampão de amostra (5x conc.)

6 µl de água deionizada

2 - Aplicar as amostras nos respectivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. Não deixar extravasar a amostra do poço para não contaminar os poços vizinhos.

3 - Colocar a tampa da cuba. Verificar que as amostras estão colocadas do lado do polo negativo (eletrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do polo positivo (eletrodo de cor vermelha).

4 - Ligar os cabos à fonte de eletricidade. Ligar a fonte e regular para uma voltagem de 1-5V/cm (distância medida entre os eletrodos). Verificar se há desprendimento de bolhas dos eletrodos devido à eletrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correto.

5- Após migração julgada conveniente (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligar a corrente elétrica na fonte, desligar os cabos e retirar a tampa da tina. 11 - Examinar o gel à radiação ultra-violeta e fotografar para arquivar.

2. Material necessário por grupo:

1 – Kit Pipetadores e ponteiros diversas

2 – Tampão de amostra.

3 – Água deionizada autoclavada (alíquota de 1mL)

4 – Tampão TAE

5 – Agarose

6 – Gel Red

7 – Amostra (PCR de colônia)

3. Equipamentos

- 1 – Microondas
- 2 – Cuba de eletroforese horizontal (gel de agarose de DNA)
- 3 – Fonte da cuba de eletroforese
- 4 – Fotodocumentador UV.

4. Meios de cultura e soluções, previamente preparadas

•Tampão TAE (solução "stock" 50x conc.):

Tris base 242g;
ácido acético glacial 57,1ml;
EDTA 0,5M (pH8,0), 100ml;
água ultra-pura q.b.p. 1000ml.

•Tampão de amostra (5x conc.):

Azul de bromofenol 0,25% (p/v);
xileno de cianol FF 0,25% (p/v);
glicerol 30% (p/v).

Discutir:

- 1 – Houve amplificação do fragmento previsto com a PCR de colônias? Explique.
- 2 – Por que foram utilizados especificamente os respectivos primers fw e reverse na reação?

Parte B:

Inoculação das células transformadas para minipreparação plasmidial:

- 1 - Transferir 3 mL de meio LB contendo antibiótico (ampicilina, na concentração de 100 ug/mL) para tubos de ensaio previamente autoclavados.
- 2 - Tocar uma colônia com palito de dente previamente autoclavado e inocular no tubo de ensaio contendo o meio líquido LB.
- 3 - Incubar os tubos em agitador tipo Shaker, 180 RPM, 37 °C por 16h.

5. Referências

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore. (Pags.: 13.7.1-13.7.10)
2. Hanahan D, Jessee J, and Bloom R. 1995. Techniques for Transformation of *E coli*. In: *DNA Cloning 1, A Practical Approach. Core Techniques*, 2nd Edition Glover DM and Hames BD ed. IRL Press. Oxford, UK
3. <https://www.addgene.org/> (protocolos para muitas aplicações em biologia molecular).

AULA 6 - MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL (EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL)

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. Extração do DNA plasmidial

Sedimentação das bactérias por centrifugação

- 1 - Transferir uma colônia isolada para 3 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado em cada tubo estéril, incubar a cultura a 37°C em 180 RPM por 16h (**realizado na aula anterior**).
- 2 - Transferir a cultura para um tubo plástico de 1,5 ml, aproximadamente 1 ml por vez, centrifugar a 10000 x g por 3 minutos
- 3 - Descartar o sobrenadante
- 4 - Repetir o processo dos item 2 e 3 até terminar o meio de cultura do inóculo.

