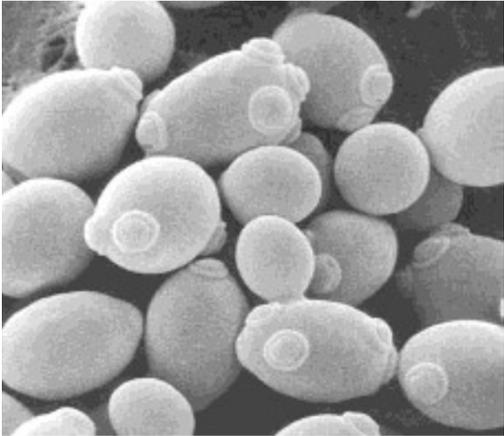


QBQ 1453 Bioquímica Experimental – 2023



QBQ-1453 Integral: Bioquímica Experimental – 1º. Semestre de 2023

Professores: M. Terêsa Machini / Graziella Eliza Ronsein
Monitora PAE: Yuli Serna Torres (yuliserna2716@gmail.com)

Objetivos

Ampliar o conhecimento em Bioquímica. Trabalhar conceitos introduzidos na teoria em disciplinas de Bioquímica e Química. Assimilar os fundamentos de métodos e técnicas comumente empregados em Bioquímica. Desenvolver a capacidade de desenhar experimentos, de selecionar técnicas para realizá-los, de tratar e analisar criticamente resultados. Desenvolver habilidades práticas de laboratório.

Organização

- A) As aulas ocorrerão nas 3as. feiras impreterivelmente às 14 h.
- B) A turma será dividida em grupos de 3-4 alunos.
- C) A disciplina utilizará a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como fonte do modelo experimental (lisado).
- D) Cada grupo receberá dois frascos contendo 1g de leveduras, que servirá de material de partida para a obtenção do lisado e realização de experimentos concatenados que visam a detecção e a dosagem de proteínas, bem como a extração, etapa de purificação e caracterização de uma alfa-glicosidase (maltase).
- E) Serão realizadas aulas teóricas e de planejamento dos experimentos, de execução dos mesmos (*Laboratório Didático de Bioquímica e Biologia Molecular, LBBM, B7 Sup.*), de uso de softwares de ensino (*sala de multimídia, B1 Sup.*) e de tratamento de dados.

Avaliação

A avaliação será baseada em 4 tipos de atividades:

Provas individuais (total: **2**), terão questões formuladas com base em situações e dados experimentais. Previamente às provas, haverá espaço adicional para o esclarecimento de dúvidas (*Resolução de Dúvidas*).

Experimentos e apresentação de Resultados em grupo: no final de todas as aulas práticas o professor solicitará a apresentação do conjunto de dados obtidos pelo grupo.

Tratamento de dados em grupo: aulas de discussão e análise de resultados a serem entregues.

Listas de Exercícios em grupo: exercícios para trabalhar os conteúdos das aulas.

Os altos custos deste tipo de disciplina experimental exigem: presença, seriedade e bom aproveitamento.

Não há prova substitutiva, pois não se trata de avaliação obrigatória segundo o regimento da USP.

Média final = (Média P1 e P2 x 0,80) + (média tratamento de dados e participação x 0,2)

Média \geq 5,0 e frequência \geq 70 % levará à aprovação sem recuperação.

Recuperação

Poderá fazer prova o aluno que atingir a frequência de 70% e tiver média maior ou igual a 3,0 e menor que 5,0. Neste caso, a **média final da disciplina = [média + (nota de recuperação x 2)]/3**.

Data	Conteúdo da Aula	Observação - local
14/03	Apresentação da disciplina <u>Aula Teórica 1</u> : <i>S. cerevisiae</i> e biomoléculas / <u>Aula Teórica 2</u> : Dosagem de proteínas Planejamento das Práticas 1 e 2	Grazi e Terêsa Grazi
21/03	<u>Prática 1</u> : Lise de células da levedura <i>S. cerevisiae</i> / <u>Prática 2</u> : Dosagem de proteínas	Grazi e Teresa - LBBM/b07
28/03	<u>Aula Teórica 3</u> : Determinação de atividade enzimática /Planejamento Prática 3 <i>Tratamento de dados Práticas 1 e 2 – Entrega de tratamento de dados</i>	Grazi
04/04	<u>Semana Santa – Não haverá aula</u>	
11/04	<u>Prática 3</u> : Dosagem de proteínas e determinação de atividade enzimática do lisado	Grazi e Teresa - LBBM/b07 sup
18/04	<u>Aula Teórica 4</u> : Princípios de purificação de proteínas <i>Tratamento de dados Prática 3 – Entrega de tratamento de dados</i>	Terêsa
25/04	<u>14:00 h Turma 1 - Prática 4</u> : Simulação computacional de purificação de proteínas <u>16:00 h Turma 2 - Prática 4</u> : Simulação computacional de purificação de proteínas <u>Exercícios 1-2 (14:00h Turma 2; 16:00 h Turma 1)</u>	Grazi e Teresa sala Multimídia/b07
02/05	<i>Tratamento de dados da Prática 4 – Entrega de dados</i> <u>Exercícios 3-4 / Tira Dúvidas: gerais e dos Exs 1-2</u>	Terêsa
09/05	PROVA 1	Grazi
16/05	<u>Aula Teórica 5</u> : Cromatografia de troca iônica - Planejamento das Práticas 5 <u>Planejamento Prática 6</u> Dosagem de proteínas e atividade enzimática após troca iônica <u>Planejamento Prática 7 - Diálise</u> Exercícios 5-6	Terêsa

QBQ 1453 Bioquímica Experimental – 2023

Informações gerais

- Grupos de 3/4 alunos
- Na 1 aula prática (21/03) trazer a **primeira página** da declaração sobre segurança em laboratório assinada. Ler todo o documento e seguir as recomendações durante as aulas práticas – imprescindível para participar da aula.

