

FIOCRUZ

ELETROFORESE DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)



Victória Santos de Almeida – Aluna do Programa de Vocação Científica- Iniciação- CAP UFRJ
Orientador: Jonas Perales e Coorientadora: Barbara Silva Soares
Laboratório de Toxinologia - Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ

INTRODUÇÃO

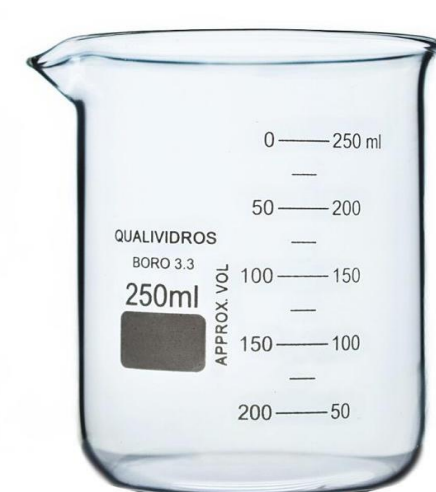
O Laboratório de Toxinologia trabalha há mais de 20 anos estudando proteínas isoladas do gambá *Didelphis aurita* capazes de promover uma resistência natural a picadas de serpentes. Entre as diversas técnicas bioquímicas desenvolvidas neste laboratório, a eletroforese de poliacrilamida é uma das mais utilizadas.

A eletroforese é uma técnica analítica capaz de separar partículas carregadas dentro de um campo elétrico uniforme. Através da capacidade das proteínas de se ionizar em diferentes pHs, ao aplicar um campo elétrico, estas irão migrar para o polo oposto a sua carga superficial líquida, ou seja, partículas carregadas positivamente, migram para o catodo e partículas carregadas negativamente migram para o anodo.

Na eletroforese de poliacrilamida em condições desnaturantes, as proteínas são desnaturadas e ocorre a normalização das cargas superficiais pela adição do SDS (todas passam a ser negativas) e a velocidade com que esta proteína irá migrar, dependerá do tamanho do poro do gel confeccionado e do volume da proteína.

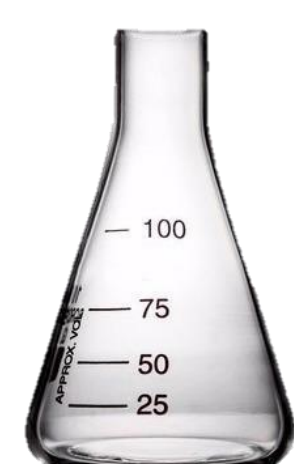
MATERIAIS

Para a confecção dos géis e corrida das amostras, utilizamos os seguintes materiais:



