

Departamento de Bioquímica – Instituto de Química - USP

BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

QBQ 1453 Integral, 2020

EXERCÍCIOS

Professores

Graziella Eliza Ronsein

Maria Terêsa Machini

Monitora

Yuli Serna Torres

1. Foram preparados três lisados de levedura com um volume total de 5 mL, os quais foram utilizados para determinação da concentração de proteína total através do reagente de Bradford (Coomassie Blue G). Com base nos dados dos experimentos abaixo **calcule a concentração de proteínas e o valor de proteínas total de cada lisado.**

Curva de calibração:

Usando uma solução de albumina 1g/L foram preparados os tubos abaixo:

Tubo	Solução de albumina (µL)	Água (µL)
1	5	995
2	10	990
3	20	980
4	40	960
5	60	940
6	80	920
7	100	900
8	120	880
9	140	860
10	160	840
11	180	820
12	200	800
13	300	700
14	400	600

De cada um destes tubos, retirou-se 100 uL para um novo tubo e foi adicionado 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas em 595 nm conforme abaixo:

Tubo	volume retirado do tubo (uL)	Reagente de Bradford (mL)	Absorbância em 595nm após 5 min de incubação
1	100	1	0.002
2	100	1	0.001
3	100	1	0.1
4	100	1	0.18
5	100	1	0.32
6	100	1	0.4
7	100	1	0.51
8	100	1	0.6
9	100	1	0.7
10	100	1	1.7
11	100	1	0.9
12	100	1	1
13	100	1	1.02
14	100	1	1.05

Dosagem nos lisados:

Usando os três diferentes lisados foram preparados os tubos abaixo.

Tubo	Lisado A (uL)	Diluição prévia	Reagente de Bradford (mL)	Absorbância em 595nm após 5 min de incubação
1	100	Sem diluir	1	2
2	100	2x	1	0.55
Lisado B (mL)				
3	100	5x	1	0.32
4	100	10x	1	0.15
Lisado C (mL)				
5	100	Sem diluir	1	0.32
6	100	200x	1	0.01

2. Um aluno fez dois ensaios para a detecção da atividade enzimática da alfa-glicosidase. No primeiro ensaio o lisado de células de levedura foi diluído 20 vezes, enquanto que no segundo ensaio a diluição usada foi de 2 vezes. Abaixo seguem as condições de ensaio e os resultados.

Condições do ensaio

Substrato: p-nitrofenil alfa-glicosídeo 4 mM preparado em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6

Enzima: Lisado de levedura preparado em tampão fosfato 20 mM, pH 7.

Ensaio: 0,2 mL de lisado diluído (20 vezes ou 2 vezes) + 0,2 mL de substrato

Incubação a 30°C por diferentes intervalos de tempo. Interrupção com tampão carbonato.

Equação da curva-padrão de p-nitrofenolado (A_{420nm} x nmoles de p-nitrofenolato): $y = 0,0061x + 0,0097$

Resultados experimentais

tempo (min)	lisado 20x	lisado 2x
	A_{420nm}	A_{420nm}
5	0,107	0,986
10	0,205	1,718
15	0,303	2,206
20	0,400	2,694

Baseando-se nos dados acima responda:

a) Qual a concentração de atividade de alfa-glicosidase no lisado de levedura? Apresente gráficos e cálculos para justificar a resposta.

b) Os resultados obtidos nas duas diferentes diluições são coerentes entre si? Justifique sua resposta explicando os resultados obtidos.

3. Uma indústria farmacêutica preparou lisados de levedura de diferentes linhagens. Em todas as amostras usou 1g de células e obtiveram 10 mL de lisado. Esses lisados foram utilizados para ensaios enzimáticos, empregando p-nitrofenil α -glicosídeo (pNP α glc) como substrato. Foram obtidos os resultados que se seguem:

linhagem	diluição	μ l lisado diluído	μ L água	μ L pNP α glc	Abs 420 15 min	Abs 420 30 min	Abs 420 45 min	Abs 420 60 min
A	100x	100	100	200	0,050	0,100	0,150	0,200
B	50x	20	180	200	0,080	0,160	0,240	0,320
C	8x	50	150	200	0,250	0,500	0,750	1,000
D	70x	200	0	200	0,100	0,200	0,300	0,400
E	500x	200	0	200	0,010	0,020	0,030	0,040
F	200x	200	0	200	0,075	0,150	0,225	0,300

As mesmas amostras foram submetidas à determinação de proteínas com o reagente de Bradford (comassie blue G), obtendo-se os dados a seguir. Confeccionou-se também uma curva padrão usando albumina de ovo.