DECLARAÇÃO

DECLARO, QUE LI ATENTAMENTE O DOCUMENTO *“NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DO IQ-USP”*, DISPONÍVEL NA PÁGINA DA GRADUAÇÃO (www.iq.usp.br/graduação) E NA PÁGINA "SEGURANÇA NO IQ-USP" (http://www3.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=1083).

COMPROMETO-ME A SEGUIR, INCONDICIONALMENTE, AS RECOMENDAÇÕES DO DOCUMENTO ACIMA E APRESENTAR-ME PARA QUALQUER ATIVIDADE DENTRO DOS RECINTOS LABORATORIAIS DESTES INSTITUTO, OBSERVANDO RIGOROSAMENTE TODOS OS ITENS DO DOCUMENTO ACIMA.

EM CASO DA NÃO OBSERVÂNCIA DOS ITENS 06, 07, 08, 09, 10 E 14 DO REFERIDO DOCUMENTO, ENTENDO QUE NÃO PODEREI PERMANECER NO RECINTO DOS EXPERIMENTOS.

NOME LEGÍVEL: _____

CÓDIGO USP: _____

E-MAIL: _____

CÓDIGO DA DISCIPLINA: _____ PERÍODO: _____

São Paulo, ____ de _____ de _____.

ASSINATURA

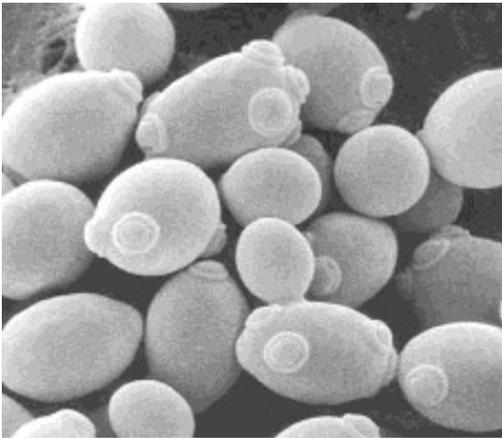
QBQ 1453 Bioquímica Experimental – 2023

Planejamento:

Revisão do uso de pipetadores

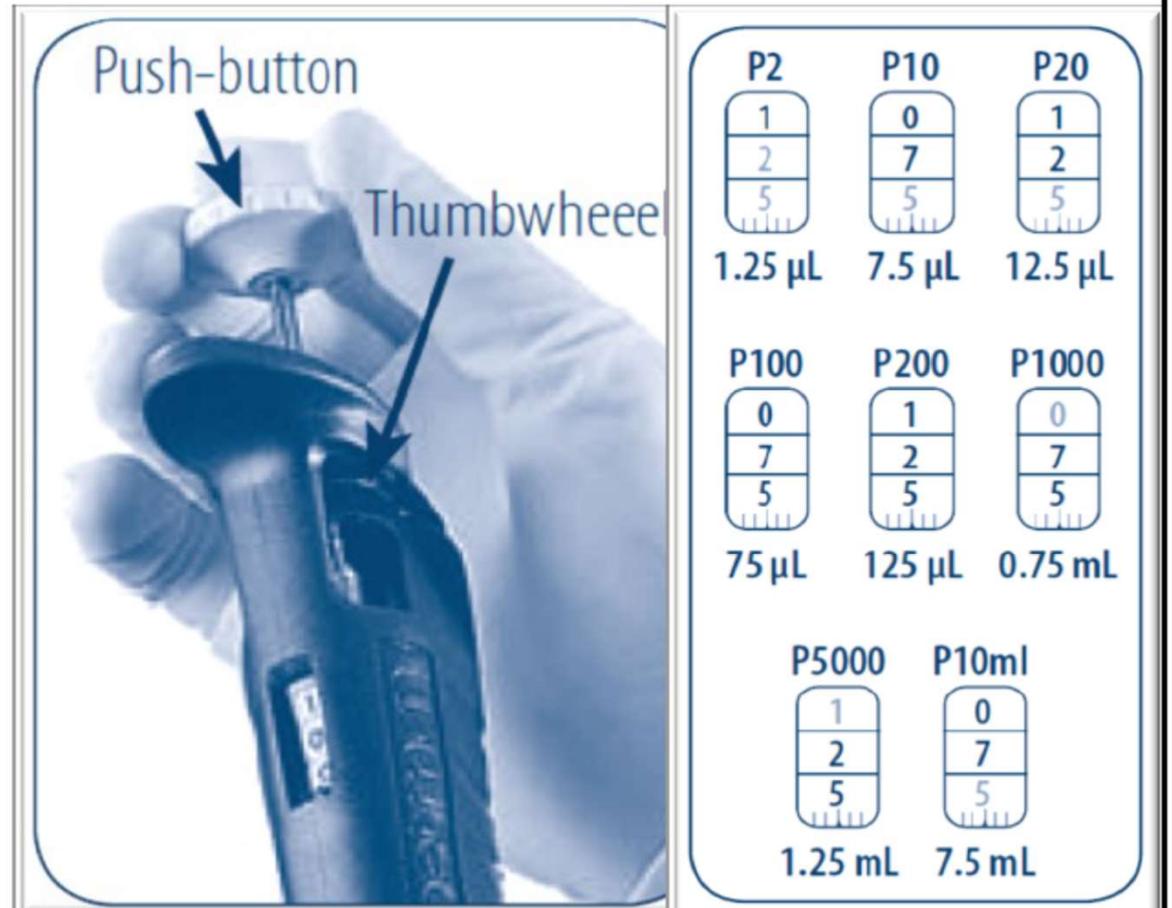
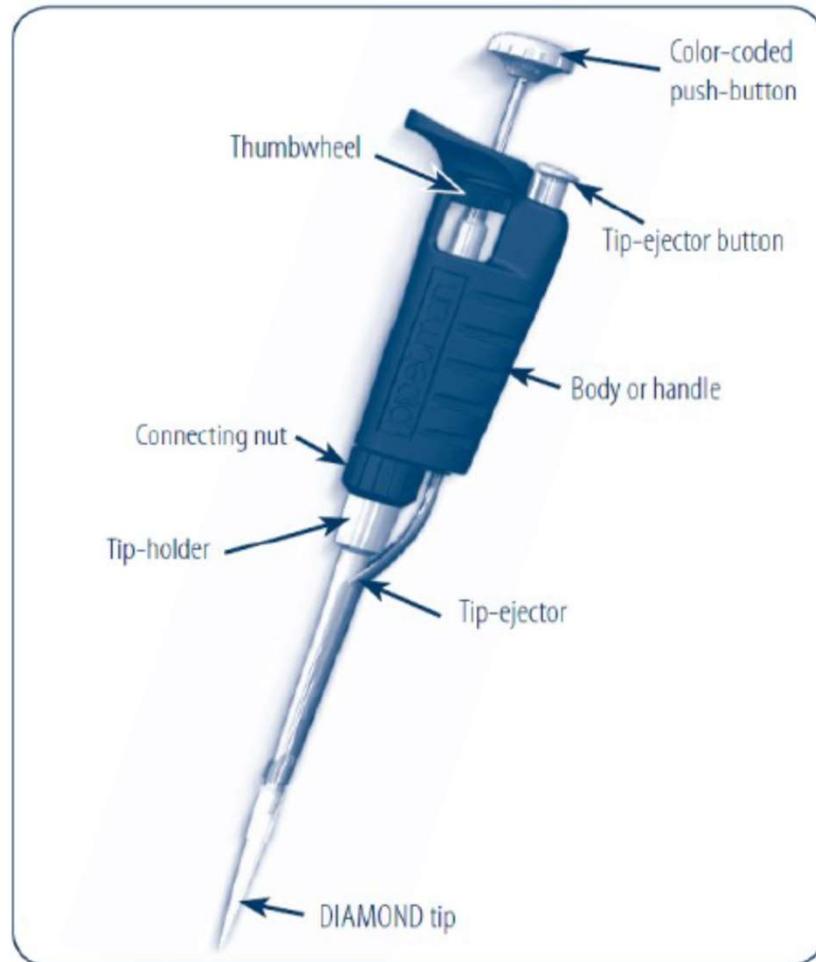
Prática 1 – Lise de células de levedura

