**Roteiro para a aula pratica de enzimologia (27/03/2015) – Eletroforese SDS PAGE**

**1) Preparo do gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)**

O gel é montado entre placas de vidro (16 x 18cm) com 3 mm de espessura. O tampão da corrida é feito de acordo com a tabela 1. O aparelho é ajustado para 150 V e 50 mA.

Tabela 1. Reagentes utilizados na preparação do tampão de corrida.

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagentes**  | **Massa (g)/Volume (ml)** |
| Tris | 3,028g |
| Glicina  | 18,76g |
| SDS ( 10%) | 10 ml |

O gel é preparado em duas fases, que consiste em gel concentrador e separador, preparados com os componentes descritos na tabela 2.

Tabela 2. Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador e separador.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Soluções** | **Gel concentrador****5%** | **Gel separador****12%** |
| Água | 9,9 ml | 10,9 ml |
| Acrilamida 30% | 12 ml | 2,7 ml |
| Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 | 7,5 ml | - |
| Tris-HCl 1,0 M pH 6,8 | - | 2,0 ml |
| SDS 10% (p/v) | 0,3 ml | 0,16 ml |
| Persulfato de amônio 10% (p/v) | 0,3 ml | 0,16 ml |
| TEMED | 0,012 ml | 0,016 ml |

 As amostras para as corridas eletroforéticas são preparadas em frascos eppendorf de 0,5 mL, colocando 50 µL de amostra e 10 µL de tampão da amostra. Os frascos são levados à fervura, por 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras são cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador. O tampão da amostra é preparado de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra

|  |  |
| --- | --- |
| **Reagentes** | **Volume (ml)** |
| Tris-HCl M pH 6,8 | 2,0 |
| SDS 10 % (p/v) | 4,0  |
| β-Mercaptoetanol | 2,0  |
| Glicerol | 5,0  |
| Azul de Bromofenol | 10 mg |

 Após o azul de bromofenol aparecer na extremidade inferior do gel, o aparelho é desligado e o gel retirado da cuba. As bandas proteicas presentes no SDS-PAGE são visualizadas após a coloração.