

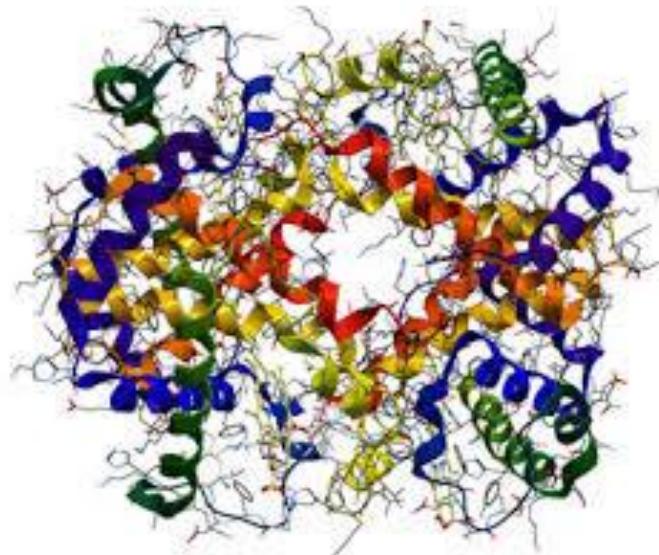
Eletroforese

Práticas de Biomedicina II

Prof: Archangelo Padreca Fernandes

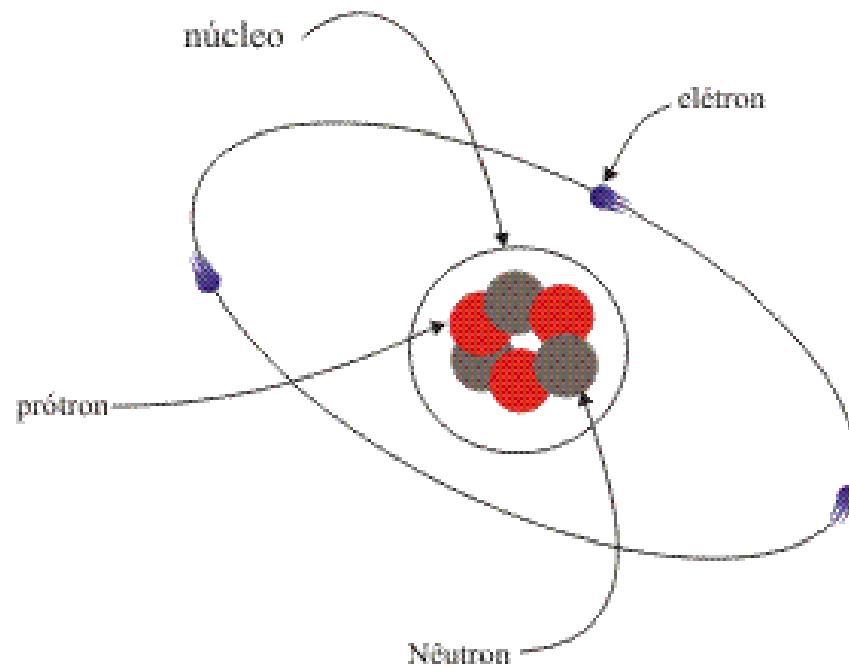
Proteínas

- As proteínas tem um comportamento anfótero, ou seja, se comporta tanto como ácido (doa H^+) tanto como bases (recebe H^+).
- Dependem do PH da solução.



Cargas

- Toda a matéria que conhecemos é formada por moléculas. Esta, por sua vez, é formada de átomos, que são compostos por três tipos de partículas: prótons, nêutrons e elétrons.



Cargas

- Os prótons são partículas com cargas positivas, os elétrons tem carga negativa e os nêutrons tem carga neutra.
- A modificação que um átomo pode sofrer é a perda ou ganho de elétrons.
- Por isso, um corpo é chamado neutro se ele tiver número igual de prótons e de elétrons.
- Podemos definir corpos eletrizados positivamente e negativamente.