Prática 2 - Dosagem de proteínas totais presentes no lisado



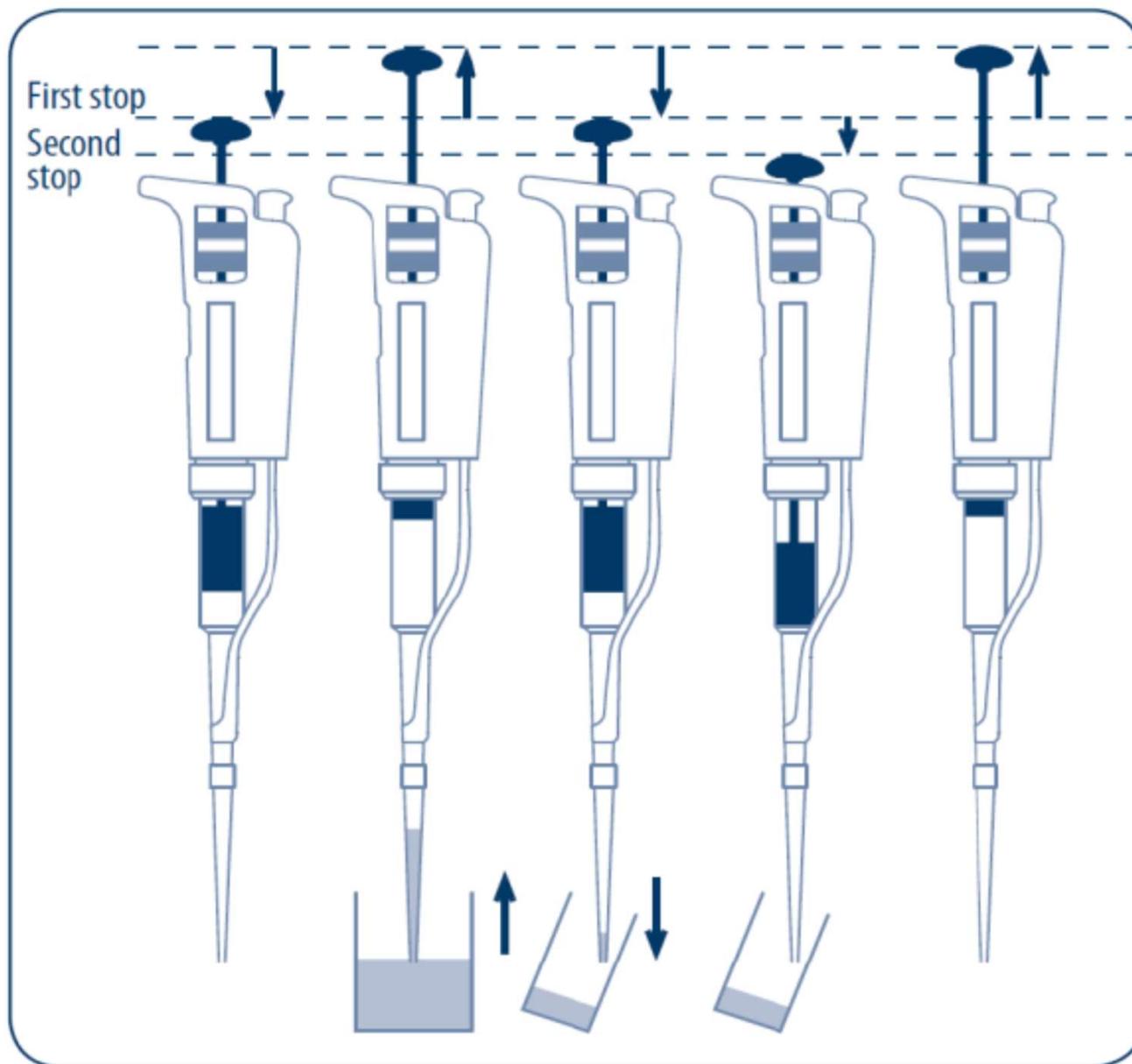
Planejamento Prática 1

Uso de pipetadores

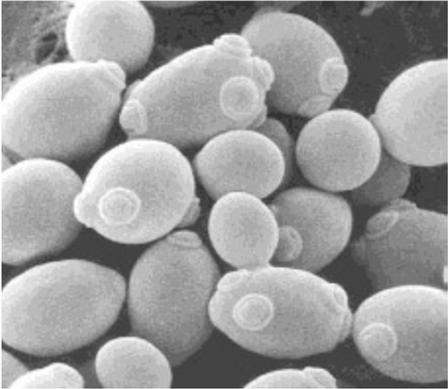


Planejamento Prática 1

Uso de pipetadores



Planejamento Prática 1



(~5 μm diâmetro)

Saccharomyces cerevisiae

Eucarioto – fungo unicelular

possui parede celular e membrana plasmática.

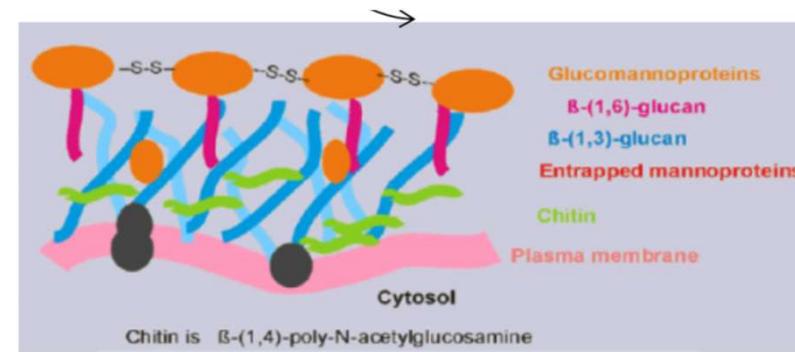
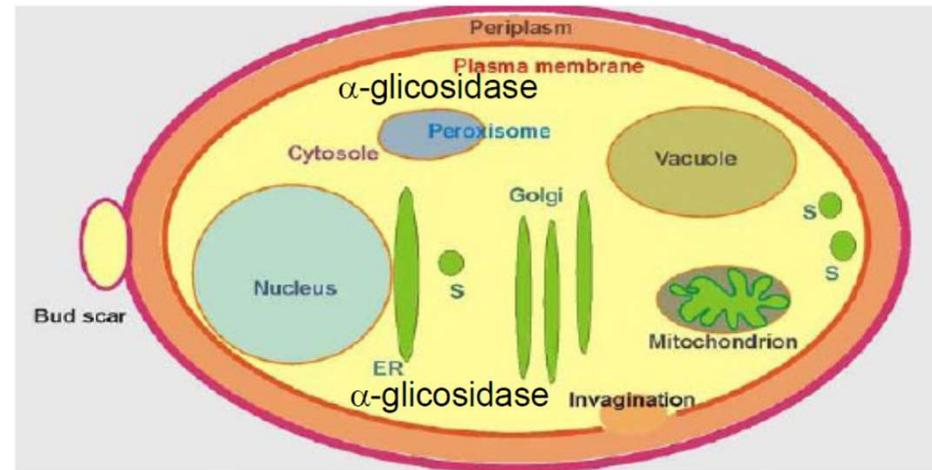
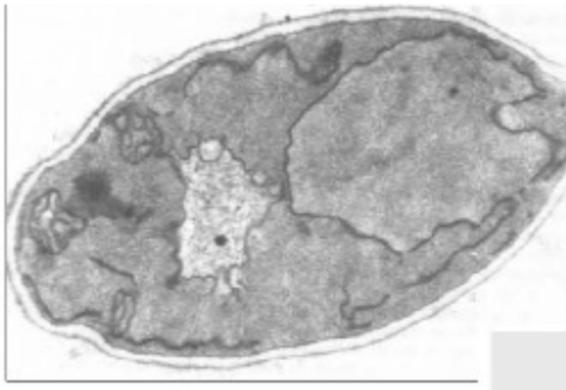
Ferramenta biotecnológica por séculos
(vinho, cerveja, pão, biocombustíveis, etc)
Fermentação

