

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Apostila de reposição das aulas práticas  
2020/2021**

**Bioquímica Experimental  
QBQ 0316**

**Professores:** Eduardo M. R. Reis, Nubia Carolina  
M. Varon, Nicolas Carlos Hoch, Ohara Augusto

**Os protocolos que constam desta disciplina foram  
originalmente desenvolvidos por:** Bayardo B.  
Torres, Iolanda M. Cuccovia, Maria Terêsa Machini,  
Pedro Soares de Araújo, Remo Trigoni Jr., Sandro R.  
Marana

## Prática 1 (vídeo demonstrativo)

### Lise de células de levedura para experimentos de purificação e dosagem da enzima $\alpha$ -glicosidase

#### Objetivos

Romper as células de *Saccharomyces cerevisiae* e obter o lisado clarificado (citossol)

#### Reagentes

- água destilada
- células de levedura (fase log tardia)
- etanol
- fluoreto de  $\alpha$ -fenilmetilsulfonila (**PMSF**) 100 mM em etanol
- hipoclorito de sódio 20 g/L (água sanitária)
- tampão fosfato 100 mM pH 7,0 com EDTA 5 mM (tampão de lise)

#### Materiais

- banho de gelo
- pérolas de vidro 0,5 mm  $\varnothing$
- pipetadores
- Pipetas
- Provetas
- suporte para tubos
- tubos plásticos para centrifuga (tipo Falcon<sup>®</sup>)

#### Aparelhagens

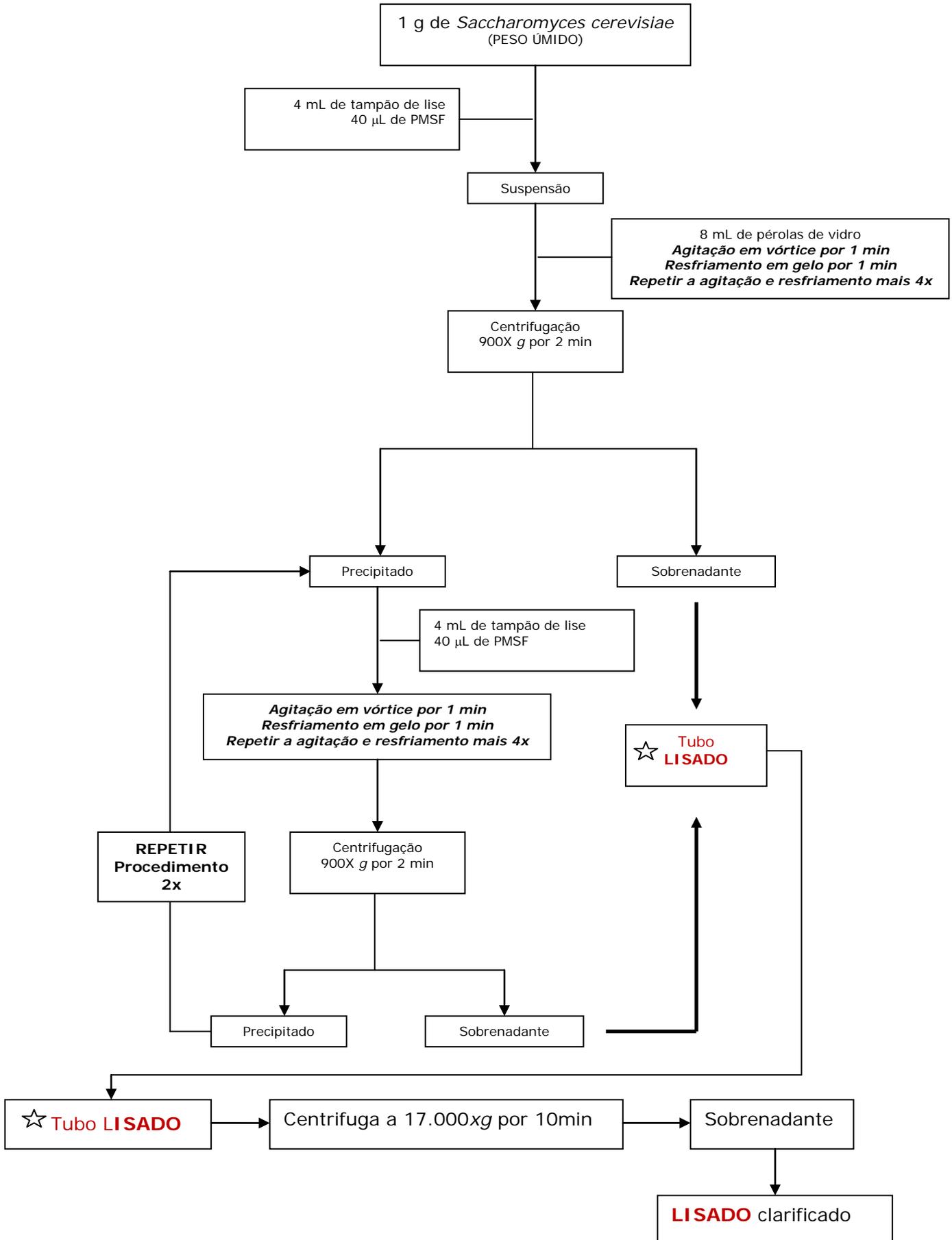
- centrífuga
- estufa
- freezer
- vórtice