Dados para amostras experimentais:

linhagem	diluição	μ l lisado diluído	Reagente Bradford (mL)	Abs 595 15 min
A	20x	100	1	0,265
B	250x	100	1	0,320
C	20x	100	1	0,550
D	25x	100	1	0,105
E	50x	100	1	0,750
F	80x	100	1	0,415

Dados da curva padrão:

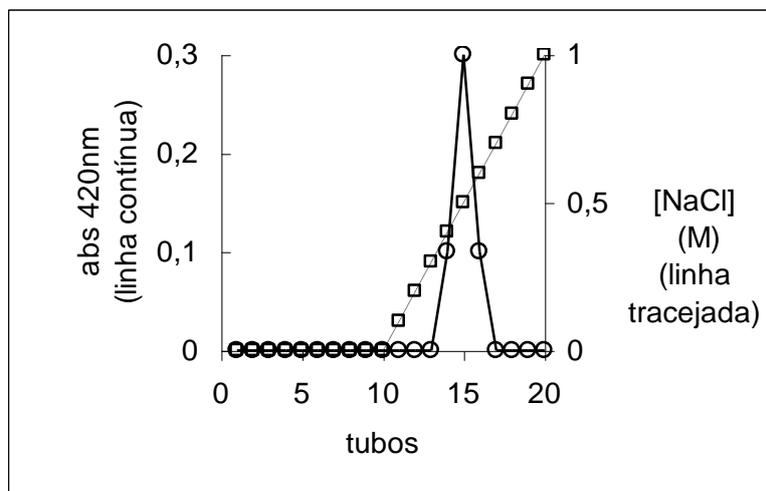
Ponto	Albumina 0.2 g/L	água (μ L)
0	0	1000
1	100	900
2	200	800
3	300	700
4	400	600
5	500	500
6	600	400
7	700	300
8	800	200
9	900	100
10	1000	0

De cada tudo da curva padrão, retirou-se 100 μ L e adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford, homogeneizou-se e após 5 min as absorvâncias abaixo foram obtidas:

Ponto	uL	Reagente de Bradford (mL)	concentração	Abs 595nm
0	100	1		0.01
1	100	1		0.08
2	100	1		0.16
3	100	1		0.24
4	100	1		0.32
5	100	1		0.4
6	100	1		0.48
7	100	1		0.56
8	100	1		0.64
9	100	1		0.72
10	100	1		0.8

Calcule a concentração de atividade enzimática no lisado de cada uma das linhagens de levedura. Calcule também a atividade obtida por grama de células. Calcule a concentração de proteína em cada um dos lisados e a atividade específica de cada um dos materiais. Se o próprio lisado for utilizado industrialmente como fonte de enzima, qual das linhagens é melhor para produzir essa enzima em larga escala? Se for necessário purificar a enzima, qual das linhagens é a melhor fonte? Justifique as respostas.

4. – Um homogeneizado do epitélio do tubo digestivo de rato apresenta atividade da enzima alfa-glicosidase. Para as condições de preparação deste homogeneizado obteve-se uma atividade enzimática de 80 mU/ml e uma atividade específica de 80 mU/mg. A fim de purificar esta alfa-glicosidase, 1,5 ml deste homogeneizado foram submetidos a uma cromatografia de troca iônica em uma coluna DEAE-celulose e obteve-se o seguinte perfil de atividade de alfa-glicosidase nos tubos coletados durante a cromatografia:



Os tubos com maior atividade de alfa-glicosidase foram reunidos. Este material com volume de 1,0 ml foi denominado “material DEAE”. Em seguida, o material DEAE foi utilizado para determinação de atividade enzimática e concentração de proteína total. As condições do ensaio de atividade enzimática e os resultados obtidos estão descritos na tabela abaixo:

Substrato p-nitrofenil α-glucosídeo 4 mM (μL)	Material DEAE (μL)	Tempo de incubação a 30°C (min)	Abs 420nm
50	50	5	0,1
50	50	10	0,19
50	50	15	0,32
50	50	20	0,4

Nas condições de ensaio de atividade de alfa-glicosidase descritas acima, a curva padrão utilizada para cálculo da atividade enzimática tem a equação $Abs = 0.0056 \text{ nmols}$ ($y=0.0056x$).