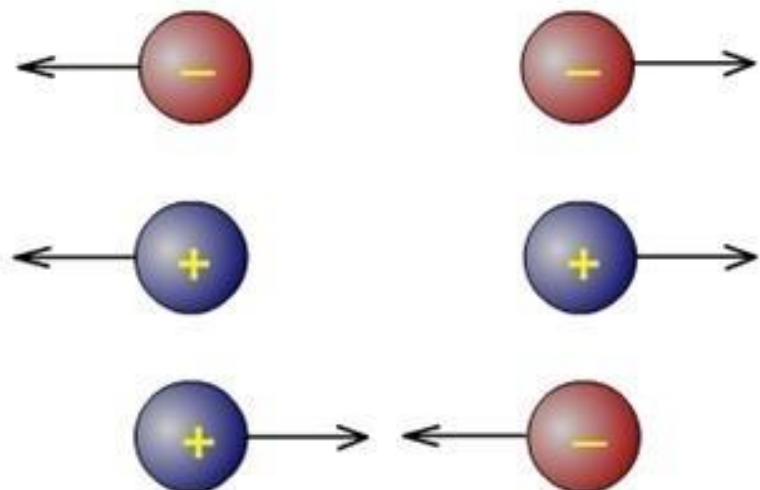
*Um corpo eletrizado negativamente tem maior número de elétrons do que de prótons, fazendo com que a carga elétrica sobre o corpo seja negativa.

*Um corpo eletrizado positivamente tem maior número de prótons do que de elétrons, fazendo com que a carga elétrica sobre o corpo seja positiva.

Cargas

- A eletrostática é descrita pelo princípio da atração e repulsão de cargas conforme seu sinal (sinais iguais se repelem e sinais contrários se atraem).

* os opostos se atraem.

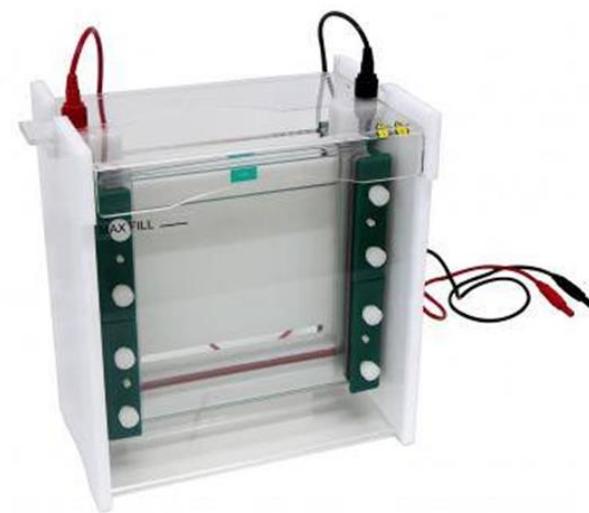


O que é?

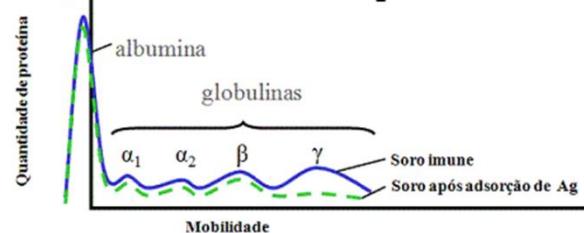
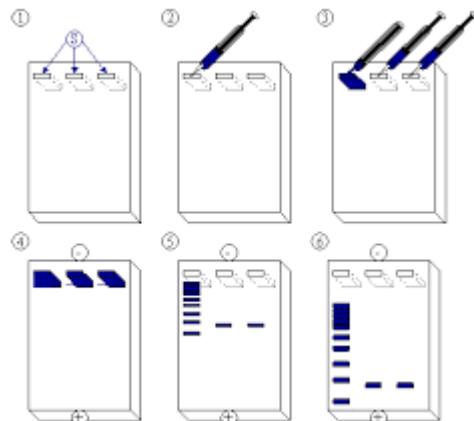
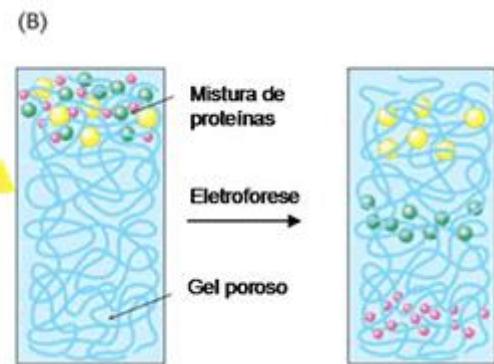
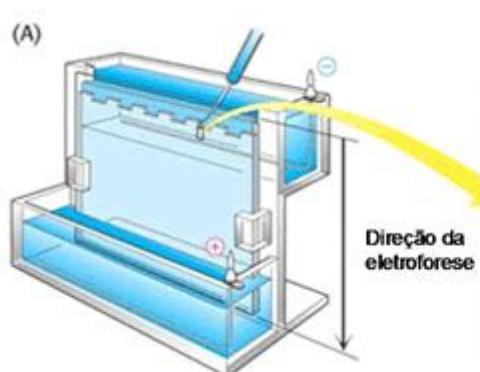
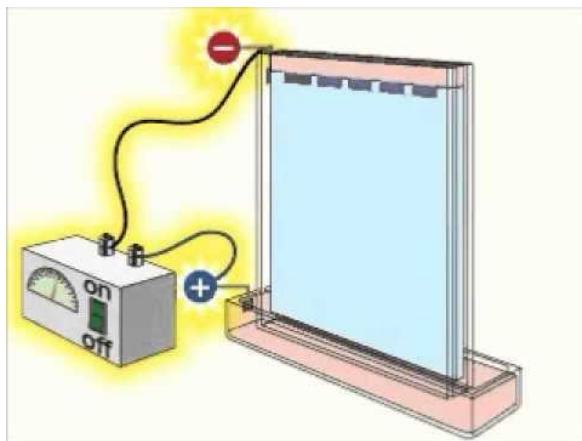
- A eletroforese é um processo de separação de partículas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular quando submetidas a um campo elétrico.
-
- * a carga da molécula depende do PH do meio e pode ser influenciada (movimentada) pelo campo eletromagnético.