~1g *S. cerevisiae*/grupo

Obtenção de Lisado de *S. Cerevisiae*

Por lise mecânica com pérolas de vidro

Objetivo: lisar parede celular e membrana plasmática

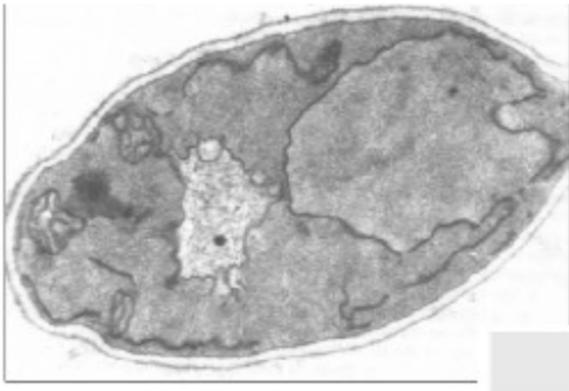


“Vortexing” com pérolas de vidro

Obtenção de Lisado de *S. Cerevisiae*

Por lise mecânica com pérolas de vidro

Objetivo: lisar parede celular e membrana plasmática



“Vortexing” com pérolas de vidro



Centrifugação: Separação de células íntegras, debris de tecidos

Importante:

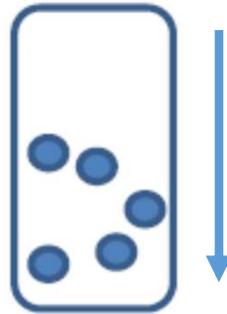
Gelo

Inibidores de proteases

Obtenção de Lisado de *S. Cerevisiae*

Centrifugação:

Separação de células íntegras, debris de tecidos do sobrenadante contendo as biomoléculas de interesse (carboidratos, proteínas).



Centrifugação-usa força centrífuga para separar e purificar misturas de partículas biológicas em um meio líquido



Força centrífuga vai sedimentar partículas mais densas

Procedimento

1 g *S. cerevisiae*

4 mL tampão de lise (0,1 M Pi, pH 7,0 contendo 5 mM EDTA)
40 uL PMSF (fluoreto de fenil-metil sulfonila)
(Inibidor de proteases)

Homogeneizar em vórtex

8 mL de pérolas de vidro

Agitar em vortex por 1 min
Banho de gelo por 1 min

Repetir mais 4 x

Centrifugar (850 g, 2 min).

Remover o sobrenadante
para um novo tubo falcon

Lisado
(gelo)

Precipitado contendo as pérolas de vidro

4 mL tampão de lise
40 uL PMSF

Agitar em vortex por 1 min
Banho de gelo por 1 min

Repetir mais 4 x

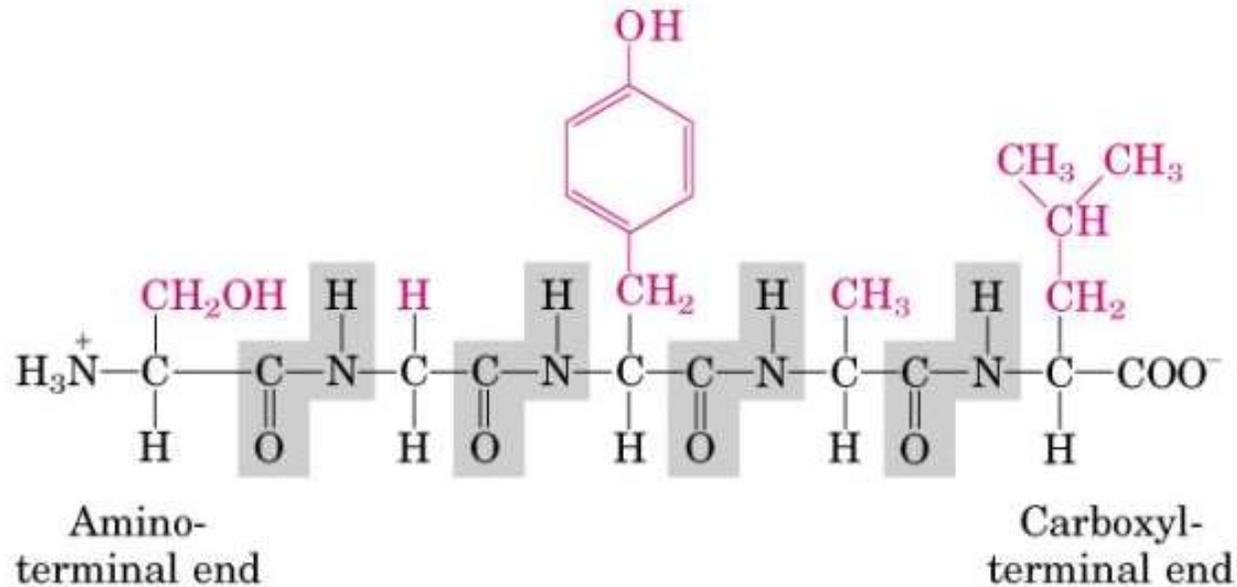
Centrifugar (850 g, 2 min).

