

Bioquímica Experimental, QBQ-1453 Integral, 2023

Orientação para as análises e tratamentos de dados de práticas

Professores responsáveis: Graziella Eliza Ronsein

Maria Terêsa Machini

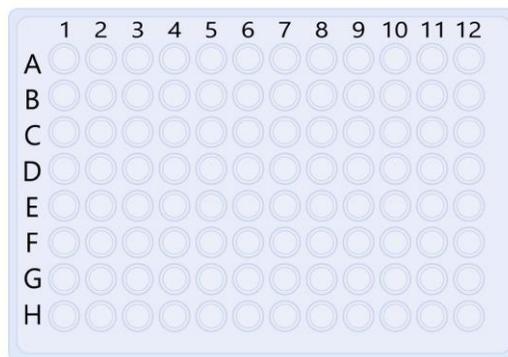
Tratamento de dados Prática 1

Responda as seguintes perguntas:

- 1) Escreva o nome e estrutura química do PMSF; comente as consequências de não empregá-lo na preparação do lisado.
 - 2) Cite que tipo de lise celular foi realizada nesta prática e que outros tipos existem.
 - 3) Liste que tipos de biomoléculas devem existir no lisado clarificado obtido sequências de centrifugações em diferentes condições;
 - 4) Liste que tipos de biomoléculas e componentes celulares podem existir nos precipitados.
-

Tratamento de dados Prática 2

- 1) Preencher o layout da placa



- 2) Adicionar fotos da placa após leitura no leitor de placas
 - a) Foto após leituras das absorbâncias
 - b) Foto após usar os poços de branco para zerar o leitor
- 3) Preencher as tabelas abaixo:

microtubo	BSA (μL)	H ₂ O (μL)	Concentração mg/mL	Abs média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
1	50 uL solução estoque (2 mg/mL)	150				
2	40 uL solução estoque (2 mg/mL)	160				
3	200 uL do tubo 2	200				
4	200 uL do tubo 3	200				
5	200 uL do tubo 4	200				
6	200 uL do tubo 5	200				
Branco	-	200				

microtubo	BSA (μL)	H ₂ O (μL)	Concentração mg/mL	Abs media após descontar branco	Desvio padrão	Coeficiente de variação
1	50 uL solução estoque (2 mg/mL)	150				
2	40 uL solução estoque (2 mg/mL)	160				
3	200 uL do tubo 2	200				
4	200 uL do tubo 3	200				
5	200 uL do tubo 4	200				
6	200 uL do tubo 5	200				
Branco	-	200				

- 4) Construir as curvas padrão resultantes dos itens 2a e b, colando-as abaixo.
- 5) Equação da reta curva 2a
- 6) Equação da reta curva 2b
- 7) Preencher a tabela abaixo

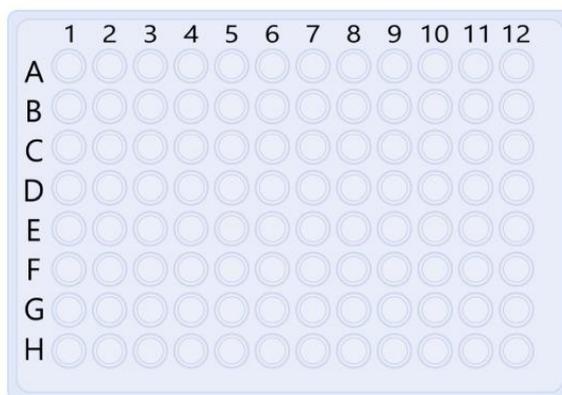
diluição	Abs Média	SD	CV	Concentração (mg/mL)
10x				
50x				
100x				

Responda as seguintes perguntas:

- 8) Qual a diferença das curvas 2a e 2b? Como utilizá-las para calcular a concentração de proteínas no lisado?
- 9) Suponha que você tenha feito seu lisado em um tampão contendo detergente, qual curva 2a ou 2b seria mais apropriada? Qual controle adicional deveria ser usado?
- 10) Preencha no drive sua equação de reta e sua concentração de lisado.

Tratamento de dados Prática 3

- 1) Preencher o layout da placa para a curva de para-nitrofenolato



- 2) Adicionar foto da placa após leitura no leitor de placas
- 3) Construir a curva de para-nitrofenolato e colar abaixo (abs x nmols)
- 4) Equação da reta para curva de para-nitrofenolato
- 5) Para a determinação de atividade enzimática, preencher a tabela abaixo:

	L10x	L50X	L500x
tubos	A_{420}	A_{420}	A_{420}
1			
2			
3			

4			
Branco de Enzima			
Branco de Substrato			

6) Transcreva na tabela abaixo os dados obtidos par a concentração de proteínas no lisado obtidos na prática 2. Qual diluição será escolhida e porquê?

diluição	Concentração (mg/mL)
10x	
50x	
100x	

7) Preencha a tabela abaixo para o cálculo da atividade enzimática (utilize sua curva de para-nitrofenolato).

		L10x		L50X		L500x	
tubos	Tempo (min)	A420	produto (nmol)	A420	produto (nmol)	A420	produto (nmol)
1	5						
2	10						
3	15						
4	20						

8) Construir o gráfico do ensaio de atividade da α -glicosidase (nmols de produto x tempo) para cada diluição de lisado utilizada. Colar abaixo.

