

Departamento de Bioquímica – Instituto de Química - USP

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

QBQ 1453 Integral, 2023

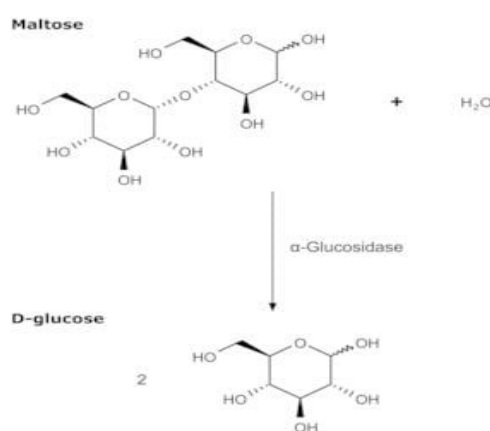
Professores

Graziella Eliza Ronsein

Maria Terêsa Machini

Monitora

Yuli Serna Torres



Os protocolos que constam nesta apostila foram originalmente desenvolvidos por:

Bayardo B. Torres
Graziella E. Ronsein
Iolanda M. Cuccovia
M. Terêsa Machini
Pedro S. de Araújo
Remo Trigoni Jr.
Sandro R. Marana
Sayuri Miyamoto

Prática 1: Lise de Células de Levedura

Objetivos

Romper as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

água destilada
células de levedura (fase log tardia)
etanol
fluoreto de α -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 de centrífuga
tubos de ensaio
tubos Falcon

