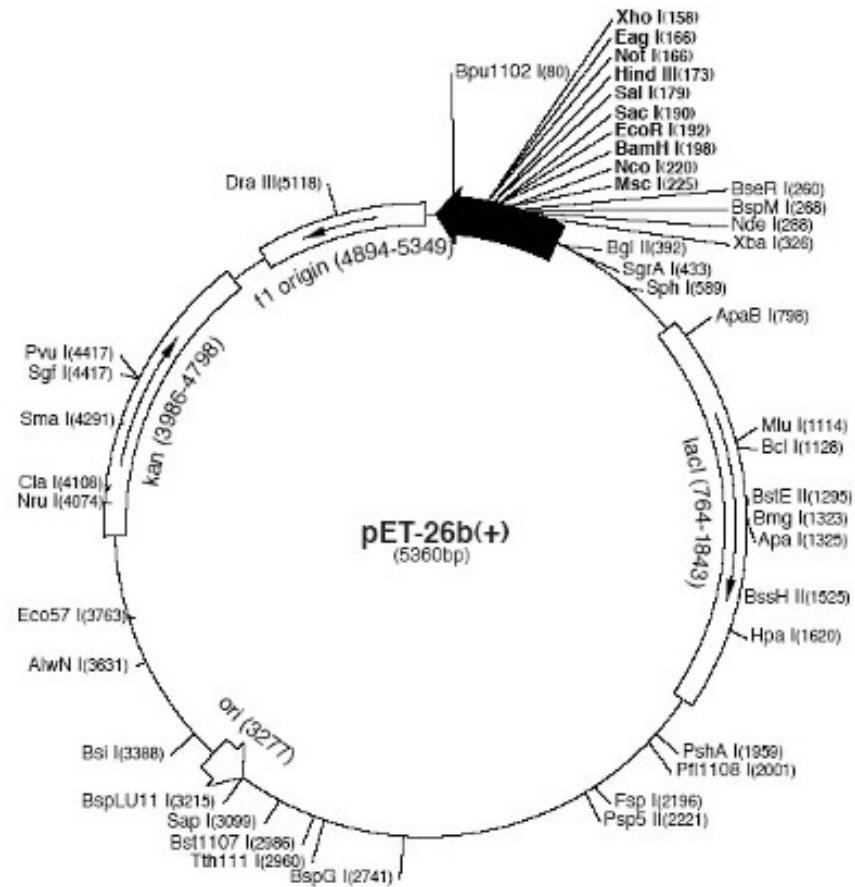
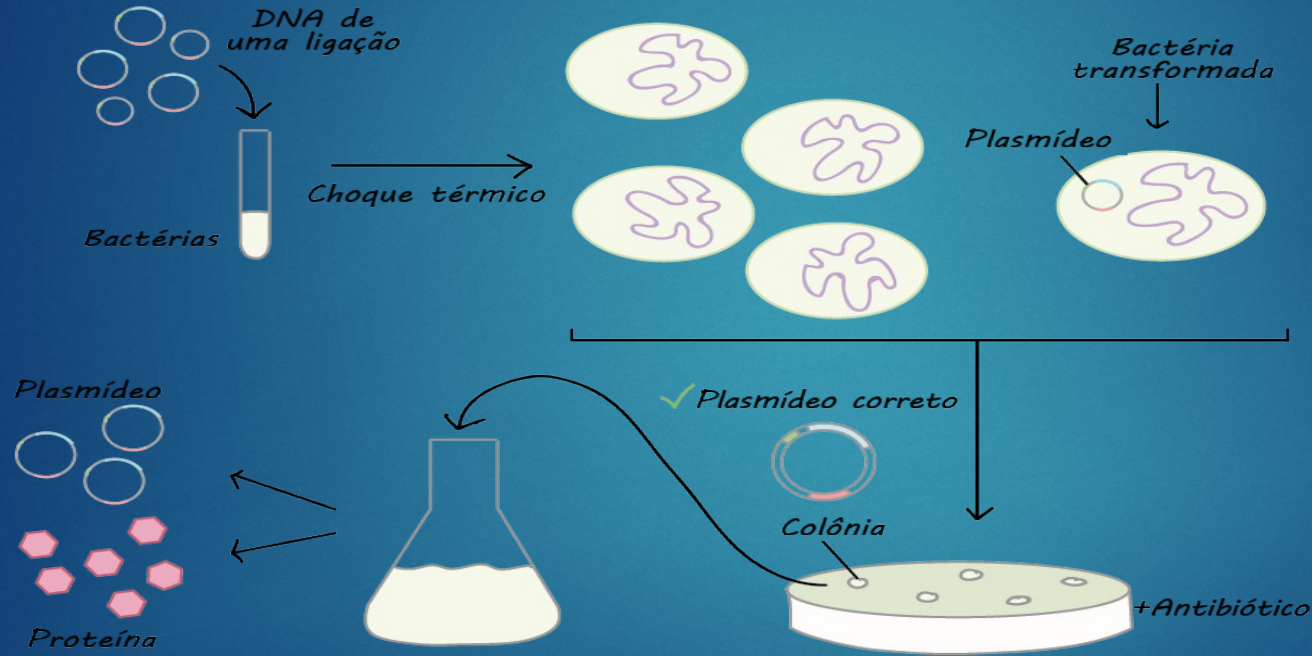