#### Fracionamento celular

<b>OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO</b>
--

1. Vocês receberão em um tubo de centrifuga com tampa aproximadamente 1 g (peso úmido) de células de leveduras crescidas até a fase logaritmica tardia.
2. Adicionar 4 mL de tampão de lise ao tubo.
3. Ressuspender as células usando um vórtice.
4. Adicionar 40  $\mu$ L de **PMSF** (100 mM) em etanol.
5. Homogeneizar em vórtice.
6. Adicionar à suspensão 8 mL de pérolas de vidro lavadas e secas.
7. Agitar *ininterruptamente* em vórtice durante 1 min (*processo de lise*).
8. Resfriar em banho de gelo por 1 min
9. **Repetir as etapas 7 e 8 por mais 4 vezes.**
10. Centrifugar a suspensão de células + pérolas de vidro a 900xg por 2 min.
11. Remover cuidadosamente o sobrenadante– **evitar coletar o material precipitado** – passando-o para um tubo Falcon<sup>®</sup> limpo e identificado como **LISADO**.
12. Manter o tubo “LISADO” em banho de gelo.
13. Ressuspender o precipitado + pérolas de vidro em 4 mL de tampão de lise.
14. Adicionar 40  $\mu$ L de PMSF (100mM) em etanol.
15. Homogeneizar em vórtice.
16. **Repetir as etapas 7 a 15 duas vezes reunindo os sobrenadantes no mesmo tubo “LISADO”.**
17. Centrifugar o **LISADO coletado** a 17.000xg por 10 min.
18. Transferir o sobrenadante do **LISADO clarificado** para um tubo falcon.
19. Determinar o volume aproximado do **LISADO clarificado** observando a graduação do tubo falcon.
20. Homogeneizar bem o lisado e dividir em 3 alíquotas de igual volume e transferi-las para tubos plásticos tipo Falcon<sup>®</sup>.
21. **Identificar claramente os tubos com o número do grupo.**
22. Deixar os tubos Falcon devidamente marcados com o número do grupo no gelo para que, ao final da aula, a técnica recolha-os e armazene em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

# FLUXOGRAMA



**Procedimento B – Lavagem das pérolas de vidro**  
**(Executado por monitores ou técnica)**

1. Transferir as pérolas de vidro para um erlenmeyer.
2. Adicionar hipoclorito de sódio no erlenmeyer.
3. Agitar algumas vezes durante 15 min.
4. Descartar cuidadosamente o hipoclorito de sódio
5. Repetir a lavagem com hipoclorito de sódio.
6. Adicionar água no erlenmeyer
7. Lavar as pérolas.
8. Descartar cuidadosamente a água.
9. Repetir as etapas 6 a 8 por mais 5 vezes.
10. Adicionar etanol no erlenmeyer.
11. Colocar o erlenmeyer numa estufa.
12. Aguardar a secagem das pérolas.

