SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE LACASES POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

OBJETIVOS

Estudo de procedimentos de separação e recuperação de enzimas por cromatografia de permeação em gel. Identificação de uma enzima de interesse entre outras proteínas desconhecidas.

PROCEDIMENTO

Cromatografia em coluna de exclusão por tamanho

Caracterização inicial da mistura de proteínas sob análise

1. O primeiro procedimento deve incluir a determinação da absorvância a 280 nm da mistura de proteínas recebida para caracterização.

2. Determine também a atividade de lacase na mistura recebida, como segue:

2.1. Branco para zerar o espectrofotômetro

0,25 mL de água

0,65 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0

0,1 mL de ABTS 1 mM em água

zerar para leitura em 420 nm

2.2. Mistura de reação

0,25 mL de extrato na diluição usada (normalmente 0,25:25 e 0,25:25 novamente, ou seja 1:10.000)

0,65 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0

0,1 mL de ABTS 1 mM >>> Quando adicionar o ABTS, disparar o cronômetro e agitar com a tampa

Ler a absorvância a 420 nm após 2 min de reação.

Purificação por cromatografia

3. Inicie o procedimento de ajuste da coluna de permeação em gel recebida no laboratório através da eliminação de quase todo o líquido visível acima do limite de gel. Adicione cerca de 10 mL de eluente (tampão citrato de sódio pH 5,0) e repita a operação.

4. Quando o líquido acima do limite de gel for da ordem de 0,2 mL adicione 1 mL da amostra recebida e deixe eluir. Imediatamente comece a coletar frações de 2 mL com o auxílio de pequenas provetas. Quando o líquido acima do gel for da ordem de 0,2 mL, adicione mais 1 mL de tampão citrato pH 5,0. Novamente deixe eluir até cerca de 0,2 mL acima do limite do gel. Adicione mais 1 mL de tampão.

5. Adicione lentamente cerca de 10 mL de tampão e mantenha o nível de eluente sempre no topo da coluna.

6. Continue coletando frações de 2 mL. Cada fração coletada deve ser transferida para um tubo de ensaio devidamente numerado.

7. De cada uma das frações coletadas deverá ser usada uma alíquota de 1 mL para a determinação da absorvância em 280 nm lida contra branco que contenha somente tampão citrato pH 5,0. Das mesmas amostras, use uma alíquota para determinar a atividade de lacase, conforme indicado no item 2.1 e 2.2.

TÓPICOS PARA ESTUDO

Lacases

Purificação de proteínas por cromatografia

INFORMAÇÕES SOBRE O RELATÓRIO

Introdução

Aborde sobre Lacases e suas aplicações. Aborde sobre purificação de enzimas por cromatografia. **NÃO FAÇA CÓPIA DE OUTROS RELATÓRIOS OU DE TEXTOS PRONTOS.** Uma introdução **não deve conter mais do que 5 parágrafos**

Resultados e Discussão

a) Prepare, antes da aula, uma tabela para recolher os dados de número de frações versus determinação de absorvância em 280 nm e em 420 nm (após reação com ABTS).

b) Construa gráficos com os dados obtidos onde as absorvâncias devem estar no eixo y e o volume das frações no eixo x.

c) Determine quando é o momento de terminar a cromatografia ainda durante a realização do experimento.

d) De posse dos resultados identifique quantas proteínas haviam na mistura e qual delas é a lacase. Indique qual(is) fração(ões) permeada(s) na coluna seria(m) usada(s) para a obtenção da lacase. Considere dois cenários para essa escolha: **a)** máximo de enzima recuperada, independentemente da pureza; **b)** maior nível de pureza da enzima.

e) Calcule qual a porcentagem de lacase seria recuperada em cada uma das situações descritas no item "d".

Bibliografia

- Industrial Enzymology, Godfrey T. e West S (eds), 1996; - Bioquímica, Lehninger ou Bioquímica, Voet - capítulo sobre enzimas; Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis, Copeland, R.A., 2000, Cap. 5; Enzymology Labfax, Engel PE, Hames BD, Rickwood D, 1996, cap. 3