Aparelho

- Pode ser usado na vertical ou na horizontal.



Aparelho

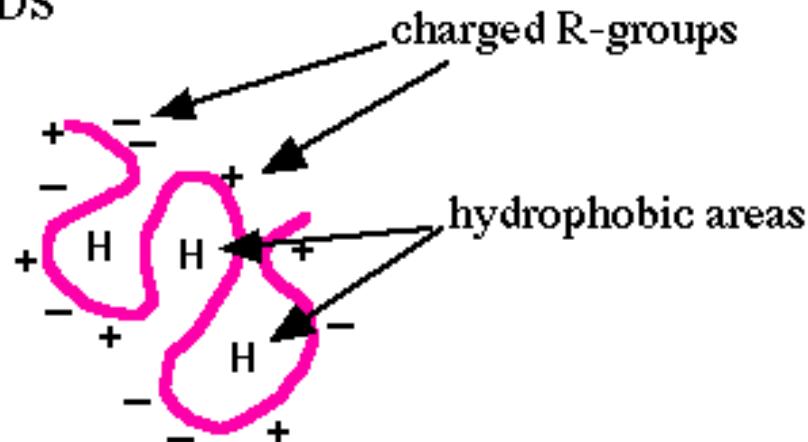


Preparando a amostra

- As proteínas em geral são encontradas em um alto nível de enovelamento.
- Temos que uniformizar a carga da proteína para que possamos separá-las na eletroforese.
- Então usamos um detergente para uniformizar as cargas das proteínas chamado SDS- PAGE.