Aparelhagem

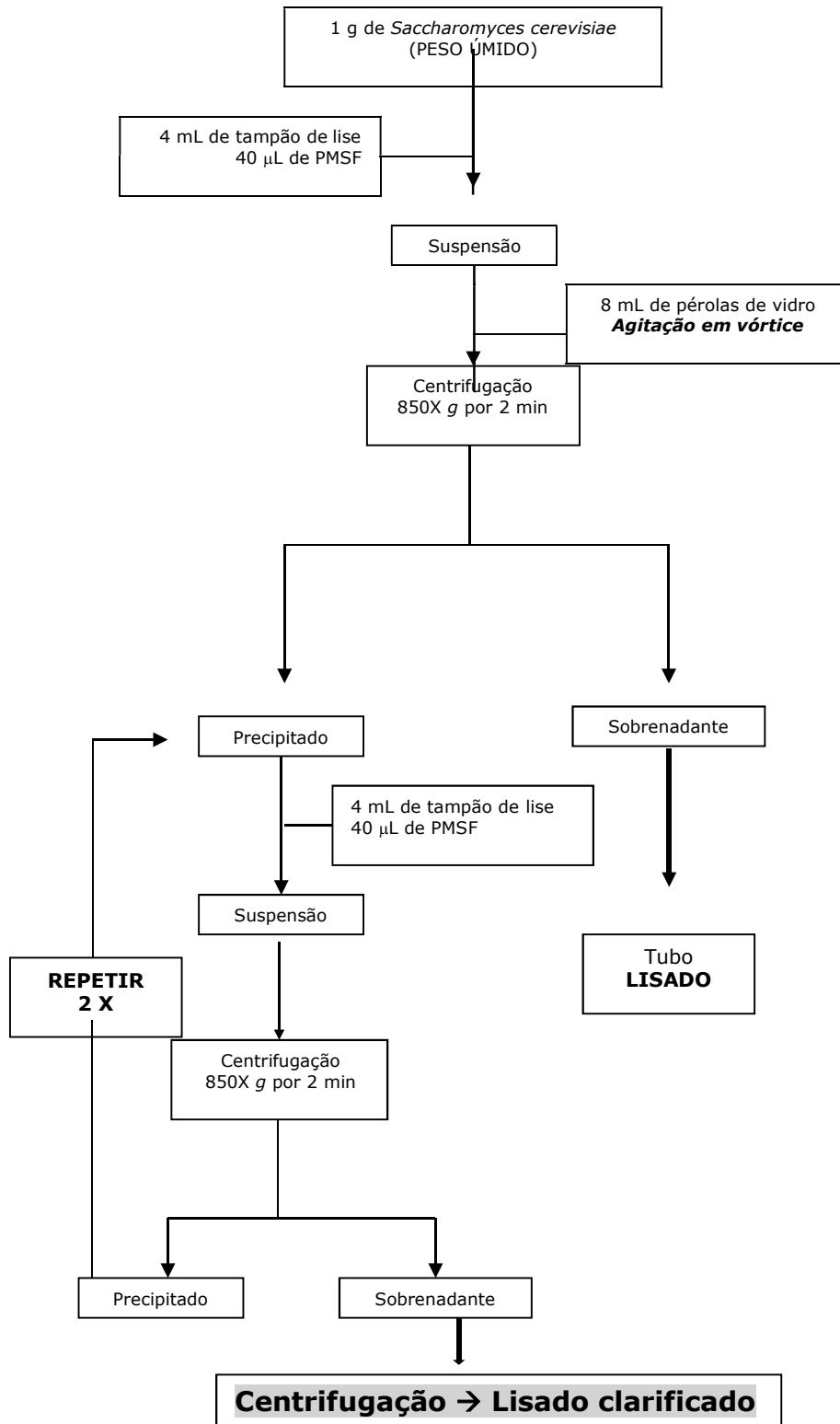
centrífuga
estufa
freezer
vórtice

Procedimento A – Fracionamento celular

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Em um tubo de centrífuga com tampa colocar aproximadamente 1 g (peso úmido) de células de leveduras crescidas até a fase logarítmica tardia.
2. Adicionar 4 mL de tampão de lise.
3. Ressuspender as células usando um vórtice.
4. Adicionar 40 μ 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 operações 7 e 8 por mais 4 vezes.**
10. Centrifugar a suspensão de células + pérolas de vidro a 850xg por 2 min.
11. Remover cuidadosamente o sobrenadante – **evitar coletar o material precipitado** – passando-o para um tubo Falcon® 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 μ L de PMSF (100mM) em etanol.
15. Homogeneizar em vórtice.
16. **Repetir duas vezes as etapas 7 a 15**, reunindo o sobrenadante no mesmo tubo “LISADO”.
17. Centrifugar o **LISADO** a 17.000xg por 5 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®.
21. **Identificar os tubos com o número do grupo.**
22. Armazenar em freezer a -20°C .

FLUXOGRAMA



Prática 2: Dosagem das proteínas presentes no lisado

Objetivos

Dosar colorimetricamente proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

água destilada
albumina 2 mg/mL
lisado de leveduras (**P1**)
reagente de Bradford
ácido fosfórico 85%
Coomassie Blue G[®]
metanol

Materiais

papel de filtro
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiras
suportes para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagem

espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Curva-padrão de proteína e dosagem de proteínas no lisado

1. Preparo da **curva padrão de albumina**

Importante: homogeneizar suavemente a solução padrão de albumina antes de cada diluição.

Microtubo	BSA (µL)	H ₂ O (µL)	Volume final (µL)
1	50 uL solução estoque (2 mg/mL)	150	200
2	80 uL solução estoque (2 mg/mL)	320	400
3	200 uL do tubo 2	200	400
4	200 uL do tubo 3	200	400
5	200 uL do tubo 4	200	400
6	200 uL do tubo 5	200	400
Branco	-	200	200

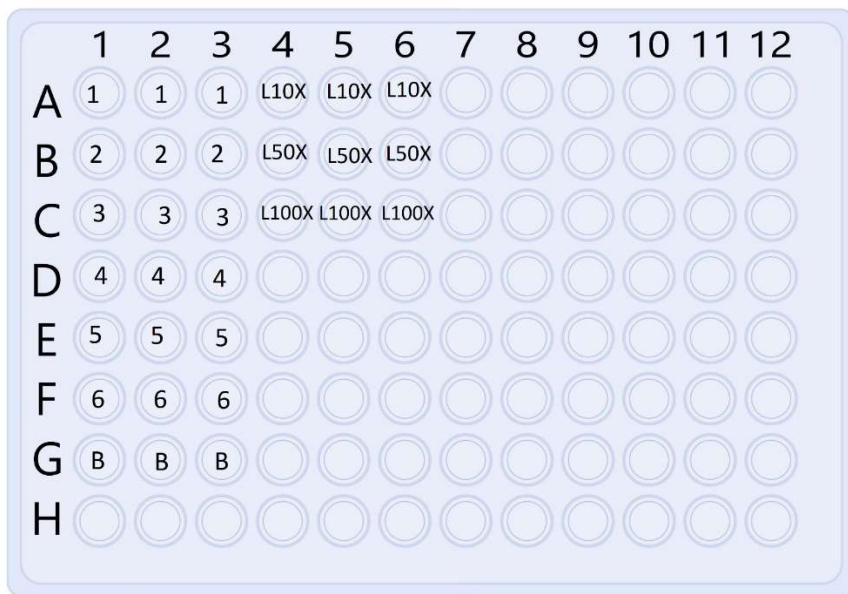
2. Preparo de **diferentes diluições do lisado** conforme tabela abaixo:

Importante: agitar em vórtice antes de cada diluição.

Microtubo	Lisado	Água (µL)
10x	100 µL	900
50x	100 µL do 10x	400
100x	100 µL do 10x	900

3. Em uma placa de 96 poços, adicionar, em triplicata, 10 uL de cada ponto da curva do item 1 e 10 uL das diluições do lisado preparadas no item 2.
4. Adicionar 200 uL do reagente de Bradford.

Importante: evitar fazer bolhas, ou destruir as bolhas com papel alumínio.



5. Aguardar 5 minutos (temperatura ambiente)

6. Ler as absorbâncias a 595 nm.

Atenção: fazer a leitura de duas maneiras:

a) lendo a absorbância de todos os poços

b) usando os poços do branco para zerar o aparelho

Importante: Tirar fotos das leituras para o tratamento de dados.

OBSERVAÇÃO: Caso a absorbância das amostras experimentais esteja fora dos limites das absorbâncias obtidas na curva-padrão. Discuta com o professor ou monitor um novo valor de diluição.

Prática 3: Determinação de atividade enzimática do lisado

Observação importante: para grupos com problemas na determinação de proteínas do lisado, é possível repetir o experimento hoje.

Objetivo

Determinar a atividade da α -glicosidase no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

Reagentes

água destilada
lisado de leveduras
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α Glc) 4 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM
pH 11,0

Materiais

banho de gelo
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiros
suportes para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagens

banho a 30°C
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Construção da curva de calibração de *p*-nitrofenolato

Em uma série de tubos, pipete conforme o indicado na Tabela abaixo:

tubos	<i>p</i> -nitrofenol 2 mM (μ L)	H ₂ O (μ L)	Tampão Bicarbonato (ml)	ABS (405nm)
Bco	0	200	2	
1	5	195	2	
2	10	190	2	
3	20	180	2	
4	30	170	2	
5	50	150	2	
6	75	125	2	
7	100	100	2	
8	125	75	2	
9	150	50	2	
10	175	25	2	
11	200	0	2	

Após pipetar a curva, homogeneizar cada tubo suavemente e reserve em um local seguro.

Atenção: após completar o procedimento C abaixo, os tubos da curva de calibração acima devem ser novamente homogeneizados e 200 μ L de cada tubo da curva de calibração devem ser transferidos para a microplaca para leitura junto com os tubos de atividade enzimática

Procedimento B- Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

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

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

1. Transferir 0,2 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado como **L10X**.
2. Adicionar 1,8 mL de água destilada gelada.
3. Homogeneizar suavemente
4. Transferir 0,4 mL de L10X para um novo tubo identificado como **L50X**.
5. Adicionar 1,6 mL de água destilada gelada.

6. Homogeneizar suavemente
7. Transferir 0,2 mL de L50X para um novo tubo identificado como **L500X**.
8. Adicionar 1,8 mL de água destilada gelada.
9. Homogeneizar suavemente
10. Manter todos os tubos no gelo

Procedimento C - Determinação da atividade da α -glicosidase do lisado

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Este procedimento deve ser feito para **cada uma das diferentes diluições** do lisado que foram preparadas. Todos estes ensaios 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 das diferentes diluições de lisado.

1. Preparar os tubos em banho de gelo.

2. Adicionar em cada tubo os volumes de NP α Glc estipulados na **Tabela 1 e 2**.
3. Adicionar em cada tubo o lisado devidamente diluído.
4. Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.
5. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 1**.
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. Usar a água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
10. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, transferir 200 μ L para uma microplaca e ler as absorbâncias a 420 nm.
11. Observação: não esqueça de pipetar também a curva de calibração feita no procedimento A para leitura na microplaca.
12. Completar a **Tabela 3**.