**ATIVIDADES\_1**

**1. Examine o protocolo para se familiarizar com cadernos de laboratório, assista ao vídeo do experimento e em seguida, responda as questões abaixo:**

- a) O que é lise celular e como as células de *Saccharomyces cerevisiae* foram lisadas?
- b) O tampão de lise contém EDTA e ao tampão foi adicionado PMSF (fluoreto de  $\alpha$ -fenilmetilsulfonila). Qual a função desses reagentes?
- c) Depois da adição das pérolas de vidro e da agitação com vortex repetidas vezes, a mistura foi centrifugada a 900 g por 2 min. O que é centrifugação?
- d) Depois da primeira centrifugação a 900 g você deve ter notado no tubo, um precipitado e um sobrenadante. Qual a provável composição desse precipitado e desse sobrenadante?
- e) Depois de separar o sobrenadante, adicionou-se mais tampão de lise e mais PMSF e repetiu-se a agitação com vortex repetidas vezes e a centrifugação a 900 g. Por que o procedimento foi repetido?
- f) Os sobrenadantes coletados de todas as centrifugações a 900 g colocados num mesmo tubo foram centrifugados a 17.000 g. Ao final dessa centrifugação, você deve ter notado no tubo, um precipitado e um sobrenadante. Qual a provável composição desse precipitado e desse sobrenadante?
- g) Por que o sobrenadante da centrifugação a 17.000 g foi reservado para os próximos experimentos?

# Prática 2 (vídeo demonstrativo)

## Purificação de proteínas – cromatografia de troca iônica

### Objetivo

Enriquecer a  $\alpha$ -glicosidase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* empregando a cromatografia de troca iônica.

### Observação

Em condições usuais, o primeiro passo para purificar a  $\alpha$ -glicosidase do lisado clarificado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a precipitação com sulfato de amônio, mas nas circunstâncias atuais optamos por ir direto para um método mais específico, a cromatografia de troca iônica.

### Reagentes

-água destilada  
-solução de NaCl 1M  
-tampão fosfato 10 mM pH 6,8  
-DEAE-Sephadex

### Materiais

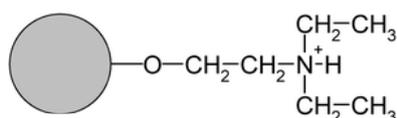
-tubos de ensaio  
-seringa  
-bastão de vidro  
-lã de vidro  
-pipetadores  
-presilha  
-microplacas de 96 poços

### Aparelhagem

-vórtice  
-leitorna de placas

## Procedimento A – Hidratação da DEAE-Sephadex®

*(Executado por monitores ou técnica)*



Matriz

Dietilaminoetil

Matriz=Sephadex= dextrana com ligações cruzadas

1. Pesar 0,5 g de DEAE-Sephadex em um béquer.
2. Adicionar 100 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,8.
3. Misturar bem utilizando um bastão de vidro.
4. Decantar de um dia para o outro.

## Procedimento B – Montagem da coluna de troca iônica

*(Executado por monitores ou técnica)*

### Montagem da coluna

1. Utilizar o barril de uma seringa (~ 20 mL) como suporte da resina.
2. Prender a seringa em um suporte.
3. Colocar um pouco de lã de vidro no seu interior.
4. Compactar a lã de vidro na base utilizando um bastão de vidro.
5. Lavar a coluna com água destilada para retirar fragmentos de lã de vidro.
6. Adaptar um tubo de plástico de aproximadamente 6 cm na saída da seringa.
7. Fechar o tubo de plástico com uma presilha.

### Processo de empacotamento

8. Fechar a presilha.
9. Homogeneizar com um bastão de vidro a suspensão contendo a resina (*Procedimento A*).
10. Adicionar a suspensão até a marca de 1,0 mL.
11. Deixar decantar.
12. Repetir essa operação até a resina sedimentada ocupar o interior da seringa até 1,0 mL.
13. Com a resina empacotada, lavá-la com 20 mL de tampão fosfato 10 mM **sem NaCl**.
14. Após a lavagem, fechar a presilha.
15. Deixar 3 mm de tampão acima do topo da resina. **NUNCA DEIXAR A RESINA SECAR.**

## Procedimento C – Cromatografia de troca iônica.

### Preparação da amostra

1. Descongelar a fração P2 dialisada **e medir seu volume**. Se o volume for menor que 0,5 ml completar para 0,8 ml com tampão fosfato 10 mM sem NaCl. Homogenizar bem com vortex.
2. Reserve 0,1 ml da amostra num **tubo MARCADO: Lisado** com o número do grupo para dosar a quantidade de proteína e de atividade de enzima que será aplicada na coluna.