SDS-PAGE

BEFORE SDS

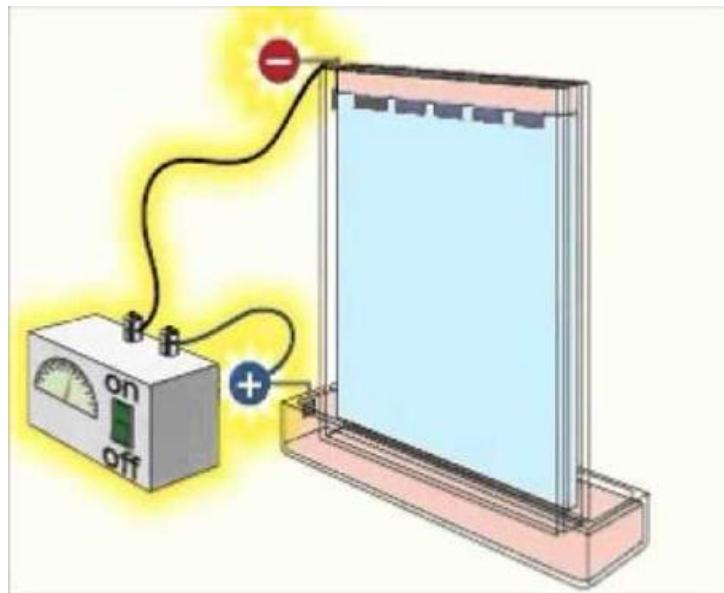


AFTER SDS



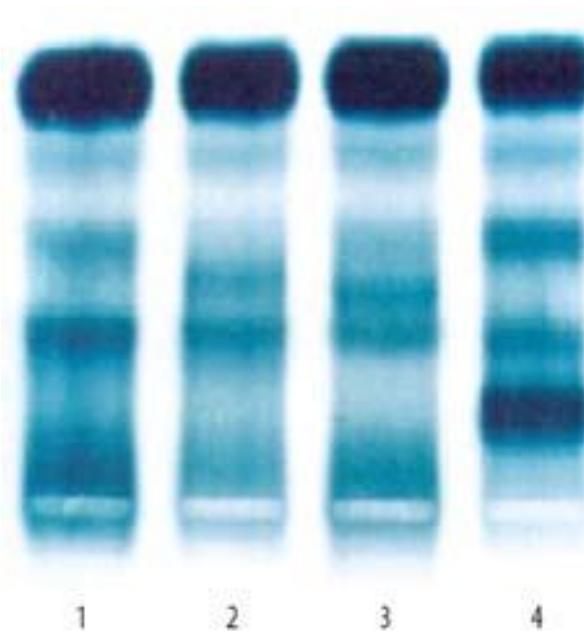
Procedimento

- No processo, separamos o meio de suporte, a bandeja em que o gel (agar) estará inserido e preparamos os poços inserindo a amostra.



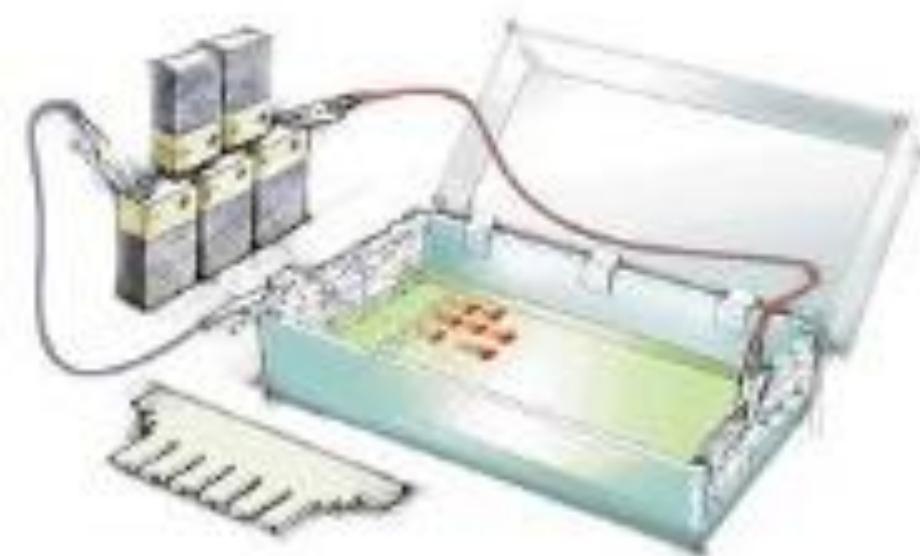
Procedimento

- É necessário que as amostras tenham corante cuja finalidade é indica-las no processo eletroforético.



Procedimento

- Para a criação de um campo magnético que separe a amostra é necessário a passagem da corrente elétrica através do gel, por isso esse material é embebido em uma solução tampão.