Tabela 1

tubos	NP α Glc 4 mM (mL)	lisado diluído (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
1	0,2	0,2	5
2	0,2	0,2	10
3	0,2	0,2	15
4	0,2	0,2	20
Branco de Enzima	agua	0,2	20

Tabela 2

Basta preparar este tubo apenas uma única vez, mesmo quando se trabalha com diferentes diluições do lisado

tubo	NP α Glc 4 mM (mL)	H ₂ O (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)	Abs _{420nm}
Branco de Substrato	0,2	0,2	20	

Tabela 3

tubos	L10x A ₄₂₀	L50X A ₄₂₀	L500x A ₄₂₀
1			
2			
3			

4			
Branco de Enzima			
Branco de Substrato			

Prática 4: Simulação computacional da purificação de proteínas

Objetivo

Assimilar os fundamentos das diferentes técnicas cromatográficas empregadas na purificação de proteínas e simular tentativas de purificação de algumas delas.

Procedimento:

Cada grupo deverá tentar purificar uma proteína. As proteínas são identificadas por números, assim a proteína indicada para cada grupo é definida pelo "número do grupo" +1. Logo, o grupo 1 deverá purificar a proteína 2, já o grupo 2 deverá purificar a proteína 3 e assim por diante.

Tirar foto do material inicial (perfil cromatográfico e eletroforese)

Ao final da purificação, cada grupo deverá apresentar uma lista com as informações essenciais do processo de purificação que foi desenvolvido.

São consideradas informações essenciais:

Precipitação com sulfato de amônio: concentração final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, material escolhido (sedimento ou sobrenadante)

Cromatografia de hidrofobicidade: nome da coluna, concentração inicial e final do gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, números das frações coletadas

Cromatografia de troca iônica: nome da coluna, pH, concentração inicial e final do gradiente de NaCl, números das frações coletadas

Filtração em gel: nome da coluna e números das frações coletadas.

Tirar foto da proteína purificada (perfil cromatográfico e eletroforese)

Ao final da lista, os dados de recuperação e enriquecimento deverão ser apresentados.

Exemplo para proteína 1:

Passo 1 – Precipitação com sulfato de amônio

Concentração inicial: 0 – concentração final: 50%

Material escolhido: sedimento

Passo 2 – Cromatografia de hidrofobicidade

Coluna: Phenyl sepharose

Concentração inicial: 1,7 M – Concentração final: 0

Frações coletadas: 50 a 53

Passo 3 – Cromatografia de troca iônica

Coluna: Q sepharose

Concentração inicial: 0 – Concentração final: 1M

Frações coletadas: 12 a 15

Cálculos de Recuperação final: **mostrar como fez e os valores obtidos:**

97,5% (8389U); Enriquecimento: 19,2 X (330,8 U/mg)

Prática 5:

Purificação de proteínas – cromatografia de troca iônica

Objetivo

Isolar a alfa-glicosidase utilizando resina de troca iônica.

Procedimento A – Hidratação da DEAE-Sephadex

(Executado por monitores ou técnica)

8. Pesar 0,5 g de DEAE-Sephadex em um béquer.
9. Adicionar 100 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,8.
10. Misturar bem utilizando um bastão de vidro.
11. 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 uma mangueira de aproximadamente 6 cm na saída da pipeta.
7. Fechar a mangueira 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 DEIXE A RESINA SECAR.**

Procedimento C – Cromatografia de troca iônica

Preparação da amostra

1. Descongelar o lisado, transferir uma alíquota de 1,5 mL para um tubo "tipo eppendorf" de 2 mL e centrifugar a 10.000xg por 15 s. Coletar o sobrenadante e usar nas etapas abaixo.
2. Parte do material (0,4 mL) será usada na cromatografia abaixo, enquanto que o restante (0,6 mL) deverá ser guardado (congelado) para a próxima aula prática.