Lise alcalina

- 5 - Ressuspender o *pellet* de bactérias (obtido na etapa anterior) em 100 µl da solução I (gelada) e agitar no vórtex;
- 6 - Adicionar 200 µl da solução II (preferencialmente fresca), fechar o tubo e misturar os componentes por inversão, fazer isso 5x, certificar-se que toda a superfície entre em contato com a solução, após fazer esse processo, deve-se descansar o tubo no gelo por 5 min;
- 7 - Adicionar 150 µl da solução III (Gelada), deve-se fechar bem o tubo e agitar gentilmente, fazendo sua inversão por 10 segundos para a solução III ser bem distribuída, após fazer isso, deve-se deixar o tubo descansar por mais 5 minutos;
- 8 - Centrifugar a 12000 x g por 10 min;
- 9 - Fazer a transferência do sobrenadante para o tubo estéril;

Precipitação do DNA

- 10 - Precipitar o DNA dupla fita com 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente, misture em vórtex, deixar a mistura descansar por mais 2 minutos à temperatura ambiente;
- 11- Centrifugar a 12000 x g por 10 min;
- 12 - Remover o sobrenadante, manter o tubo em posição invertida em papel toalha, permitindo que todo fluído escorra pela parede do tubo;
- 13 - Lavar o pellet de DNA com 1 ml de etanol 70% a 4°C, sem ressuspender o *pellet*, remover o sobrenadante, repetir as etapas 11 e 12;
- 14 - Deixar secar por 20 min;
- 15 - Ressuspender em 50 µl de água estéril.
- 16- Quantificar de acordo com a aula prática 1.

2. Material necessário por grupo:

1 – Kit Pipetadores e ponteiros diversas

2- tubos 2 ou 1,5mL de tipo eppendorf

Soluções para mini prep

Solução I (solução para lise alcalina):

-50 mM glicose;

-25 mM Tris-Cl (PH 8);

-10 mM EDTA (PH 8);

-Preparar a solução em 100 ml, autoclavar por 15 minutos, e estocar a 4°C.

Solução II:

-0,2 N de NaOH (diluição a 10 N);

-1% de SDS;

-Preparar a solução em temperatura ambiente.

Solução III:

-5 M de acetato de Potássio (60 ml);

-Ácido acético glacial (11,5 ml);

-H₂O deionizada autoclavada (28,5 ml).

3.

4. Tarefa

1. Discutir o que cada uma das soluções (I, II e III) está fazendo com as células e com o material genético.
2. Nosso objetivo neste protocolo é isolar e purificar o DNA plasmidial. Em que etapa do protocolo e por que conseguimos a separação e isolamento do DNA plasmidial do DNA genômico das bactérias?

5. Referência:

1. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

AULA 7 – INOCULAÇÃO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A. Pré-inóculo

- 1 – Transferir 3 mL de meio líquido LB contendo 50 ug/mL de canamicina para tubo de ensaio previamente esterilizado.
- 2 - A partir de uma placa contendo colônias de bactérias de expressão *E. coli* BL21SI-DE3 transformada com o a construção plasmidial pET26B-BmTIsint (vetor contendo sequência de DNA de inibidor sintético baseado em inibidor de protease do carrapato *Rhipicephalus microplus*) (as placas serão fornecidas pelo docente responsável da disciplina) realizar a inoculação utilizando palito de dente autoclavado.
- 3 – Incubar os tubos em agitador tipo Shaker, 180 RPM, 37 °C por 16h.

B. Inoculação para expressão

- 4 – Transferir 10 mL de meio LB contendo canamicina (50 ug/mL) para tubo do tipo falcon, preparar dois tubos para cada “clone”.
- 5 – Inocular 500 uL do pré-inóculo em cada tubo tipo falcon contendo o meio líquido LB-canamicina.
- 6 - Incubar os tubos em agitador tipo Shaker, 180 RPM, 37 °C
- 7 – Após 1h fazer a leitura de OD 590 (590 nm) em espectrofotômetro.
- 8 – Repetir a leitura até que a OD 590 atinda o valor de 0,4.
- 9 – Quando a OD 590 chegar à 0,4 realizar a indução com IPTG para uma concentração final de 1mM, em um dos tubos inoculados com o “clone” da construção da proteína recombinante BmTIsint, o outro tubo será o controle, não induzido.
- 10 – Incubar os tubos em agitador tipo Shaker, 180 RPM, 37 °C por ____h.
- 11 – Guardar as amostras no congelador.