Cargas

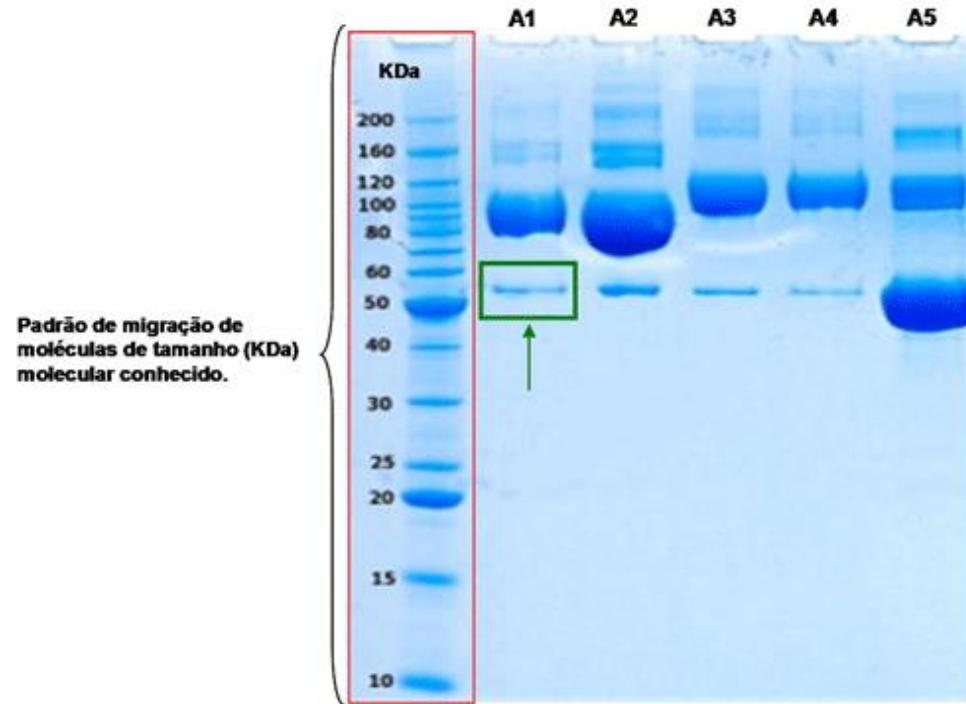
- Os opositos se atraem!