Cromatografia

3. Diluir 0,4 mL do **sobrenadante do lisado (ver etapa 1)** adicionando 0,6 mL de tampão fosfato 10 mM **sem NaCl**. **É muito importante que apenas o sobrenadante do lisado seja usado para evitar "entupimento" da coluna.**
 4. Verificar se a presilha está fechada.
 5. Utilizar uma pipeta para transferir toda a amostra (devidamente diluída) homogeneamente para a coluna.
 6. Colocar o tubo 1 na saída da coluna e abrir a presilha.
 7. Deixar a amostra escoar pela coluna até cerca de 3 mm acima do topo da resina.
 8. Fechar a presilha e transferir o tubo 1 para o gelo.
- ##### **Eluição das proteínas não retidas pela coluna**
9. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **sem NaCl** (2 mL).
 10. Colocar o tubo 2 na saída da coluna e abrir a presilha permitindo que o tampão flua pela resina.

11. Coletar 1 mL em cada tubo de ensaio.
12. Trocar o tubo de ensaio e sempre adicionar mais 1 mL de tampão.
13. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 8.
14. Adicionar **cuidadosamente** mais 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
15. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
16. Ao final da coleta do tubo 10, o tampão deverá estar cerca de 3mm acima do topo da resina.
Eluição das proteínas retidas pela coluna
17. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **com NaCl** (2,0 mL).
18. Abrir a presilha e permitir que o tampão flua pela resina.
19. Coletar 1,0 mL (mililitro) em cada tubo de ensaio.
20. Trocar o tubo de ensaio e sempre adicionar mais 1 mL de tampão
21. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 18.
22. Adicionar 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
23. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
24. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 20. Não deixar a coluna secar.

Procedimento D – Identificação das frações obtidas que contêm a α -glicosidase

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Preparar um conjunto de tubos numerados de 1 a 20. Adicionar em cada tubo 0,2 mL de NP α Glc
Transferir os tubos em banho de 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. Tirar foto dos tubos.**
8. Usar mistura tampão-água (1:1) para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
9. Ler as absorbâncias a 420 nm em leitora de placas de Elisa. **Tirar foto da placa.**
10. Completar a **Tabela 4. Tirar uma foto.**
11. Construir um gráfico Absorbância *versus* números dos tubos.
12. Uma vez identificados os tubos que contém atividade enzimática, reunir as frações (eluídas na cromatografia) correspondentes em um tubo "Falcon" identificado como **MATERIAL DEAE – Nome do grupo.**

Tabela 4

tubos	A ₄₂₀	tubos	A ₄₂₀
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Prática 6: Dosagem de atividade enzimática da α -glicosidase e de proteínas no material DEAE e no lisado

Objetivo

Comparar a concentração de atividade enzimática da alfa-glicosidase e a de proteínas no material DEAE e no lisado estocado.

Procedimento A – Determinação das atividades enzimáticas

Determinação da atividade da α -glicosidase no sobrenadante do lisado

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Deve ser utilizado o procedimento de diluição que proporcionou o melhor resultado na prática 4.

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 α Glc estipulados na **Tabela 1 e 2**.

3. Adicionar em cada tubo o sobrenadante do lisado devidamente diluído.

4. Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.

5. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 1**.

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. Tirar uma foto de todos.

9. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, transferir 200 uL de cada tubo para um poço de microplaca e ler as absorbâncias a 420 nm. **Tirar foto da placa.**

10. Completar a **Tabela 3**. **Tirar foto.**

Tabela 1

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

Tabela 2

tubo	NP α Glc 4 mM (mL)	Água destilada (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)	A ₄₂₀
Branco de Substrato	0,2	0,2	20	

Tabela 3

tubos	A ₄₂₀
1	
2	
3	
4	
BE	

11 – Com os dados obtidos determinar a concentração de atividade enzimática de α -glicosidase (U/mL) presente no sobrenadante do lisado.

Determinação da atividade da α -glicosidase no material DEAE

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Dilua 10x o MATERIAL DEAE seguindo o procedimento sugerido abaixo

Transferir 0,2 mL do MATERIAL DEAE para um tubo identificado com **DEAE-10X**.

Adicionar 1,8 mL de água destilada.

Homogeneizar suavemente

Manter no gelo

2. Adicionar em cada tubo de ensaio os volumes de NP α Glc e MATERIAL DEAE (*diluído 10x*) estipulados na **Tabela 4**. **Preparar os tubos em banho de gelo.**
3. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho a 30°C.
4. Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 5**.
5. Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
6. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
7. Uma vez que todos os quatro tubos tenham sido retirados, transferir 200 μ L de cada tubo para um poço de microplaca e ler as absorbâncias a 420 nm.
8. Completar a **Tabela 5**.
9. Calcular a atividade da α -glicosidase no Material DEAE.