Coletar o sobrenadante para o tubo **lisado**

Centrifugar
(17 000 g, 5 min).

Transferir para novo tubo
falcon, medir volume e
dividir em 3 alíquotas

Identificar os tubos com o
número do grupo e congelar



A quantificação de uma proteína através de espectrofotometria se baseia nas propriedades de absorção de luz:

1. da ligação peptídica (210-220 nm)
2. de grupos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos que a constituem (aromáticos, p. ex., a ~ 280 nm)
3. de produtos coloridos resultantes de reações entre a proteína e compostos químicos específicos (400-700 nm)

Alguns métodos para detectar/dosar proteínas

Absorção de luz UV

Cadeias laterais contendo aromáticos absorvem luz em 280nm.

Assim, a absorbância de uma proteína dependerá do seu conteúdo de Tyr, Phe e Trp.

Para a quantificação de uma proteína sem o uso de referências é necessário conhecer a sua sequência de aminoácidos (calcular o ϵ).

Desvantagem:

- a) compostos que absorvem na região de luz UV podem interferir na quantificação.
- b) A diferença de conteúdo de aminoácidos aromáticos entre o padrão e a amostra pode introduzir erros na quantificação.

Coloração com Ag⁺

Baseado na capacidade de ligação de proteínas a íons Ag⁺, formando um complexo que absorve em 420nm.
Detecta até nanogramas de proteína.

Muito sensível para gel de SDS page!

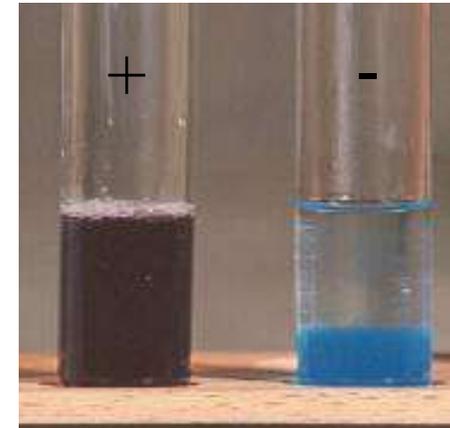
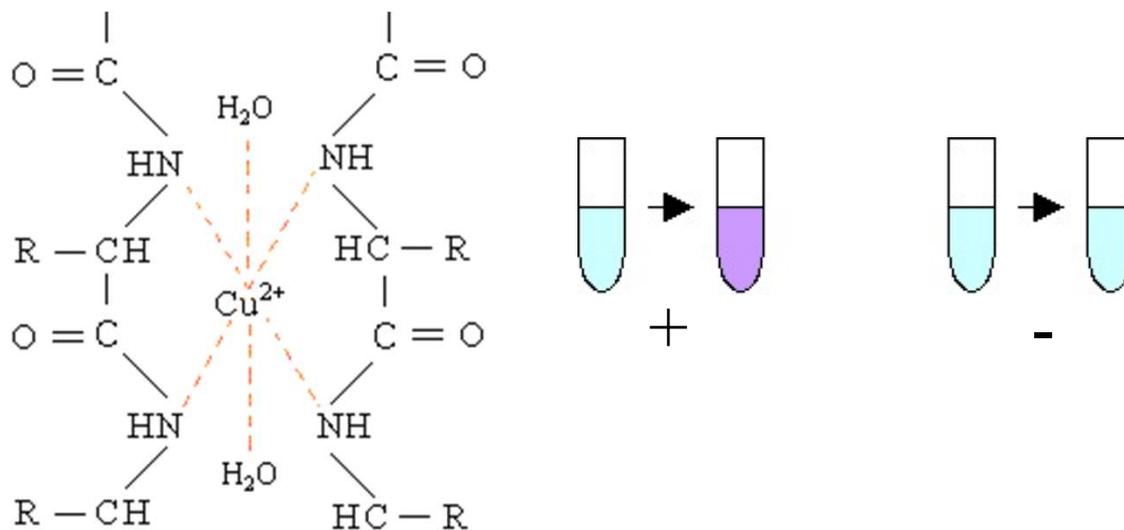


Desvantagem:

sais, grupos tiol e detergentes interferem na reação.