### Cromatografia

Aplicação da amostra na coluna de troca-iônica.

3. Verificar se a presilha está fechada e o **tampão ao nível do menisco** (cerca de 3 mm acima do topo da coluna).
4. Utilizar uma pipeta para transferir 0,7 ml da amostra para a coluna, encostando a pipeta na parede da coluna (**anote o volume efetivamente aplicado na coluna**).

**Nas etapas seguintes você fará a eluição do material aplicado usando tampão sem NaCl e com NaCl 1M. A cada acréscimo de tampão as amostras deverão ser coletadas em microtubos de centrifugação (tipo Eppendorf®) numerados de 1 a 20.**

5. Colocar o tubo 1 na saída da coluna e abrir a presilha.
6. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina (**menisco**).
7. Fechar a presilha e transferir o tubo 1 para o gelo.  
**Eluição das proteínas não retidas pela coluna**
8. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **sem NaCl** (2 mL).
9. Colocar o tubo 2 na saída da coluna e abrir a presilha permitindo que o tampão flua pela resina.
10. Coletar 1 mL em cada tubo de eppendorf.
11. Trocar o tubo de ensaio e sempre adicionar mais 1 mL de tampão.
12. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 8.
13. Adicionar **cuidadosamente** mais 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
14. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
15. **Ao final da coleta do tubo 10, o tampão deverá estar cerca de 3mm acima do topo da resina (menisco).**

#### **Eluição das proteínas retidas pela coluna**

16. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **com NaCl 1M** (2,0 mL).
17. Abrir a presilha e permitir que o tampão elua pela resina.
18. Coletar 1,0 mL em cada tubo eppendorf.
19. Trocar o tubo de ensaio e sempre adicionar mais 1 mL de tampão
20. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 18.
21. Adicionar 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
22. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
23. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 20. **Não deixar a coluna secar.**

## Procedimento D – Identificação das frações que contêm a $\alpha$ -glicosidase

### MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Mantenha as 20 frações (tubos coletados) no gelo. Em paralelo, prepare outro conjunto de tubos numerados de 1 a 20. Adicionar em cada tubo 0,2 mL de **NP $\alpha$ Glc** e **transferir os tubos para o gelo**.
2. Adicionar em cada um destes tubos 0,2 mL das frações coletadas durante a cromatografia.
3. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho de 30°C.
4. Incubar os tubos por **10 min**.
5. Ao remover os tubos, adicionar em cada um 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
6. Agitar manualmente.
7. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**

8. Ler as absorvâncias a 420 nm **em leitora de placa**. Para isso pipetar 200  $\mu\text{L}$  de amostra em cada pocinho da placa. Pipetar também 200  $\mu\text{L}$  do tampão utilizado e usar como branco. Anotar o valor do branco e descontar da leitura de absorvância das amostras.
9. Completar a **Tabela 1**.

**Tabela 1**

Tubos	A <sub>420nm</sub>	Tubos	A <sub>420nm</sub>
Branco			
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

10. Uma vez identificados os tubos que contém atividade enzimática, reunir o conteúdo dos tubos (frações eluídas da cromatografia) com maior atividade enzimática em um tubo "Falcon" identificado como **MATERIAL DEAE**. **O volume do material DEAE deve ser anotado para cálculos posteriores.**

## ATIVIDADES\_2

1. **Examine o protocolo para se familiarizar com cadernos de laboratório, assista ao vídeo do experimento e em seguida, responda as questões abaixo:**

- a) Um experimento igual ao mostrado no vídeo forneceu os dados mostrados na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1**

Tubos	A <sub>420nm</sub>	Tubos	A <sub>420nm</sub>
Branco	0,05		
1	0,02	11	0,08
2	0,01	12	0,65
3	0,05	13	1,23
4	0,04	14	0,75
5	0,03	15	0,43
6	0,01	16	0,28
7	0,04	17	0,23
8	0,05	18	0,10
9	0,06	19	0,11
10	0,03	20	0,13

Utilizando os dados experimentais mostrados faça um cromatograma (A<sub>420</sub> versus tubos coletados). Quais tubos você separaria como material DEAE? Qual seria o volume final aproximado do material DEAE coletado?