Tabela 4

tubos	NP α Glc 4 mM (mL)	material DEAE (diluído 10x) (mL)	tempo (min)
1	0,2	0,2	5
2	0,2	0,2	10
3	0,2	0,2	15
4	0,2	0,2	20

Tabela 5

tubos	A ₄₂₀	nmols de produto	Tempo (min)
1			
2			
3			
4			

Procedimento B – Dosagem de proteínas

1. Preparo da curva padrão de albumina

Importante: homogeneizar suavemente a solução padrão de albumina antes de cada diluição.

microtubo	BSA (μL)	H ₂ O (μL)	Volume final (μL)
1	50 uL solução estoque (2 mg/mL)	150	200
2	40 uL solução estoque (2 mg/mL)	160	400
3	200 uL do tubo 2	200	400
4	200 uL do tubo 3	200	400
5	200 uL do tubo 4	200	400
6	200 uL do tubo 5	200	400
Branco	-	200	200

2. Preparo do lisado e material DEAE.

O material DEAE não deve ser diluído. Para o lisado, utilizar as 2 melhores diluições obtidas na prática 2, ou utilize a sugestão conforme tabela abaixo:

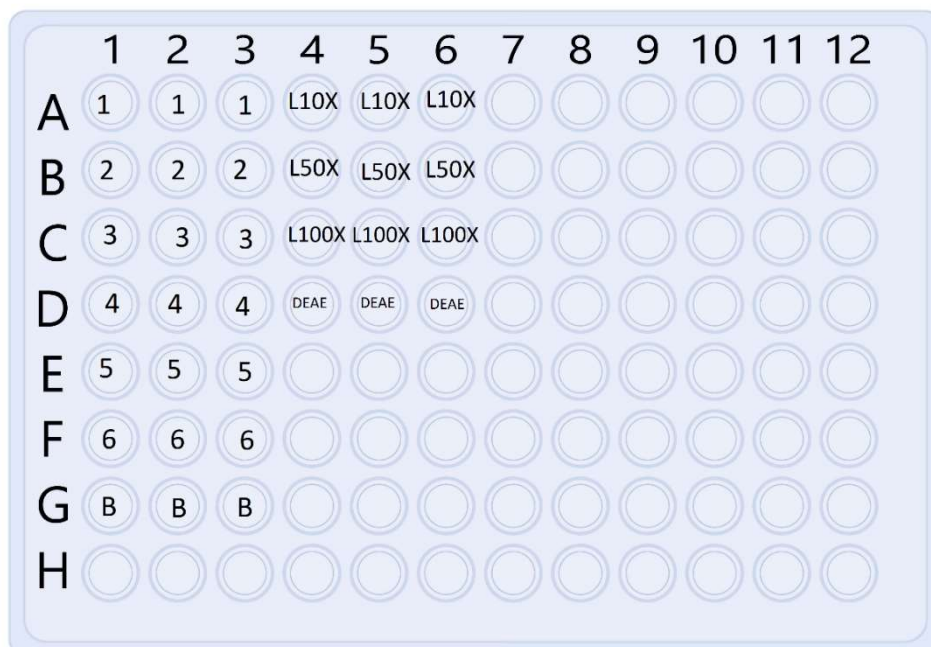
Importante: agitar em vórtice antes de cada diluição.

microtubo	Lisado	Água (μL)
10x	100 μL	900
50x	100 μL do 10x	400
100x	100 μL do 10x	900

3. Em uma placa de 96 poços, adicionar, em triplicata, 10 uL de cada ponto da curva do item 1, 10 uL das diluições do lisado preparadas no item 2 (ou suas melhores diluições conforme prática 2) e 10 uL do Material DEAE.

4. Adicionar 200 uL do reagente de Bradford.

Importante: evitar fazer bolhas, ou destruir as bolhas com papel alumínio.



5. Aguardar 5 min em temperatura ambiente

6. Ler as absorvâncias a 595 nm. **Tirar foto da placa.**

OBSERVAÇÃO: Caso a absorvância das amostras experimentais esteja fora dos limites das absorvâncias obtidas na curva-padrão. Discuta com o professor ou monitor um novo valor de diluição.