Béquer

Uso geral, serve para fazer reações, dissolver sólidos e aquecer líquidos



Erlenmeyer

Usado para aquecer, para dissolver substâncias e proceder reações



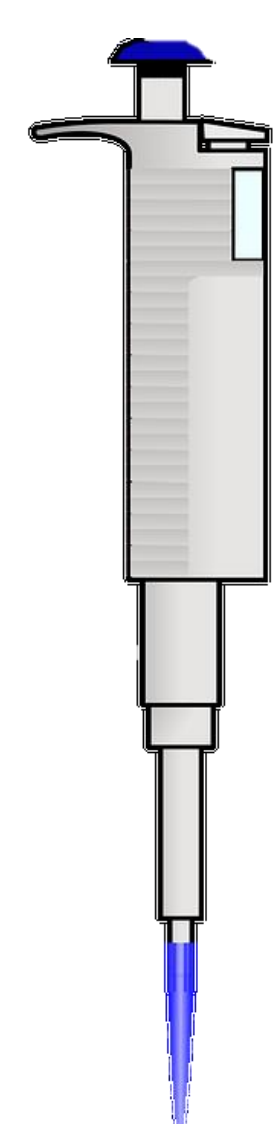
Kitassato

É usado para filtrações a vácuo e desaeração de soluções



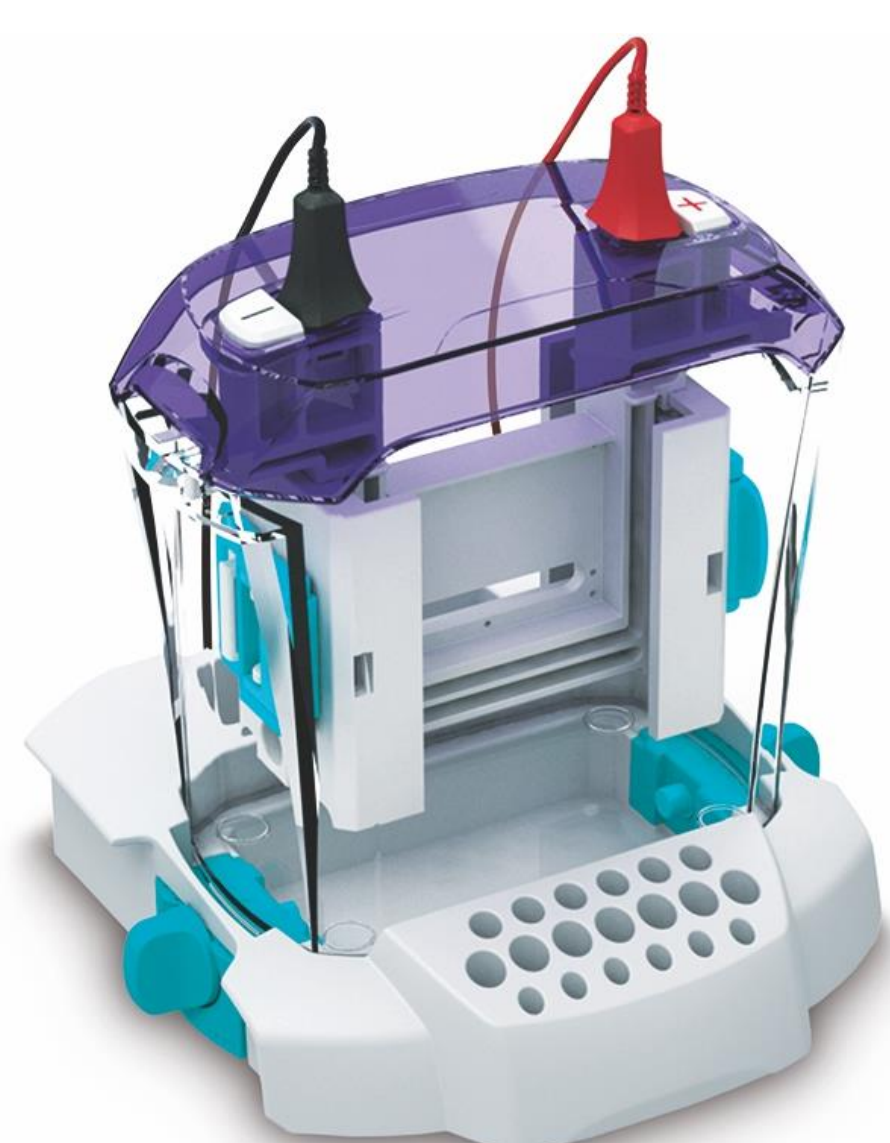
Proveta

Serve para medir e transferir volumes de líquidos



Pipeta automática

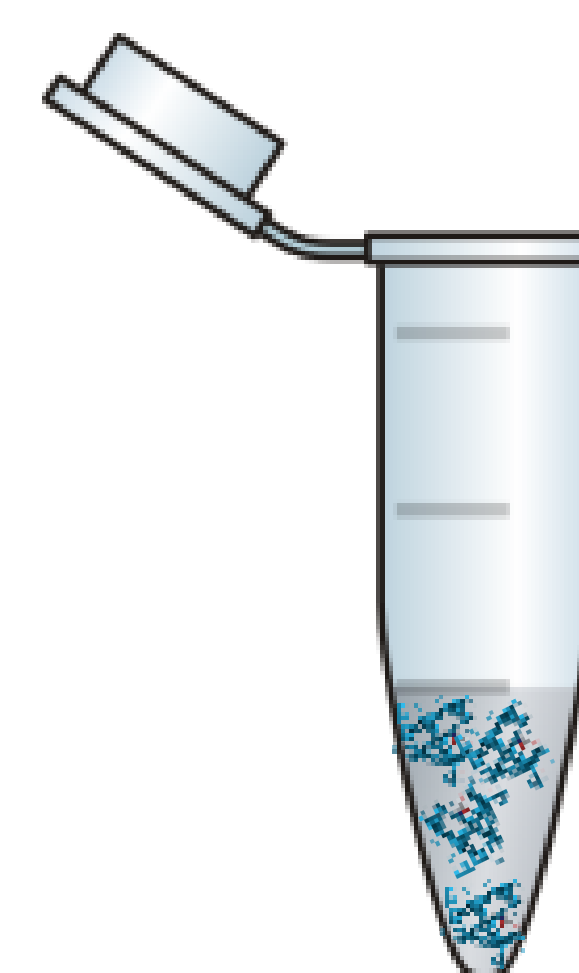
Utilizada para pipetar com maior precisão um determinado volume da amostra