- b) Considerando as condições cromatográficas utilizadas e o resultado do experimento, qual deve ser o pI aproximado da  $\alpha$ -glicosidase da *Saccharomyces cerevisiae*?
- c) O material DEAE coletado pode ser submetido a um SDS-PAGE? Justifique detalhadamente sua resposta.

# Prática 3 (vídeo demonstrativo)

## Dosagem da atividade enzimática da alfa-glicosidase e concentração de proteínas no material DEAE e no lisado

### Objetivos

1. Comparar a concentração de atividade enzimática da alfa-glicosidase no lisado e no material DEAE.
2. Determinar a concentração de proteínas no lisado e no material DEAE.
3. Determinar a atividade específica de alfa-glicosidase (*mU/mg*) do lisado e do material DEAE.
4. Calcular a recuperação e o enriquecimento da atividade de alfa-glicosidase após a cromatografia de troca iônica.

### Reagentes

água destilada  
albumina 0,2 g/L  
**lisado de leveduras**  
**material DEAE**  
reagente de Bradford  
ácido fosfórico 85%  
Coomassie Blue G<sup>®</sup>  
*p*-nitrofenil- $\alpha$ -glicosídeo  
(NP $\alpha$ Glc) 4 mM em tampão  
fosfato 100 mM pH 7,0  
tampão carbonato-  
bicarbonato 250 mM  
pH 11,0

### Materiais

papel de filtro  
microplaca de 96 poços  
pipetadores  
tubos de ensaio  
pipetas  
ponteiros  
suportes para tubos de ensaio

### Aparelhagem

Leitora de placas  
vórtice  
banho a 30°C

### Procedimento A – Determinação da atividade enzimática

#### MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Diluição para **o lisado: 10 x**

Diluição para o **material DEAE: não diluir**

Todos os tubos deste ensaio podem ser montados simultaneamente, iniciando o procedimento sempre pela adição do substrato. Somente quando todos os tubos já tiverem recebido o substrato deverá ser iniciada a adição do sobrenadante do lisado previamente diluído.

#### 1. Preparar os tubos em banho de gelo.

2. Adicionar em cada tubo os volumes de NP $\alpha$ -Glc estipulados nas **Tabelas 1 (lisado), 2 (material DEAE) e 3 (branco de substrato)**.
3. Adicionar em cada tubo o lisado ou o material DEAE devidamente diluídos.
4. Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.
5. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados nas **Tabelas 1, 2 e 3**.
6. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato- bicarbonato pH 11,0.
7. Agitar manualmente.

#### 8. Deixar os tubos em temperatura ambiente.

9. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, transferir 200  $\mu$ L de cada tubo para um poço de microplaca e ler as absorbâncias a 420 nm.
10. Utilizando a curva de *p*-nitrofenolato apresentada no anexo 1, completar as **Tabelas**

**4 e 5.**

11. Com os dados obtidos, determinar a concentração de atividade enzimática de  $\alpha$ -glicosidase (U/mL) presente no sobrenadante do lisado e no material DEAE.

**Tabela 1 – lisado**

tubos	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	Sobrenadante do lisado diluído (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
1 LIS	0,2	0,2	5
2 LIS	0,2	0,2	10
3 LIS	0,2	0,2	15
4 LIS	0,2	0,2	20
BE	agua	0,2	20

**Tabela 2 – Material DEAE**

tubos	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	material DEAE (mL)	tempo (min)
1 DEAE	0,2	0,2	5
2 DEAE	0,2	0,2	10
3 DEAE	0,2	0,2	15
4 DEAE	0,2	0,2	20
BE	H <sub>2</sub> O	0,2	20

**Tabela 3 - Branco de substrato**

tubo	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	Água destilada (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
Branco de Substrato	0,2	0,2	20

**Tabela 4 – Lisado**

tubos	A <sub>420</sub>	nmols de produto	Tempo (min)
1 LIS			
2 LIS			
3 LIS			
4 LIS			
BE			

**Tabela 5 – Material DEAE**

tubos	A <sub>420</sub>	nmols de produto	Tempo (min)
1 DEAE			
2 DEAE			
3 DEAE			
4 DEAE			
BE			

**Procedimento B – Dosagem de proteínas**

1. **Diluição do lisado: 100x.**

O material DEAE **não** deve ser diluído

2. Adicionar em cada tubo os volumes de albumina, lisado diluído ou material DEAE e água estipulados nas **Tabelas 1** (curva de calibração) e **2** (amostras).