amostras negativas migrarão para:
polo positivo ----- ânodo

amostras positivas migrarão para:
polo negativo ----- catodo

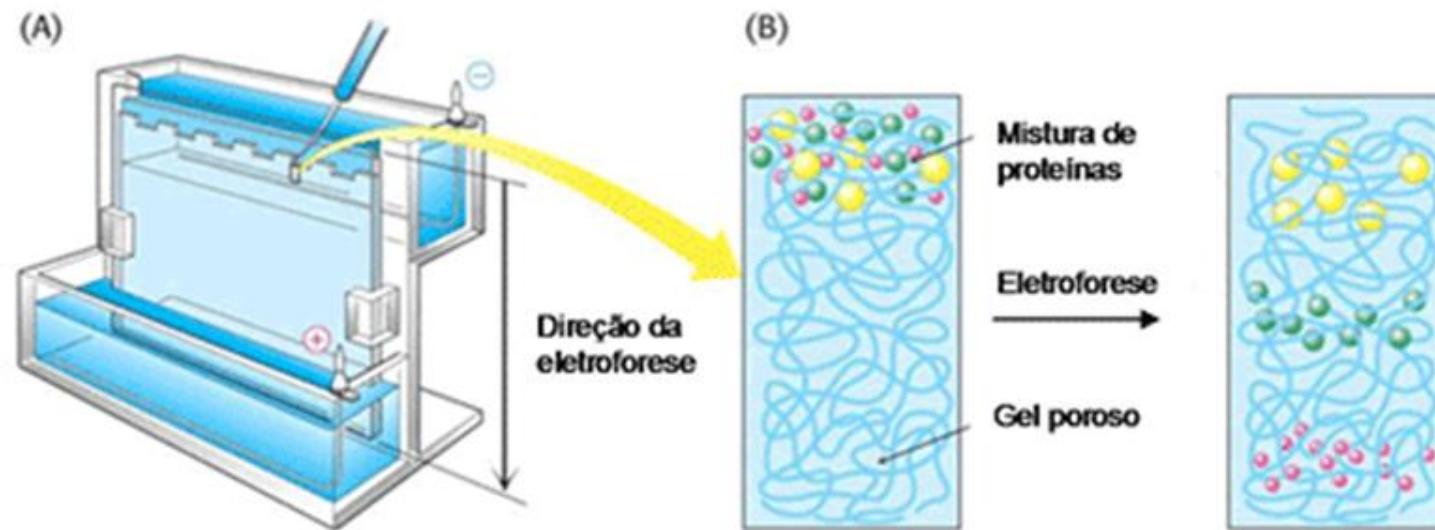
Procedimento

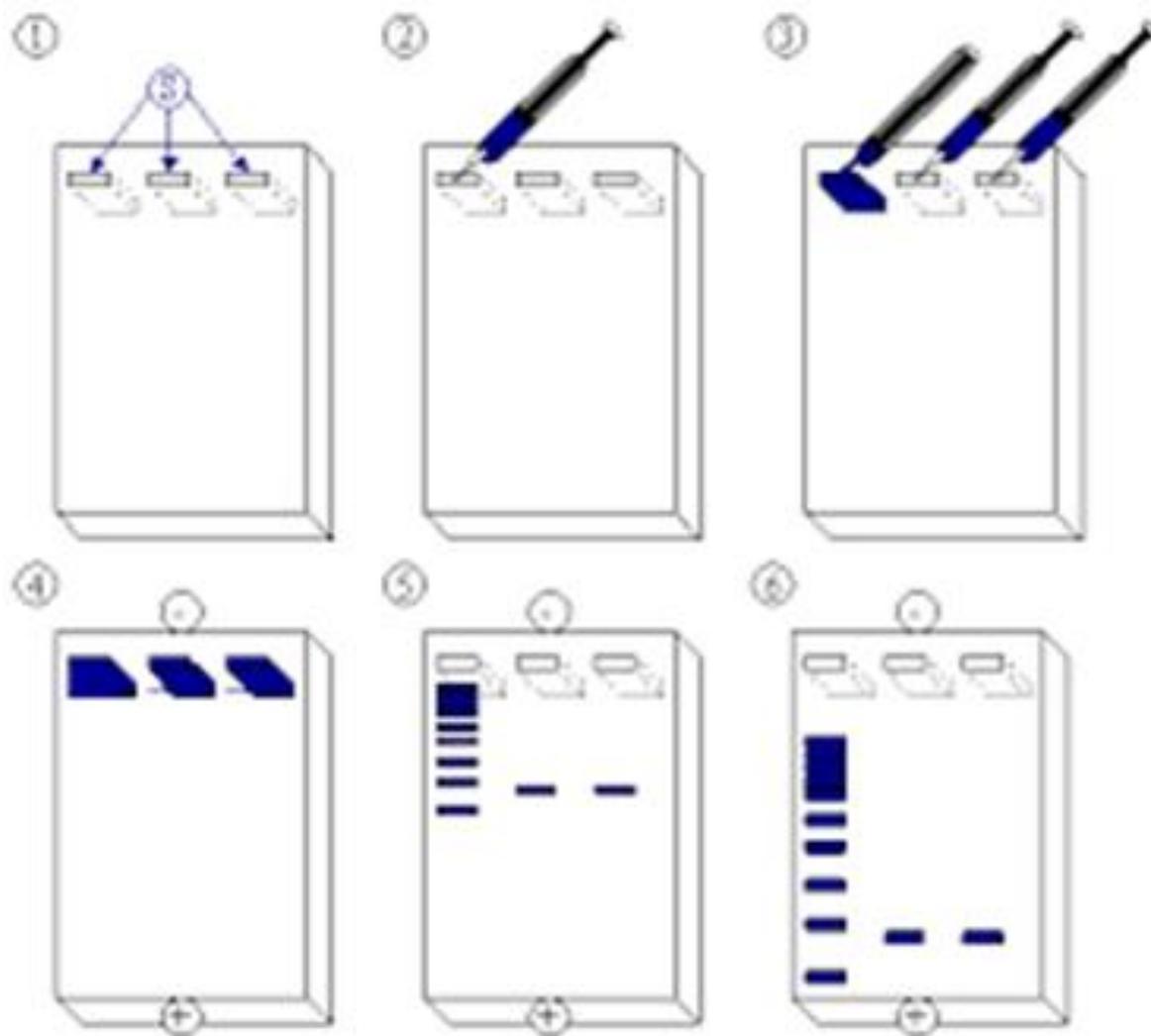
- A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância dos fragmentos conhecidos que percorreram no mesmo gel (valor de referência).



O que separa as moléculas?

- O que separa as moléculas é o gel (agar) e a corrente elétrica, mas só são capazes de se movimentar somente quando submetidas à um campo elétrico.





Géis

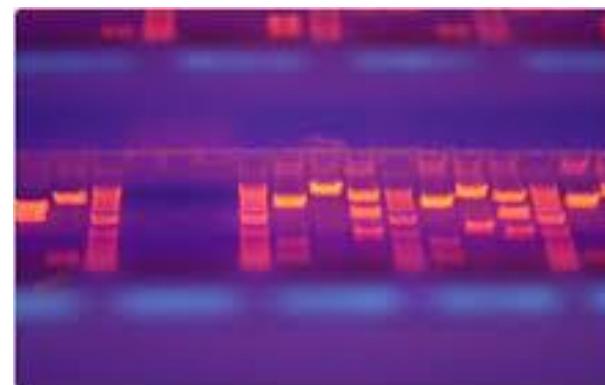
- Existem vários tipos de géis ,Gel de amido, ágar e agaróse, celulose, poliacrilamida, bisacrilamida e etc.