Sistema de eletroforese

Onde ocorrerá a migração das proteínas de acordo com suas massas

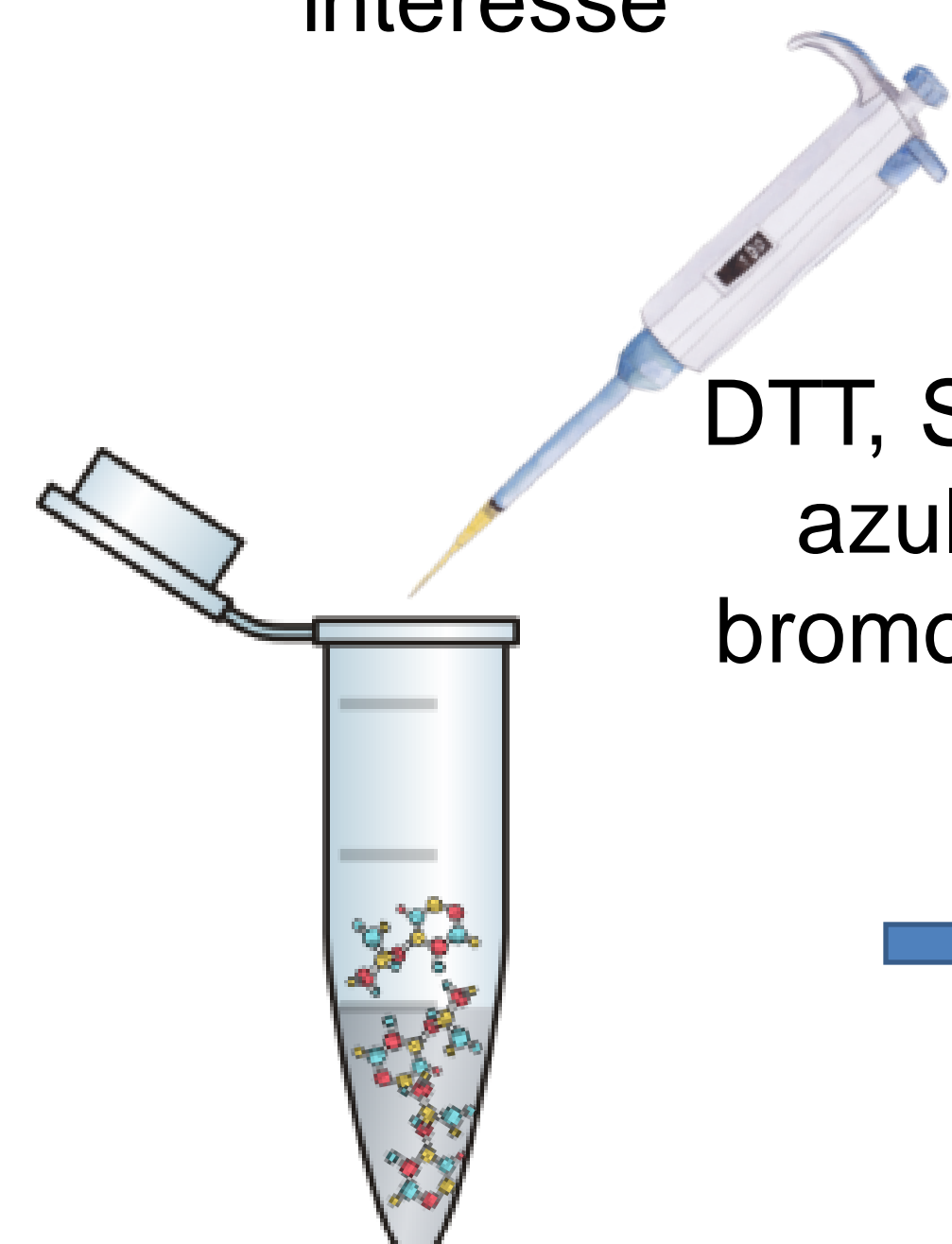
DESENVOLVIMENTO



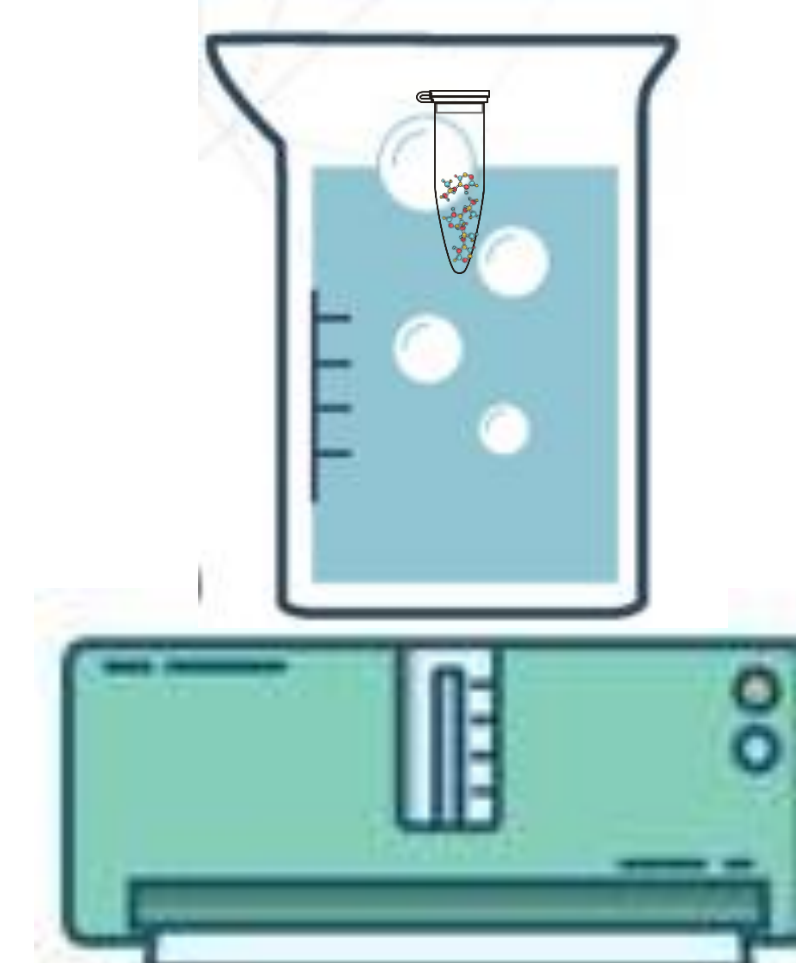
Proteína de interesse



Dosagem de proteínas

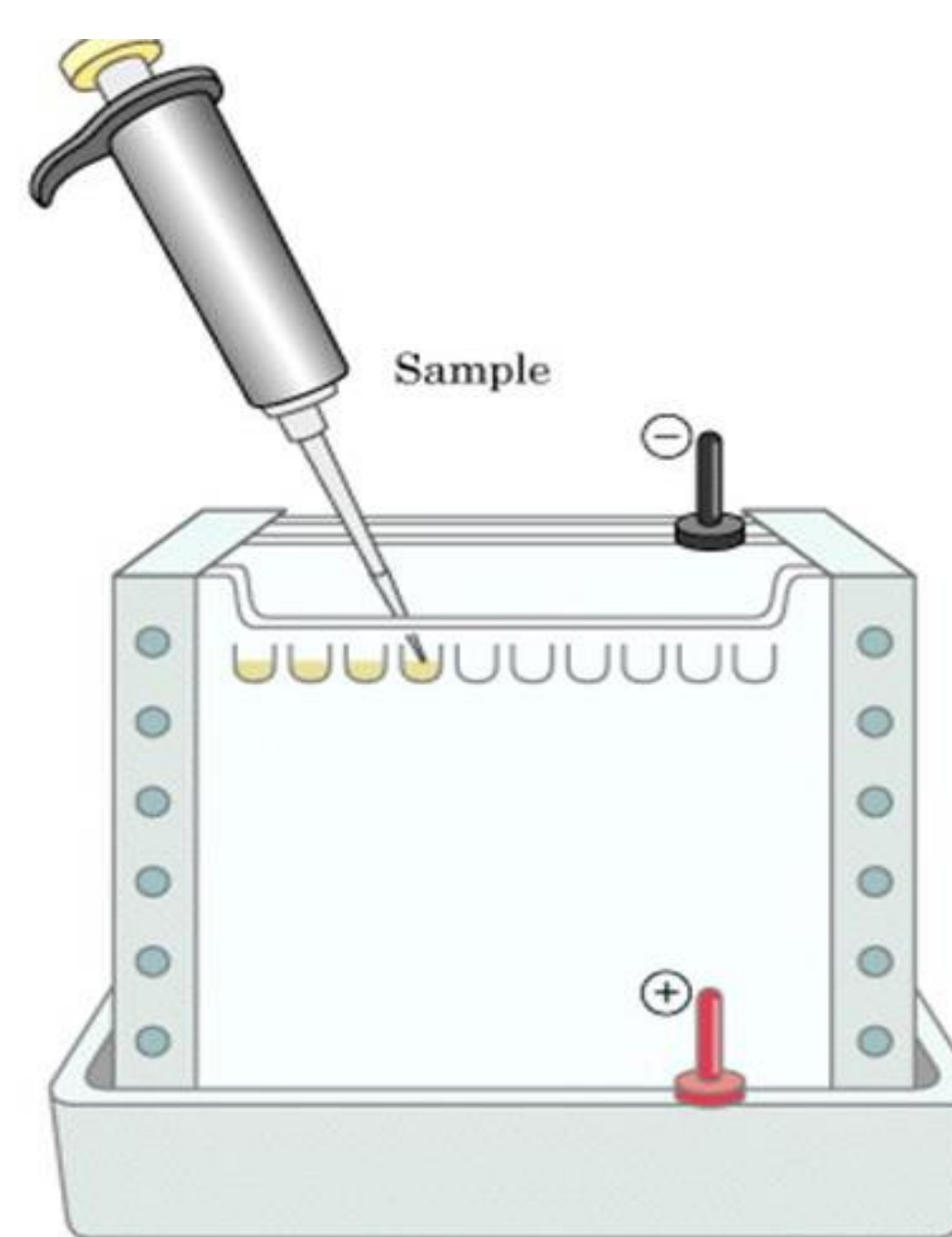


DTT, SDS e azul de bromofenol