Proteínas recombinantes aula 1

prática



Multiplicação do constructo



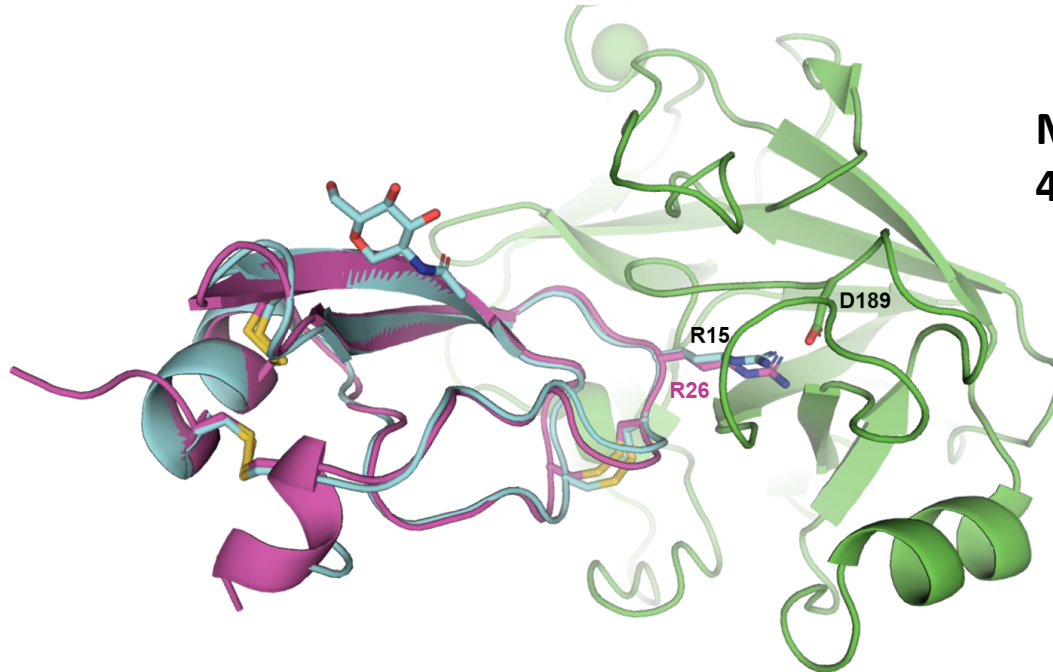
BmTIsint-pET26B

Total de resíduos de aminoácidos: 83
Peso molecular da proteína: 9580 Da

[illegible]