Qual gráfico você irá utilizar? Por quê?

9) Calcular a Concentração de Atividade Enzimática (U/mL) e a Atividade específica (U/mg) do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*. Mostre seus cálculos.

10) Colocar no drive os seus resultados de Atividade enzimática e atividade específica.

Tratamento de dados da Prática 4

Ir em: http://www.agbooth.com/pp_java/

Clique em: [free online version](#)

Default_mixture:

Purificar a proteína equivalente ao número do grupo +1

Complex_mixture:

Purificar a proteína equivalente ao número do grupo +20

Seguir instruções para purificação de sua proteína e preenchimento do tratamento de dados.

- 1) Preencher o número do grupo, nome dos integrantes e número da proteína da default_mixture.
 - 2) Anotar as características da sua enzima (ou colar aqui imagem do site)
 - 3) Fazer 2D page – colar imagem
 - 4) Perceber e comentar aqui número de spots, intervalo de pH e de PM.
 - 5) Separation – escolher o primeiro método e escrever motivo.
 - 6) Após cada etapa ir em: Fractions e Assay enzyme activity. Depois: Pool Fractions e escolher onde está a atividade de sua enzima.
 - 7) Anotar (ou colar imagem do site sobre o total de proteína, de enzima e o enriquecimento.
 - 8) Ir novamente em: PAGE e então 2- dimensional PAGE
 - 9) Colar aqui a figura, ou anotar número de spots, intervalo de pH e de PM
 - 10) Continuar até sentir-se satisfeito com sua purificação. Por fim, copiar a tabela com todos os passos, informar o PM e PI da enzima (**e colar aqui imagens da mistura inicial e material purificado**).
 - 11) Repetir os mesmos passos de purificação para sua enzima da mistura complexa.
-

Tratamento de dados da Prática 5

1. Cite porque foram empregadas soluções tampão fosfato 10 mM sem NaCl e com NaCl durante a cromatografia realizada.
 2. Apresente as fotos tiradas dos tubos, placa de Elisa e tabela com os resultados obtidos.
 3. Construa um gráfico lançando no eixo Y os valores de absorbância em 420 nm lidos/anotados na Tabela 4 e no eixo X os volumes da solução de tampão fosfato com NaCl consumidos para chegar a cada um dos 20 tubos. Trace uma linha para unir todos os pontos e obterá o perfil cromatográfico ou cromatograma. Anexe a cópia.
 4. Observe o número de picos que ele exibe. Comente sobre quem este(s) pico(s) representa(m) e porque chegou a tal conclusão.
-

Tratamento de dados da Prática 6

1. Calcule a concentração de proteínas do lisado novamente, seguindo as instruções já detalhadas no tratamento de dados da Prática 2.
2. Apresente material similar ao solicitado acima para o cálculo da concentração de proteínas do Material DEAE.
3. Faça uma análise comparativa entre os valores obtidos, justificando possíveis diferenças ou igualdades.
4. Calcule a concentração de atividade enzimática do lisado seguindo as instruções já detalhadas no tratamento de dados da Prática 3.

5. Apresente material similar ao solicitado para o Material DEAE.
 6. Faça uma análise comparativa entre os valores obtidos, justificando possíveis diferenças ou igualdades.
 7. Com eles calcule a atividade específica (U/mg de proteína), a recuperação de atividade enzimática e o enriquecimento conseguido pela cromatografia.
-

Tratamento de dados da Prática 7

1. Mostre a foto tirada da diálise.
 2. Comente porque tanto o lisado quanto o pool de frações ativas (Material DEAE) obtidas na cromatografia de troca-iônica precisaram ser dialisados.
 3. Comente porque foi necessário dialisar um volume menor do lisado em relação ao do pool ativo.
-

Tratamento de dados da Prática 8

1. Anexe fotos do gel obtido após eletroforese e revelação que mostra os componentes dos seus Lisado e Material DEAE dialisados.
 2. De posse do gel, faça medidas de migração relativa (mr) de cada componente detectado no padrão proteico de peso molecular empregado e nas suas amostras.
 3. Calcule o \log de cada um dos valores de massa molar ou peso molecular (PM) das proteínas-padrão e anexe a tabela obtida. A partir deles construa um gráfico de $\log PM$ (eixo Y) versus mr (eixo X) relativos às diferentes proteínas-padrão e anexe uma cópia dele contendo a curva e a equação de reta obtidas.
 4. A partir deles e dos mr do(s) componente(s) do seu lisado e do material DEAE, calcule o(s) seus PM.
 5. Interprete os resultados / comente as suas conclusões.
-

Tratamento de dados da Prática 9

1. Anexe uma cópia da Tabelas 1 e outra da Tabela 2 completada com os dados obtidos na tentativa de caracterizar a glicosidase presente no Lisado obtido na Prática 1.
2. Construa um gráfico de velocidade de formação de produtos (v_0) versus concentração de substrato [S].
3. Calcule os recíprocos de ambos, anexando a lista que obtiveram.
4. Construa o gráfico de Lineweaver-Burk ou do duplo recíproco, indicando como a partir dele chegaram aos possíveis K_m e $V_{m\acute{a}x}$.
5. Defina estes parâmetros cinéticos com as suas palavras e comente que informações importantes eles fornecem sobre a enzima detectada e analisada.
6. Sob o ponto de vista cinético, classifique a glicosidase em estudo.