As diluições utilizadas para determinação da concentração de proteína total estão descritas na tabela abaixo:

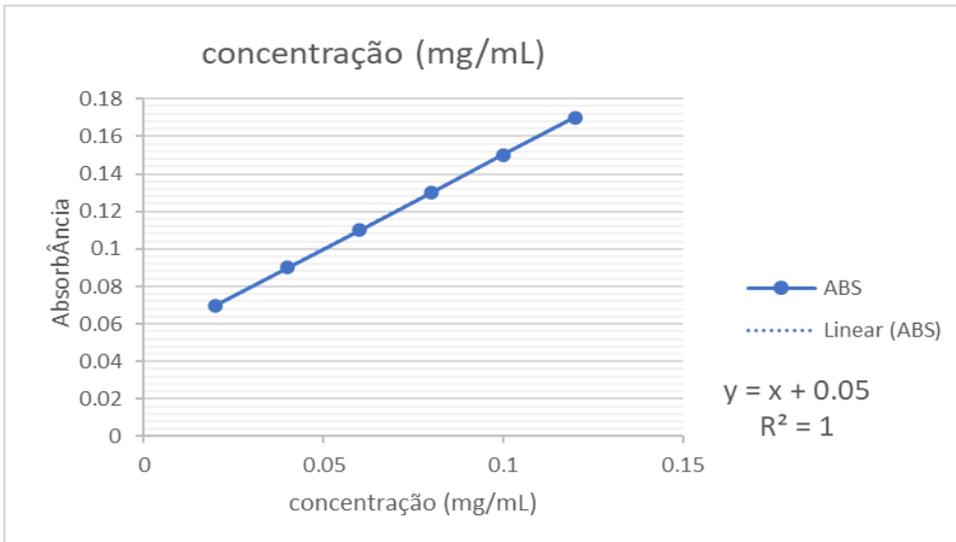
Diluição	Material DEAE (ml)	Água (ml)
1	0,01 ml	0,99 ml
2	0,04 ml	0,96 ml
3	0,05 ml	0,95 ml
4	0,1 ml	0,90 ml

A curva padrão do reagente de Bradford preparada nas mesmas condições de volume que a tabela acima está apresentada a seguir.

De cada diluição acima, retirou-se 100 μ L, completou-se com 1 mL do reagente de Bradford, homogeneizou-se e após 5 min as absorbâncias foram lidas a 595 nm conforme abaixo:

Diluição	Material DEAE (ml)	Reagente de Bradford	Abs 595 nm
1	0.1	1 ml	0.052
2	0.1	1 ml	0.13
3	0.1	1 ml	0.15
4	0.1	1 ml	0.35

O mesmo procedimento foi feito para a curva padrão de dosagem de proteínas, obtendo-se o gráfico abaixo:

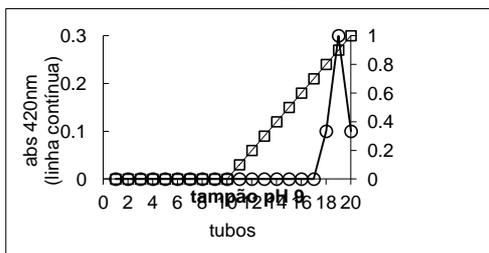


Utilizando estas informações e resultados determine:

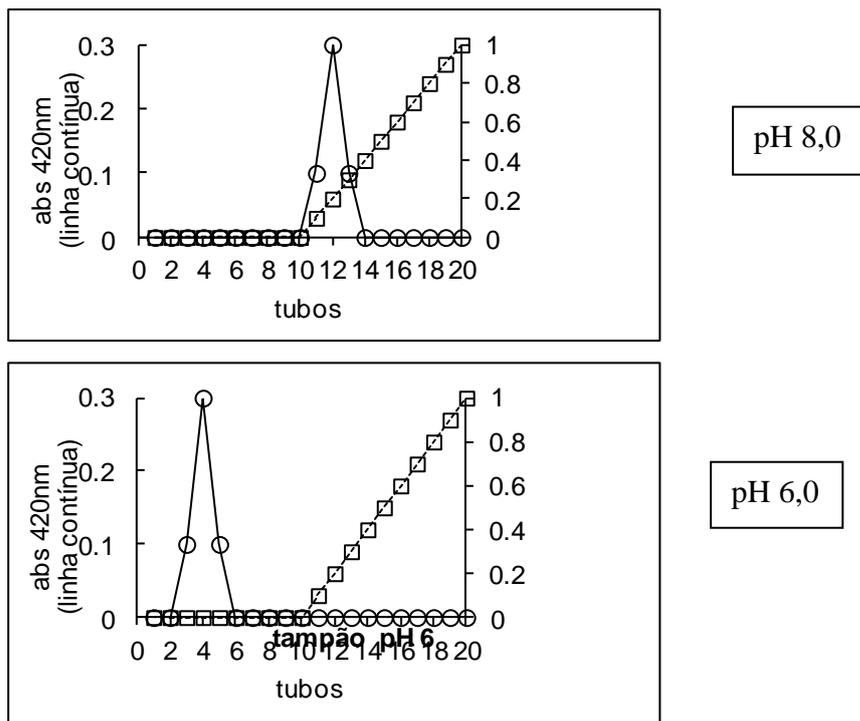
- 1 – A atividade enzimática (mU/ml) do “material DEAE”
- 2 – A concentração de proteína total (mg/ml) do “material DEAE”
- 3 – A atividade específica do “material DEAE”
- 4 – A recuperação de atividade enzimática após a cromatografia de troca iônica
- 5 – O enriquecimento da atividade enzimática após a cromatografia de troca iônica

Obs: 1 mU (mili-unidade) de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima que catalisa uma reação química com a velocidade de formação de **1 nmol de produto/minuto**.

5. As figuras a seguir apresentam o perfil de eluição da atividade de alfa-glicosidase em uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-celulose. Cada uma das cromatografias foi realizada utilizando um tampão com pH diferente (9,0 – 8,0 – 6,0). Com base nos resultados responda qual a provável faixa de valores do pI (ponto isoelétrico) desta alfa-glicosidase.



pH 9



6. Você conseguiu purificar uma celulase através da marcha de purificação a seguir.
 1º passo: cromatografia de troca aniônica em pH 10.
 2º passo: cromatografia de filtração em gel em pH 6,0.

Após cada passo os tubos que continham a atividade de celulase foram reunidos. Para este material foi calculada a atividade enzimática total de celulase e também a quantidade de proteína. A tabela abaixo resume estes resultados.

Passo	Atividade de celulase aplicada (U)	Atividade de celulase recuperada (U)	Proteína total aplicada (mg)	Proteína total recuperada (mg)
Troca iônica	500	100	1.0	0.05
Filtração em gel	100	80	0.05	0.02

Após cada cromatografia os tubos que continham atividade de celulase também foram reunidos e analisados por SDS-PAGE.

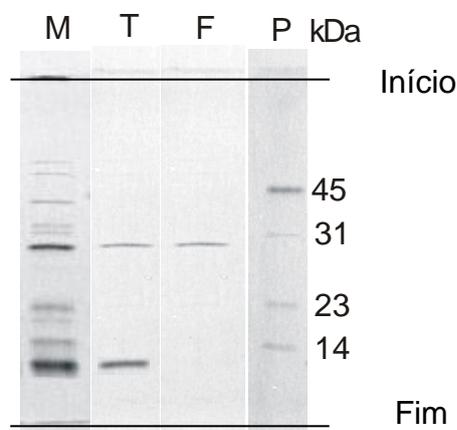


Figura 1 – SDS-PAGE de materiais recolhidos ao longo da marcha de purificação. **M** – meio de cultura; **T** – material recuperado após cromatografia de troca aniônica. **F** –

material recuperado após cromatografia de filtração em gel; **P** – padrões de peso molecular.

Para a coluna de filtração em gel usada na marcha de purificação foi previamente preparada uma curva de calibração utilizando proteínas de diferentes pesos moleculares. Os dados obtidos estão descritos na tabela abaixo juntamente com o resultado para cromatografia da celulase.