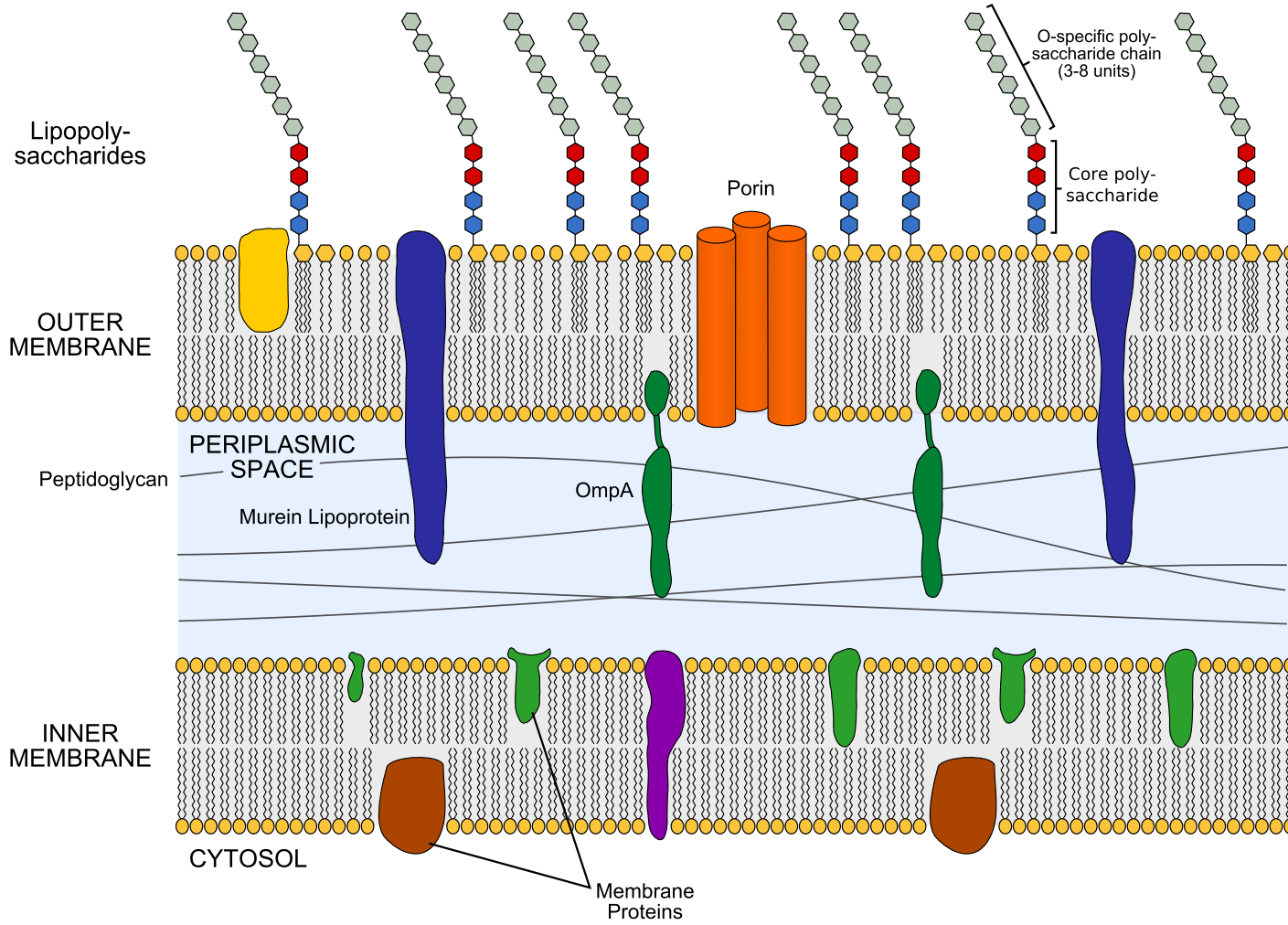
Comparação com estruturas conhecidas

- A estrutura do inibidor de protease do tipo Kunitz 2 em complexo com a mesotripsina humana (PDB = 4U32) foi a que apresentou o menor RMSD (0.6Å) quando alinhada com a estrutura do modelo gerado.
- Com base nesse alinhamento é possível que a R26 do modelo também se ligue no sítio S1 da enzima.

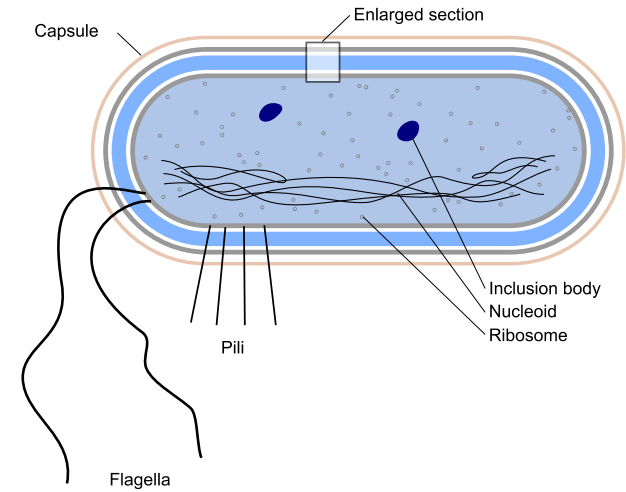


Modelo (rosa)

4U32 = KTPI (ciano) + Mesotripsina (verde)



Gram Negative Bacterial Cell Wall



Aula 1 - Determinação da concentração e grau de pureza de DNA

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 absorbância a 260nm é proporcional à quantidade de ácidos nucleicos, sendo a seguinte a proporcionalidade:

Absorbância

Equivalência

260 nm

~50µg/mL dsDNA

~37µg/mL ssDNA

~40µg/mL ssRNA

~20µg/mL oligonucleótidos em cadeia simples

Absorbância	Significado	Equivalências e intervalo de confiança
A260	Proporcional à concentração de ácidos nucleicos	A260=1 $\Leftrightarrow$ ~50 μ g/ml dsDNA A260=1 $\Leftrightarrow$ ~37 μ g/ml ssDNA A260=1 $\Leftrightarrow$ ~40 μ g/ml ssRNA A260=1 $\Leftrightarrow$ ~20 μ g/ml de oligonucleótidos em cadeia simples
A280	Proporcional à concentração de fenol e proteínas	1,8 < A260/A280 < 2; corresponde a DNA ou RNA puros
A320	Proporcional à quantidade de partículas em suspensão e sujidade das "cuvettes"	

Procedimento experimental

- 1 - Ligar o espectrofotômetro e regular para 260nm.
- 2 - Fazer o zero de absorbância 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 μ L de água ultra-pura e, depois, 2 μ L 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 e 280 nm.
- 5 - Caso o aparelho não permita realizar as leituras simultaneamente repetir as leituras a 280nm.

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”.