**Importante:** fazer os tubos do lisado diluído e material DEAE em triplicata

3. Adicionar o reagente de Bradford.
4. Homogeneizar em vórtice.
5. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente
6. Transferir 200 uL para microplaca de 96 poços
7. Ler as absorvâncias a 595 nm.
8. Utilizando a curva de padrão de albumina apresentada no anexo 2, completar as **Tabelas 3 e 4**.

**Tabela 3 – Absorbância amostras e cálculo de massa de proteínas**

Tubos	Abs (595 nm)	diluição	Massa de proteína (mg)
branco			
Lis1			
Lis2			
Lis3			
DEAE1			
DEAE2			
DEAE3			

**Tabela 4 – Cálculo da concentração de proteínas**

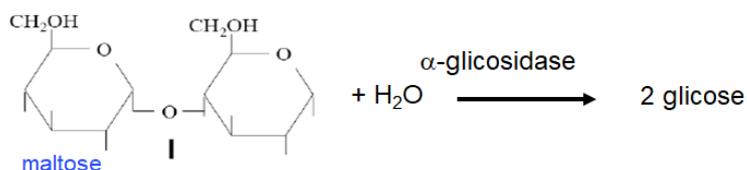
amostra	Media $A_{595}$	Massa de proteína (mg)	Volume da amostra (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)
Lisado				
DEAE				

## Anexo 1

### Curva padrão para dosagem do produto da reação catalisada pela $\alpha$ -glicosidase

#### Fundamentos

Relembramos que uma **curva-padrão** é utilizada para determinar **quantitativamente** uma propriedade de uma amostra desconhecida a partir de uma amostra com propriedade conhecida. A enzima  $\alpha$ -glicosidase catalisa a hidrólise da ligação  $\alpha$ -glicosídica de sacarídeos como mostrado abaixo para o dissacarídeo maltose.

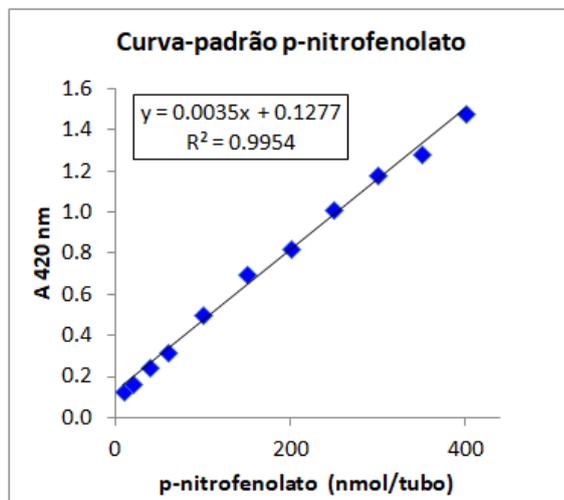


Devido as complexidades metodológicas para acompanhar o consumo e a formação de sacarídeos, acompanhamos a atividade da enzima usando um substrato artificial, o *para*-nitrofenil- $\alpha$ -glicosídeo



8	250	1,018
9	300	1,183
10	350	1,290
11	400	1,485

Os dados da Tabela 2 forneceram a curva padrão que relaciona a absorvância a 420 nm com a quantidade de p-nitrofenolato (nmoles/tubo).