Prática 7: Diálise do lisado e material DEAE

1. Transferir para um microtubo o volume indicado de amostra.
Seguir instruções do professor, ou de acordo com a sugestão abaixo:
 - a. lisado de *Saccharomyces cerevisiae* (50 μ L);
 - b. frações eluídas na cromatografia de troca-iônica e que contém alfa-glicosidase, denominado **Material DEAE** (maior volume possível até 1 mL)
 2. Identificar o microtubo com:
 - a. Nome da amostra.
 - b. Número do grupo.
 3. Adicionar água, caso necessário, até completar 600 μ L.
 4. Cobrir o microtubo com um pedaço de membrana de diálise.
 5. Prender a membrana de diálise com um anel de borracha.
 6. Transferir o microtubo para um suporte de isopor.
 7. Colocar o suporte dentro de um béquer contendo água.
 8. Manter sob agitação por pelo menos 16 h. **Tirar foto de suas amostras.**
- Secagem a vácuo (Executado pelos monitores)***
9. Após a diálise, transferir as amostras para um concentrador a vácuo.
 10. Secar as amostras.

Prática 8: SDS-PAGE do lisado antes e após a cromatografia

Objetivos

Analisar a composição de proteínas do material que contém α -glicosidase eluído na cromatografia de troca-iônica e determinar a massa molar do material purificado

solução A

acrilamida	29,2 g
N'N'bis metilenoacrilamida	0,80 g
água qsp	100 mL

solução B

tris 1,5 M pH 8,8
(acertar valor de pH com HCl)

solução C

tris 0,5 M pH 6,8
(acertar valor de pH com HCl)

tampão de amostra

água	3,55 mL
solução C	1,25 mL
glicerol	2,50 mL
SDS 100 g/L	2,00 mL
azul de bromofenol 5 g/L	0,20 mL
β -mercaptoetanol	0,05 mL

tampão de corrida

tris	3,03 g
glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
água qsp	1 L

Obs.: Não acertar o pH desta solução tampão.

solução de coloração

Coomassie blue R [®]	0,1 g
metanol	40 mL
ácido acético	10 mL
água qsp	50 mL

solução de descoloração

metanol	40 mL
ácido acético	10 mL
água qsp	50 mL

Procedimento A – Preparação das amostras

Desnaturação das proteínas presentes nas amostras

1. Transferir para cada microtubo de diálise 20 μ L de tampão de amostra.
2. Transferir os microtubos para um banho fervente.
3. Incubar os microtubos por 5 min.
4. Retirar os microtubos.
5. Aplicar as amostras no gel de eletroforese com o auxílio de micropipetadores.

Procedimento B – Preparação do gel de SDS-PAGE (*Feito pela técnica*)

Preparação do gel de separação

1. Adicionar em um tubo os volumes estipulados na **Tabela 1**.
2. Homogeneizar rapidamente.
3. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro previamente montadas.
4. Aguardar a polimerização – cerca de 60 min.
5. Colocar o **penete** sobre entre as placas de vidro.

Preparação do gel de empilhamento

6. Após a polimerização do gel de separação, adicionar em outro tubo os volumes estipulados na **Tabela 2**.
7. Homogeneizar rapidamente.
8. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro (com o *penete*) contendo o gel de separação polimerizado.
9. Aguardar a polimerização – cerca de 40 min.
10. Após a polimerização do gel de empilhamento, retirar cuidadosamente o penete.
11. Adicionar o tampão de corrida.

Tabela 1

soluções	volume
água	4,02 mL
SDS 100 g/L	100 µL
solução A	3,33 mL
solução B	2,5 mL
TEMED	5 µL
persulfato de amônio	50 µL

Tabela 2

soluções	volume
água	3,05 mL
SDS 100 g/L	50 µL
solução A	0,65 mL
solução C	1,25 mL
TEMED	5 µL
persulfato de amônio	25 µL

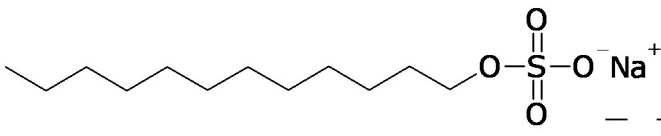
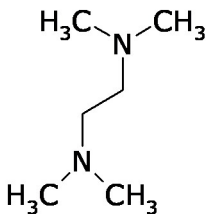
Procedimento C – Eletroforese, coloração e descoloração

1. Correr a eletroforese com 100V, durante aproximadamente 40 min.
2. Desligar a fonte quando o corante marcador de frente atingir a base do gel.
3. Desconectar os cabos.
4. Retirar o gel.
5. Colocar o gel no frasco contendo a solução de coloração.
6. Corar o gel por 40 min.
7. Retirar o gel do frasco de coloração.
8. Colocar o gel no frasco contendo a solução de descoloração.
9. Descorar o gel.
10. Visualizar as bandas de proteínas.