AULA 8A – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS POR MEIO DO SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacríamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Parte A :

1. Procedimento Experimental

Preparo do gel SDS-PAGE:

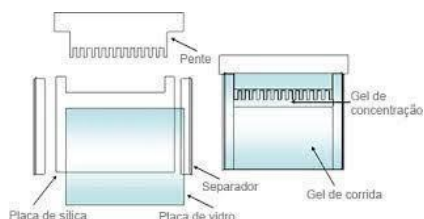
1. Limpar as placas de vidro com etanol 70%.
2. Montar o aparato de eletroforese vertical para proteínas.
3. Preparar um gel de separação 15%, de acordo com o protocolo a seguir e um gel de concentração 5%.

REAGENTES DO GEL DE SEPARAÇÃO

GEL	5%	8%	10%	12%	15%	18%
A1 (mL)	0,84	1,25	1,67	2,07	2,5	2,92
B (mL)	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87
H2O (mL)	2,22	1,81	1,39	1,06	0,56	0,14
C (uL)	50	50	50	50	50	50
Temed (uL)	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
D (uL)	25	25	25	25	25	25
Volume Final (mL)	5	5	5	5	5	5

REAGENTES DO GEL DE CONCENTRAÇÃO

GEL	3%	5%
A1 (mL)	0,34	0,56
E (mL)	0,42	0,42
H2O (mL)	2,49	2,27
C (uL)	33,4	33,4
Temed (uL)	2,5	2,5
D (uL)	25	25
Volume Final	3,3	3,3



Reagentes

A1 solução de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%

B Tampão tris-HCL 1M, pH 8,8

C Solução de SDS 10% em água

D Solução de persulfato de amônio 200mg/mL

E Tampão tris-HCL 1M pH 6,8

Tampão de amostra 2x: tris-HCL 0,1M, SDS 4%, glicerol 20%, pH 6,8 contendo 0,2% azul de bromofenol.

Tampão de corrida: tris-HCL 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1%.

3.1 Preparo do gel de separação Misturar as soluções A1, B, H₂O e C nas quantidades especificadas pelo protocolo. Homogeneizar. Adicionar os catalisadores **PERSULFATO DE AMÔNIO e TEMED**, homogeneizar novamente e pipetar entre as placas de vidro. Adicionar uma lâmina de água ou etanol 70% acima da mistura do gel. Aguardar 20 minutos para a polimerização.

3.2 Preparo do gel de concentração (superior): Seguimos as quantidades especificadas no protocolo para o gel de 5%, retirar a lâmina de água ou etanol 70% acima do gel de separação. Pipetar entre as placas de vidro e colocamos o pente para formar os poços.

Observação:

1. Não guardar o SDS em geladeira. Manter temperatura ambiente.

2 - Acrilamida é uma substância neurotóxica, necessário ter cuidado.

2. PREPARO DAS AMOSTRAS E CORRIDA DO GEL.

A – Extração das proteínas do periplasma bacteriano.

- 1 – Centrifugar as amostras das bactérias contendo o plasmídeo recombinante induzidas à expressão por IPTG, 8000 g x 10 minutos.
- 2 – Descartar o sobrenadante.
- 3 – Adicionar 1 mL da solução Tris-HCl 30 mM, pH 8,0 contendo 20% de sacarose e 1 mM de EDTA (adicionado de solução de EDTA concentrada pH 8,0). Ressuspender as células por agitação manual. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente.
- 4 – Centrifugar 8000 g x 10 minutos.
- 5 – Descartar o sobrenadante.
- 6 – Adicionar 1 mL da solução de MgSO₄ 5 mM. Ressuspender as células por agitação manual, no gelo. Incubar 10 minutos no gelo.
- 7 – Centrifugar 8000 g x 10 minutos.
- 8 – Coletar o sobrenadante, transferir para tubo de 1 mL, o sobrenadante contém as proteínas do periplasma. Separar 100 uL de cada amostra para ser concentrada em rotaevaporador.