DNA: usamos o gel de agarose.

Proteínas: usamos o gel de poliacrilamida.

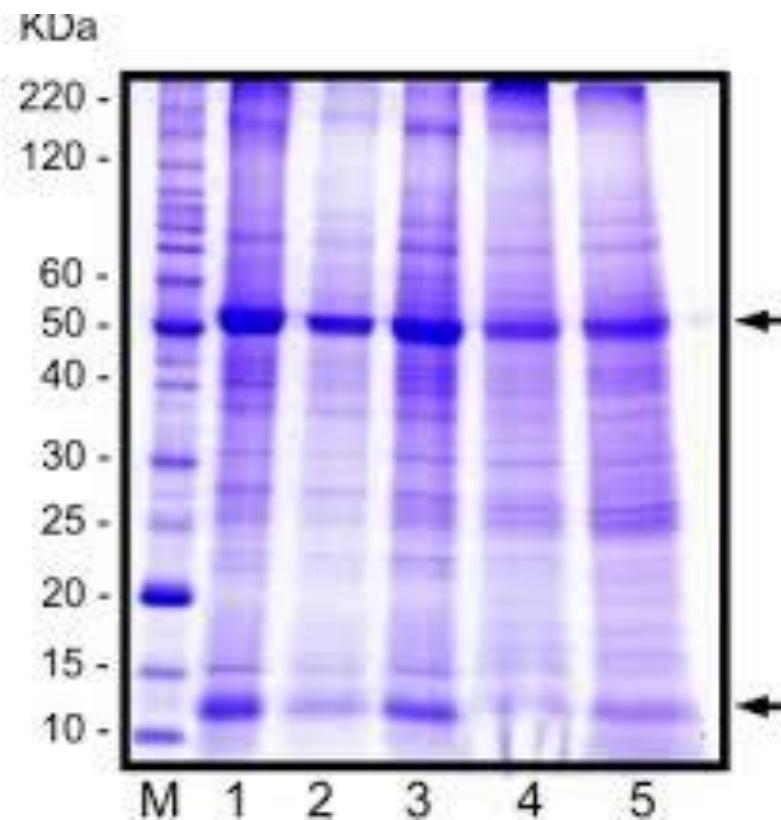
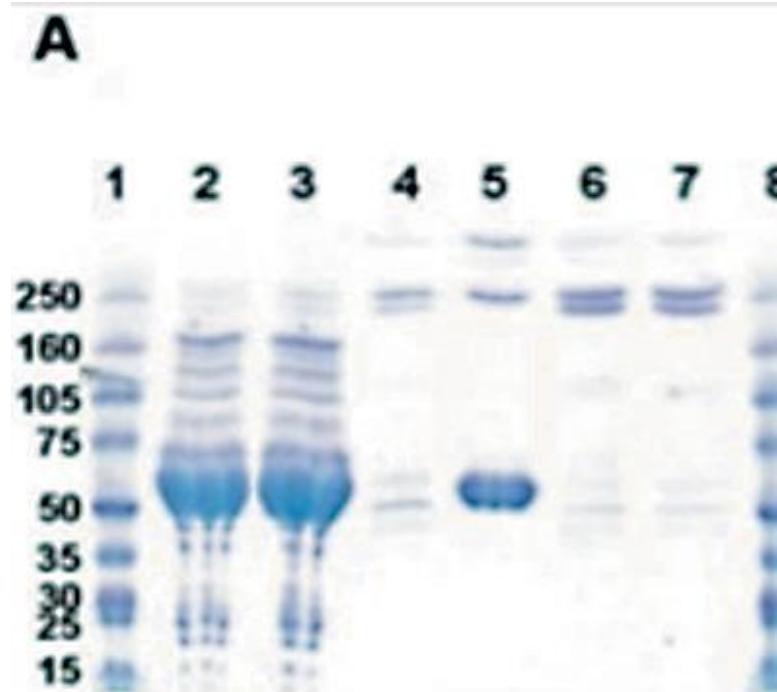
Corantes