## Anexo 2

### Curva padrão para dosagem de proteínas

#### Fundamentos

A concentração de proteínas em uma amostra complexa como um lisado celular é comumente determinada a partir de um método colorimétrico, o **ensaio de Bradford**. O reagente *Coomassie Brilliant Blue*, presente no reagente de Bradford, se torna azul ao se ligar principalmente aos aminoácidos básicos (Lys e Arg) das proteínas. Desta forma, ao se medir as absorvâncias de diferentes quantidades de uma amostra conhecida (em geral albumina bovina (BSA)) no comprimento de onda 595 nm (azul) com um **espectrofotômetro (ou leitora de placas)** estabelecemos a relação que existe entre a Abs a 595 nm e a quantidade de proteínas. Com essa relação, poderemos estimar a concentração de proteínas de uma amostra desconhecida

#### Curva padrão

1. Adicionar em cada tubo os volumes de uma solução de albumina (2 g/L) e água estipulados na **Tabela 1**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente
5. Ler as absorvâncias das amostras a 595 nm no espectrofotômetro ou na leitora de placas (na leitora de placas fazer 3 leituras, **tirar a média e completar a Tabela 2**).
  - A. **No espectrofotômetro:** Transferir a amostra para cubetas apropriadas. Usar o "branco" para calibrar ("zerar") o espectrofotômetro e realizar a medidas de absorvância das amostras.
  - B. **Na leitora de placas:** Pipetar com precisão 200 µl do branco e das amostras nos pocinhos da placa em triplicata. Anotar a absorvância do branco e descontar da absorvância observada nas amostras.

**Tabela 1**

tubos	albumina 0,2 g/L (µL)	água (µL)	reagente de Bradford (mL)
-------	--------------------------	--------------	------------------------------

branco	0	100	1,0
1	10	90	1,0
2	20	80	1,0
3	30	70	1,0
4	40	60	1,0
5	50	50	1,0
6	60	40	1,0
7	70	30	1,0
8	80	20	1,0

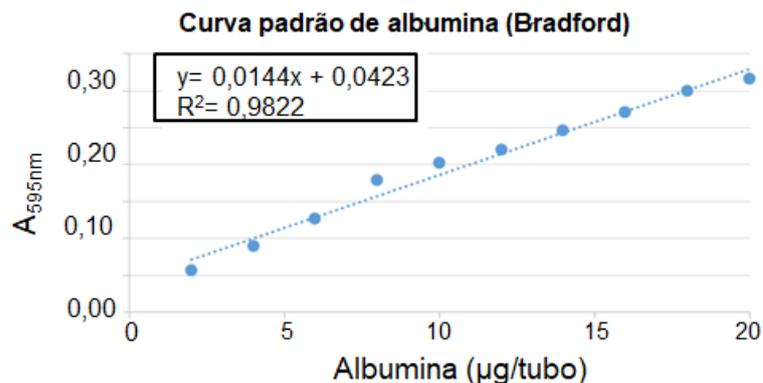
## Resultados

Colocamos abaixo, os resultados obtidos por um monitor do curso QBQ-0316 de 2019.

**Tabela 2**

Albumina (µg/tubo)	Absorbância (595nm)				Absorbância Média - Bco média
	1	2	3	Média	
Branco	0.248	0.248	0.255	0.250	-
2	0.310	0.306	0.306	0.307	0.057
4	0.342	0.338	0.339	0.340	0.089
6	0.380	0.376	0.374	0.377	0.126
8	0.430	0.429	0.427	0.429	0.178
10	0.457	0.452	0.447	0.452	0.202
12	0.477	0.470	0.465	0.471	0.220
14	0.500	0.497	0.492	0.496	0.246
16	0.517	0.525	0.522	0.521	0.271
18	0.543	0.557	0.551	0.550	0.300
20	0.567	0.572	0.559	0.566	0.316

Os dados da Tabela 2 forneceram a curva padrão que relaciona a absorbância a 595 nm com a quantidade de albumina (µg/tubo).



## ATIVIDADES\_3

**1. Examine o protocolo para se familiarizar com cadernos de laboratório, assista ao vídeo do experimento e em seguida, responda as questões abaixo.**

O professor fornecerá as diluições empregadas nos ensaios e os resultados obtidos nos experimentos realizados no vídeo. Complete as Tabelas pertinentes com os resultados fornecidos e determine:

- (i) a concentração de atividade enzimática de  $\alpha$ -glicosidase (U/mL) presente no lisado e no material DEAE.
- (ii) a concentração de proteínas (mg/mL) no lisado no material DEAE.
- (iii) a atividade específica de  $\alpha$ -glicosidase ( $mU/mg$ ) no lisado e no material DEAE.
- (iv) a recuperação e o enriquecimento da atividade de  $\alpha$ -glicosidase após a cromatografia de troca iônica.