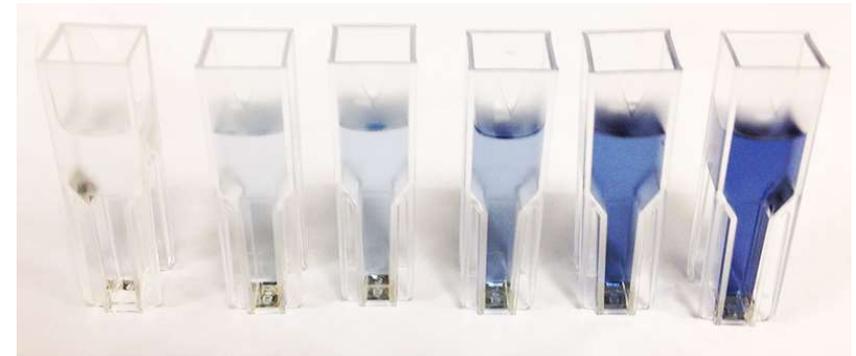
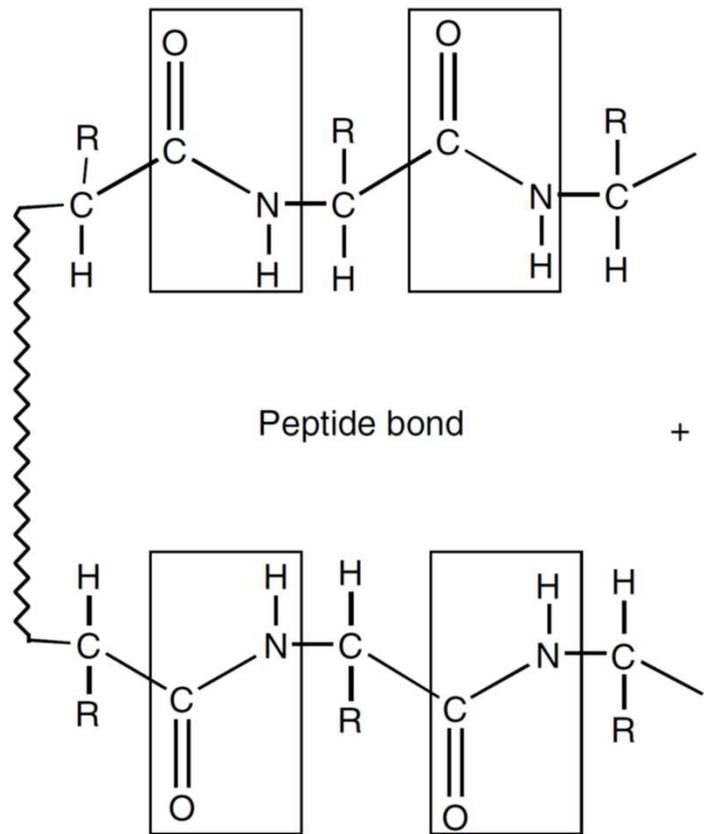
Reação de Biureto

Baseia-se em uma reação entre CuSO_4 e os grupos amino da ligação peptídica em meio alcalino. Portanto, é um método específico para proteínas. O produto desta reação (um cátion Cu^{2+} coordenado com 4 grupos amino) absorve em 540nm.



Desvantagens: a) baixa sensibilidade (> 1 mg prot.)
b) somente para proteínas simples

Reagente de Folin-Ciocalteu – Método de Lowry



Tetradentate
 Cu^+ complex

Folin reagent

Blue product
(Read at 750 nm)

At alkaline condition, cupric sulfate reacts with the protein peptide bonds, producing Cu^+ . Subsequent reduction of the Folin reagent by copper-treated protein yields a heteropoly-molybdenum blue product.

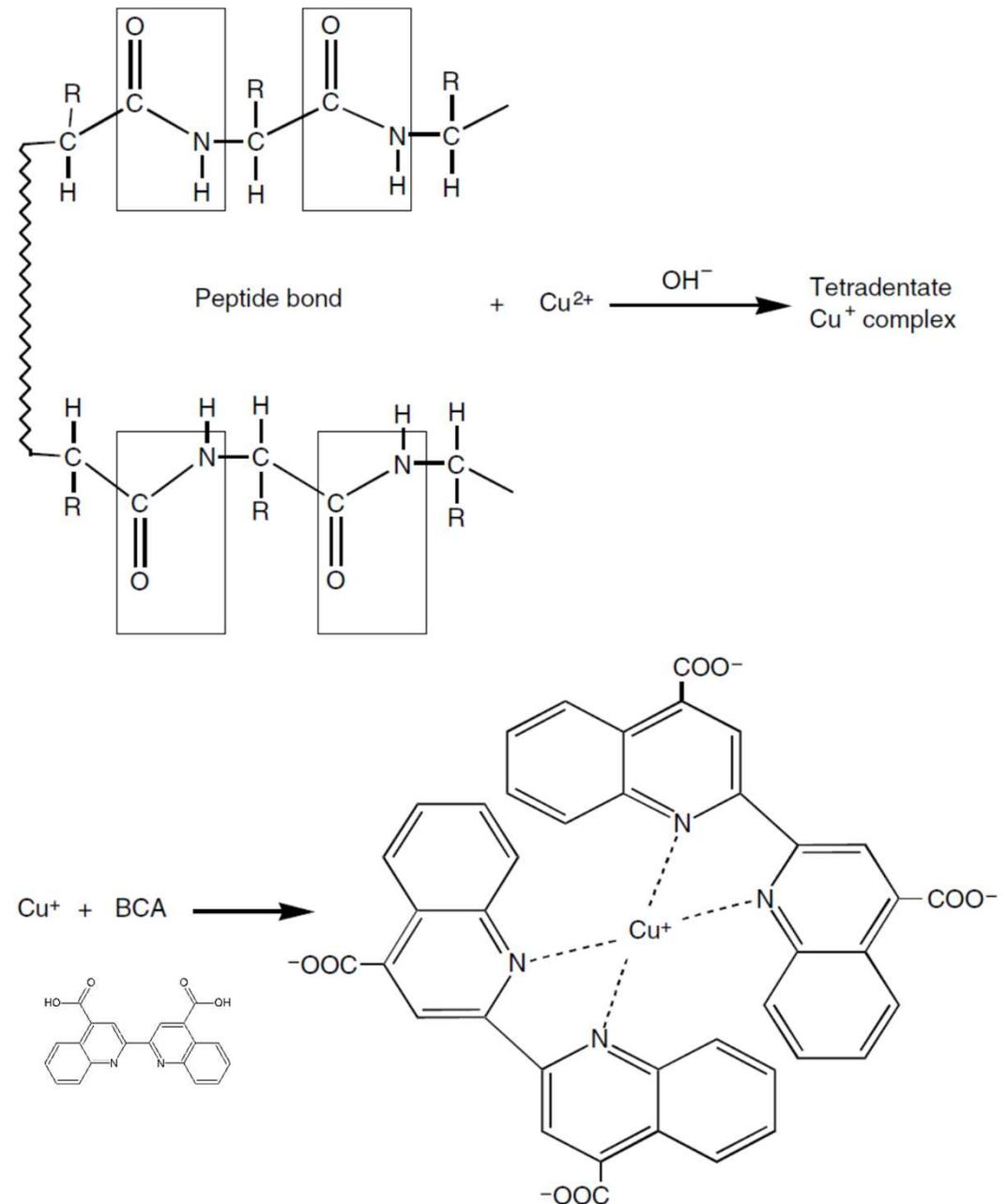
O íon Cu^+ formado reduz uma mistura de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reagente de Folin) formando tungstato e molibdato, os quais absorvem em 720 – 750nm.