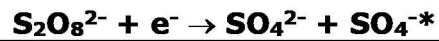
Procedimento D – Desidratação do gel (Opcional)

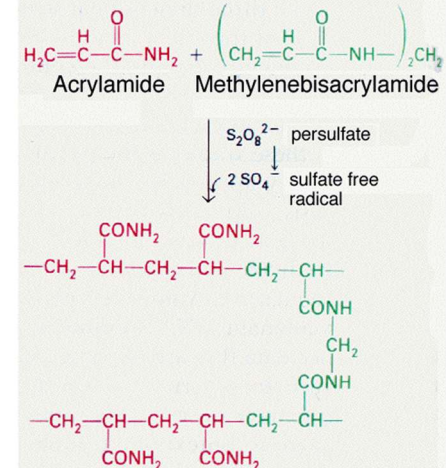
1. Colocar o gel num frasco contendo água.
2. Trocar tantas vezes quanto for necessário a água do frasco até a remoção completado ácido acético.
3. Retirar o gel hidratado do frasco com água.
4. Colocar o gel num frasco contendo solução de glicerol 50 g/L.
5. Molhar com a solução de glicerol lâminas de celofane natural
6. Dispor as folhas de celofane sobre placas **limpas** de vidro.
7. Colocar os géis sobre as lâminas de celofane devidamente hidratadas e limpas.
8. Colocar outra folha de celofane previamente hidratada sobre o gel, formando assim um sanduíche.
9. Retirar delicadamente as bolhas de ar que estiverem aprisionados pelas folhas de celofane.
10. Esticar as folhas e prendê-las.
11. Deixar secar à temperatura ambiente. **Tirar foto do gel obtido.**

FÓRMULAS ESTRUTURAIS E MASSAS MOLARES

<p>SDS (288,38 g/mol)</p> 	<p>TEMED (116,20 g/mol)</p> 
--	---

CONVERSÃO DE PERSULFATO EM ÍON SULFATO



<p>REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO DA ACRILAMIDA E COM A BIS-ACRILAMIDA</p>	
--	---

Prática 9: Caracterização da alfa-glicosidase: K_m e V_{max}

Objetivos

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

Reagentes

água destilada
lisado de levedura (**P6**)
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α Glc) 1,0 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α Glc) 2,0 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α 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
cubetas para leitura
pipetadores
pipetas
ponteiros
suporte para tubos de ensaio
tubos de ensaio

Aparelhagens

banho 30°C
espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Importante: Utilize a diluição usada na prática 4. Caso não seja possível, empregue o procedimento abaixo. Note que o volume total necessário será de 5,0 ml.

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 α Glc estipulados na **Tabela 1**.
ATENÇÃO: prestar atenção nas diferentes concentrações de substrato.
2. **Preparar os tubos em banho de gelo**
3. Adicionar em cada tubo os volume de tampão e lisado (devidamente diluído) estipulados na **Tabela 1**. Agitar manualmente com cuidado.
4. Transferir todos os tubos do gelo para o banho a 30°C
5. Incubar todos os tubos por **40 min (ou pelo dobro do maior tempo usado na prática 4)**.
6. Remover todos os tubos do banho. **Tirar uma foto.**
7. Adicionar 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato.
8. **Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
9. Homogeneizar em vórtice.
10. Usar a água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.

11. Ler as absorvâncias a 420 nm. **Tirar foto da placa de Elisa.**
12. Completar a **Tabela 2.**
13. Construir os gráficos necessários para a determinação do K_m e V_{max} da α -glicosidase para o substrato utilizado.

Tabela 1

tubos	NP α Glc 1,0 mM (mL)	NP α Glc 2,0 mM (mL)	NP α 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_{420}	nmols de produto	Tempo da reação (min)	Velocidade (nmol/min)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

08/03/2023