Tabela 2 – Volumes de eluição na cromatografia de filtração em gel em uma coluna cujo, volume total é 25ml.

Material	Volume de eluição (mL)
Proteína padrão de 2.000.000 daltons	7.53
Proteína padrão de 66.000 daltons	9.38
Proteína padrão de 45.000 daltons	10.46
Proteína padrão de 12.400 daltons	13.70
Proteína padrão de 6.500 daltons	16.22
ATIVIDADE CELULÁSICA	9.58

- Calcule a recuperação da atividade enzimática após cada um dos passos da purificação da celulase.
- Calcule a atividade específica da celulase após cada um dos passos da marcha de purificação.
- Qual dos passos é melhor na purificação desta enzima? Por quê?
- Calcule a massa molecular da enzima determinada por SDS-PAGE e por filtração em gel. Compare os valores e formule hipóteses para explicar os resultados.

7. Para uma alfa-glicosidase foram determinadas as velocidades de hidrólise de diferentes concentrações de substrato (NpaGlc) na presença de diferentes concentrações de um inibidor. Estes dados estão apresentados na tabela abaixo. Baseando-se nesta tabela determine o V_{max} e o K_m para a hidrólise do substrato e o K_i para este inibidor.

[S] (mM)	V (nmol/min)				
[I] (mM)	0	2	4	6	8
0.1	0.91	0.48	0.32	0.24	0.20
0.2	1.67	0.91	0.63	0.48	0.38
0.3	2.31	1.30	0.91	0.70	0.57
0.4	2.86	1.67	1.18	0.91	0.74
0.5	3.33	2.00	1.43	1.11	0.91
0.75	4.29	2.73	2.00	1.58	1.30
1	5.00	3.33	2.50	2.00	1.67
1.5	6.00	4.29	3.33	2.73	2.31
2	6.67	5.00	4.00	3.33	2.86
2.5	7.14	5.56	4.55	3.85	3.33
4	8.00	6.67	5.71	5.00	4.44
6	8.57	7.50	6.67	6.00	5.45
8	8.89	8.00	7.27	6.67	6.15
10	9.09	8.33	7.69	7.14	6.67

8. a) Tecido embrionário de fígado contém uma enzima que catalisa a reação $S \rightarrow P$. Tecido de fígado adulto também apresenta a atividade $S \rightarrow P$. Alguns dados cinéticos obtidos com extratos dos dois tecidos são apresentados abaixo. Que conclusões você pode tirar com relação a identidade das duas enzimas?

[S] [M]	Velocidade Inicial Observada ($\mu\text{-moles} \times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	
	Extrato de Fígado Adulto (E ₁)	Extrato de Fígado Embrionário (E ₂)
$1,67 \times 10^{-5}$	1,05	5,00
$2,5 \times 10^{-5}$	1,54	6,66
$3,33 \times 10^{-5}$	1,98	8,00
$5,0 \times 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0 \times 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0 \times 10^{-4}$	5,00	13,33
$1,5 \times 10^{-4}$	6,67	15,0
$1,67 \times 10^{-4}$	7,15	15,4
$2,0 \times 10^{-4}$	8,00	16,0
$3,0 \times 10^{-4}$	10,00	17,1

b) Durante danos consideráveis do fígado, uma enzima (E₁ do Probl. 1) é liberada na corrente sanguínea. Após exercícios intensos, uma enzima de músculo, E₃, que catalisa a mesma reação, é liberado na corrente sanguínea. E₁ E₃ podem ser diferenciadas facilmente porque apresentam diferentes valores de K_m (A K_m da enzima de músculo é $2 \times 10^{-5} M$.) Uma determinação com uma amostra de sangue de um paciente apresentou os resultados dados na tabela abaixo. O paciente sofre de uma doença do fígado, ou simplesmente tem se exercitado violentamente? (O paciente chegou inconsciente no hospital, de modo que você não pode fazer a ele nenhuma pergunta).

[S] (M)	v (moles \times ml de soro ⁻¹ \times min ⁻¹)
5×10^{-5}	43
7×10^{-5}	57
1×10^{-4}	75
$1,5 \times 10^{-4}$	100
2×10^{-4}	120
3×10^{-4}	150
6×10^{-4}	200