3. Material necessário para a prática

Equipamentos:

- 1 – Sistema de eletroforese vertical.
- 2 – Centrífuga para tubos plásticos de 15 mL (falcon)
- 3 – Agitador para incubar o gel durante coloração.

Material:

- 1 – Placas e pente para montagem do gel de poliacrilamida.
- 2 – Pipetadores P1000, P200, P10 e ponteiras correspondentes.
- 3 - Tubos plásticos, tipo eppendorf, de 1,5 mL.
- 4 – Gelo para incubação dos tubos.

4. Reagentes:

- 1 – Reagentes para preparo do gel (A1, B, C, Temed, D, H₂O deionizada), descritos no quadro de preparo do gel.
- 2 - Tris-HCl 30 mM, pH 8,0 contendo 20% de sacarose e 1 mM de EDTA (adicionado de solução de EDTA concentrada pH 8,0) – será usado 2 mL por grupo.
- 3 - Solução de MgSO₄ 5 mM – será usado 2 mL por grupo.

AULA 8B – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS POR MEIO DO SDS-PAGE (ELETROFORESE EM GEL DE POLICRIAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO)

Parte B:

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

B – Preparo das amostras para aplicação no gel de poliacrilamida.

- 1 – Ressuspender a amostra concentrada adicionando 10 uL de água destilada.
- 2 – Adicionar 10 uL do tampão de amostra (composição na parte A).

C – Aplicação e corrida do gel.

- 1 – Montar o gel no sistema de eletroforese vertical.
- 2 – Adicionar o tampão de corrida.
- 3 – Preparar o marcador de massa molecular de proteína.
- 4 – Aplicar as amostras
- 5 – Colocar a tampa do sistema e ligar à uma fonte de DDP, correr inicialmente à 80 V, após a entrada das proteínas no gel aumentar a voltagem para 100 – 150 V.
- 6 – Após a corrida retirar o gel, colocar em uma cuba para coloração.
- 7 – Lavar 1 x com água destilada.
- 8 – Corar o gel em solução de coloração de Comassie, em rotação lenta por no mínimo 4h.
- 9 – Retirar o corante, guardar para utilizar novamente.
- 10 – Lavar o gel com água destilada (ou deionizada), em seguida adicionar o descorante de gel (metanol:ácido acético, 1:1 (v/v)), deixar o tempo necessário para descorar, durante a descoloração ir trocando o descorante.

Obs: O descorante usado pode ser guardado para ser recuperado com carvão ativado.

Solução de coloração de Comassie

Para 100 mL de solução:

Dissolver 025g de Comassie Brilliant Blue R-250 em 90 mL de metanol:H₂O (1:1, v/v) e 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar a solução em filtro Whatman no.1 para remover partículas em suspensão. Estocar à temperatura ambiente.

Obs: preparar pelo menos 250 mL.

2. Material necessário para a prática

3. Equipamentos:

- 1 – Sistema de eletroforese vertical.
- 2 – Fonte elétrica para sistema de eletroforese.
- 3 – Agitador para incubar o gel durante coloração.

4. Material:

- 1 – Gel de poliacrilamida 15% preparado na aula anterior.
- 2 – Pipetadores para 10 uL e ponteiros e para aplicar a amostra no gel.
- 3 – Recipientes para realizar a coloração do gel após a corrida.

5. Reagentes:

- 1 - Tampão de corrida (ver na parte A)
- 2 - Tampão de amostra (ver na parte A)
- 3 - Água destilada deionizada
- 4 - Solução de Comassie para coloração
- 5 – Solução descorante

6. Discussão

- 1 – Para que serve o marcador de massa molecular?
- 2 – O que faz a solução de Comassie Blue?
- 3 – O que pôde ser observado nas amostras das diferentes condições de indução da expressão da proteína recombinante? Houve diferença entre as amostras e entre o controle não induzido?
- 4 – Houve alguma condição que demonstrou ser melhor?
- 5 – Qual a função e o princípio do IPTG?