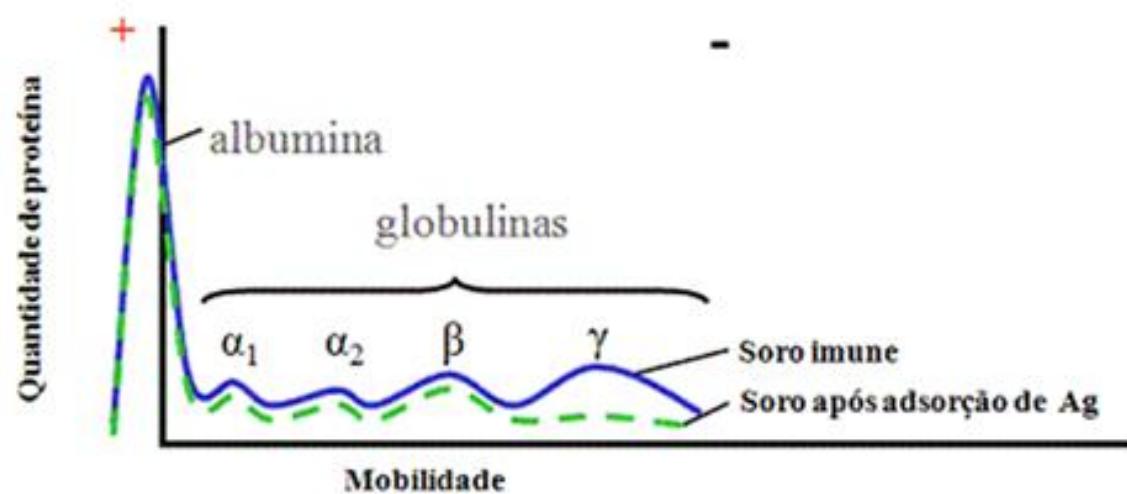
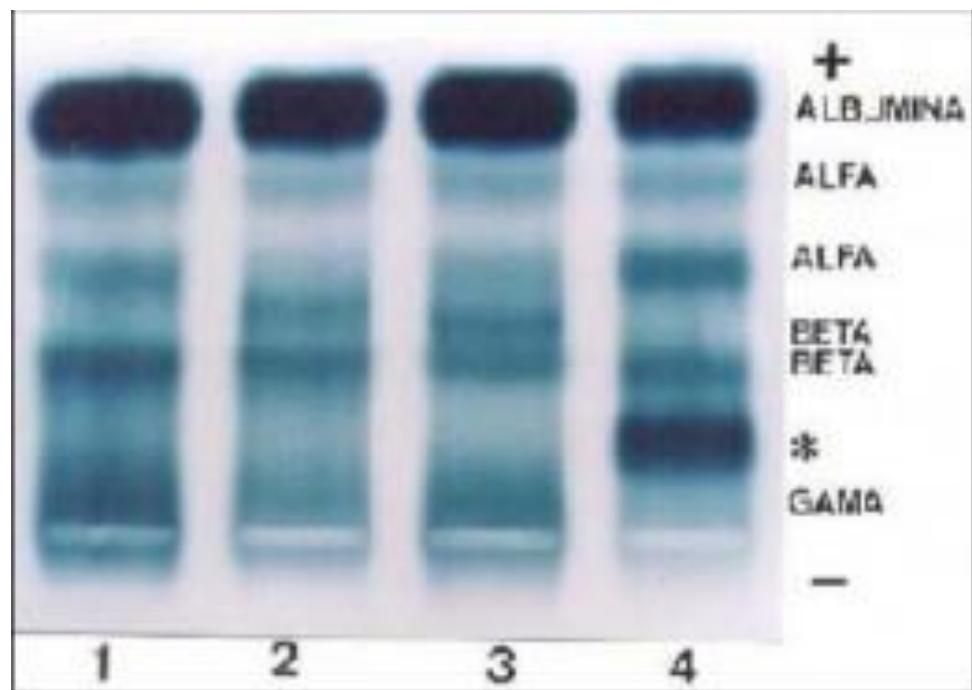
- Importante
 - *DNA: usamos o corante brometo de etídio (em raios UV emite fluorescência).
 - *Proteínas: usamos o corante azul de bromofenól.



Voltagem e análise

Marcador de peso molecular





Aplicações

Determinação das propriedades químicas do DNA, RNA e proteínas.

Determinação do grau de pureza de uma amostra.

Diagnóstico molecular de patógenos (antes e depois).

Caracterização molecular.

Importante

Curvas de calibração: é necessário que o aparelho seja calibrado e preparado antes de ser utilizado para que não ocorra erros analíticos.

As curvas oferecem valores de referência para serem analisados e comparados.