## Prática 4 (vídeo demonstrativo)

Caracterização da alfa-glicosidase:  $K_m$  e  $V_{max}$

### Objetivos

Caracterizar a  $\alpha$ -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* através das determinações da afinidade ( $K_m$ ) da enzima pelo substrato (*p*-nitrofenol- $\alpha$ -glicosídeo) e da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) de hidrólise do substrato.

### Reagentes

água destilada

### lisado de levedura

NP $\alpha$ Glc 1,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

NP $\alpha$ Glc 2,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

NP $\alpha$ Glc 8,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH 11,0

tampão fosfato 100 mM pH 7,0

### Materiais

banho de gelo

Placas de leitura

pipetadores

pipetas

ponteiras

suporte para tubos de ensaio

tubos de ensaio

### Aparelhagens

banho 30°C

Leitora de placas

vórtice

### Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

**OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO**

#### Consulte as técnicas/professores sobre a diluição a ser realizada

Abaixo segue o procedimento **sugerido** para a diluição da preparação do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Transferir 0,1 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado com **L10X**.
2. Adicionar 0,9 mL de água destilada gelada.
3. Homogeneizar SUAVEMENTE.
4. Transferir 0,5 mL de L10X para um novo tubo identificado com **L100X**.
5. Adicionar 4,5 mL de água destilada gelada.
6. Homogeneizar SUAVEMENTE.

### Procedimento B – Medidas de velocidade da reação de hidrólise do substrato

**OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO**

1. Adicionar em cada tubo os volumes de NP $\alpha$ Glc estipulados na **Tabela 1**.
1. **ATENÇÃO: prestar atenção nas diferentes concentrações de substrato.**
2. **Preparar os tubos em banho de gelo.**
3. Adicionar em cada tubo os volumes de tampão e lisado (devidamente diluído) estipulados na
4. **Tabela 1.** Agitar manualmente com cuidado.
5. Transferir todos os tubos do gelo para o banho a 30°C
6. Incubar todos os tubos por **30 min.**
7. Remover todos os tubos do banho.

8. Adicionar 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
9. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
10. Homogeneizar em vórtice ou manualmente.
11. Transferir 200  $\mu$ L para microplaca de 96 poços.
12. Ler as absorbâncias a 420 nm.

**Tabela 1**

tubos	NP $\alpha$ Glc 1,0 mM (mL)	NP $\alpha$ Glc 2,0 mM (mL)	NP $\alpha$ Glc 8,0 mM (mL)	tampão fosfato 100 mM pH 7 (mL)	lisado diluído (mL)
1	0,02	-	-	0,28	0,10
2	0,04	-	-	0,26	0,10
3	0,08	-	-	0,22	0,10
4	0,12	-	-	0,18	0,10
5	0,16	-	-	0,14	0,10
6	0,20	-	-	0,10	0,10
7	-	0,16	-	0,14	0,10
8	-	0,20	-	0,10	0,10
9	-	-	0,10	0,20	0,10
10	-	-	0,13	0,17	0,10
11	-	-	0,15	0,15	0,10

**Tabela 2**

tubos	[S] (no tubo de ensaio) (mM)	$A_{420nm}$	nmols de produto	Tempo da reação (min)	Velocidade (nmol/min)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

#### Atividades\_4

**1. Examine o protocolo para se familiarizar com cadernos de laboratório, assista ao vídeo do experimento e em seguida, responda as questões abaixo.**

a) O professor fornecerá os valores das absorbâncias a 420 nm obtidos nos experimentos realizados no vídeo. Com esses dados, complete a Tabela 2 acima e:

(i) construa um gráfico de velocidade *versus* concentração do substrato.

(ii) construa um gráfico de  $1/v$  *versus*  $1/[S]$ .

(iii) determine o valor de  $V_{max}$  e de  $K_m$   $\alpha$ -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* atuando sobre (hidrolisando) o *p*-nitrofenol- $\alpha$ -glicosídeo.