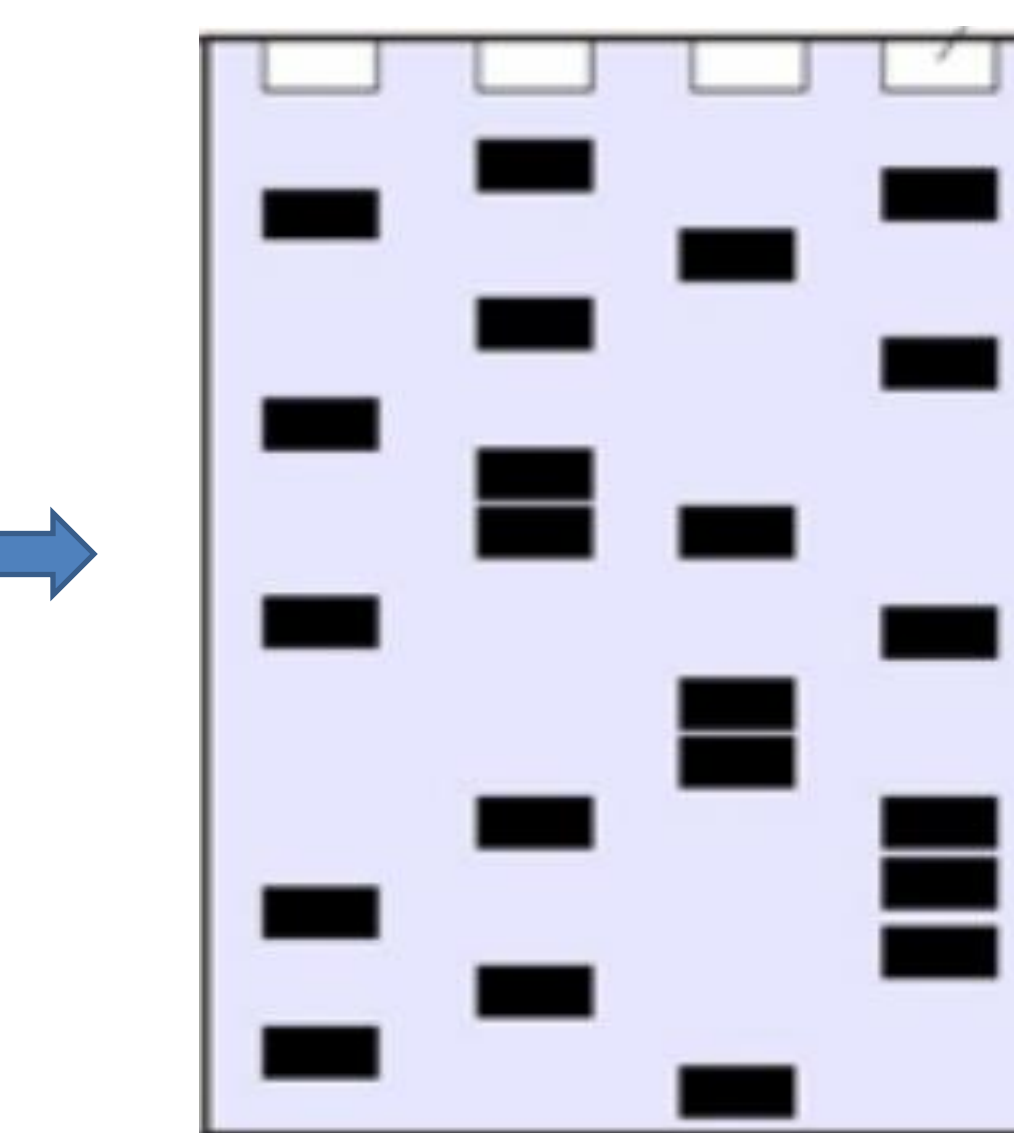


o DTT vai causar a ruptura das pontes dissulfeto e o SDS vai destruir outras interações não covalentes como pontes de hidrogênio e forças de Van Der Waals para poder desnaturar as proteínas e vai doar as cargas negativas.

Ferve-se a amostra para que qualquer interação não covalente que ainda esteja presente será desfeita.



O azul de bromofenol é um corante aniônico que ao estar carregado negativamente vai correr junto com as proteínas e serve como um agente para monitorar o estado da corrida.



Para poder visualizar o movimento das proteínas, se usa o corante Azul de coomassie, que dará uma coloração azul avermelhada a amostra.

CONCLUSÃO

A técnica de eletroforese permite o uso de condições redutoras: DTT e desnaturação com SDS. Com ela é possível separar proteínas pelo seu tamanho, permitindo estimar sua massa molecular. É uma técnica rápida e muito utilizada em bioquímica de proteínas, como uma das etapas de caracterização das amostras.