Método de BCA (bicinchonic acid)

peptide bonds of protein first reduce cupric ion (Cu^{2+}) to (Cu^+) complex in alkaline medium.

The cuprous ion complex then reacts with BCA (2 molecules per Cu^+ ion) to form an intense purple color that can be measured at 562 nm.

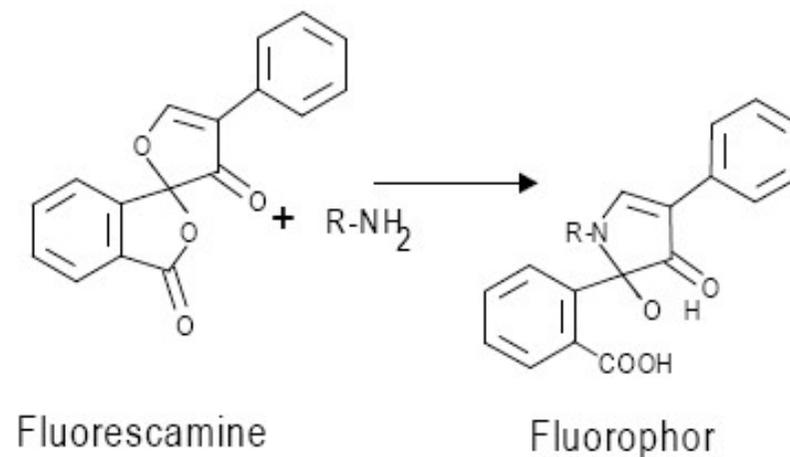
The presence of four amino acids (cysteine, cystine, tryptophan, and tyrosine) in the protein is responsible for the color development.



Fluorescamina

Este composto reage com grupos amino presentes na proteína formando um produto fluorescente (**Excitação em 390 nm; Emissão em 475 nm**). Desta forma, trata-se de um método extremamente sensível (pmoles).

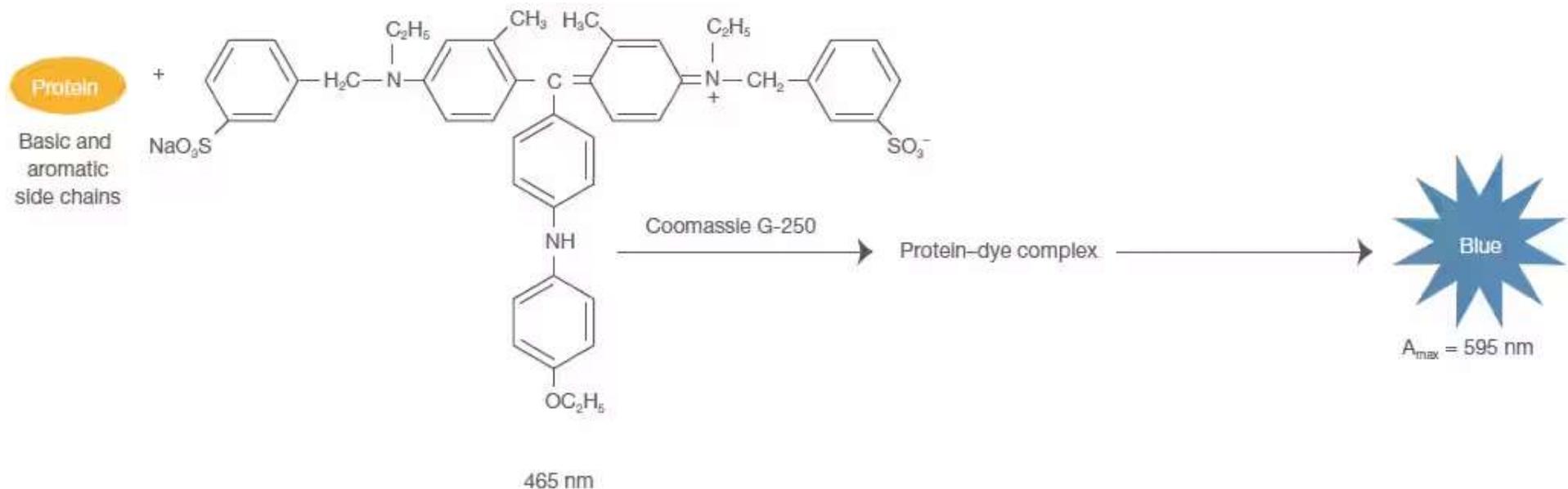
Desvantagem: qualquer grupo amino pode reagir com a fluorescamina. Portanto, o método não é específico para proteínas.



Reagente de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250)

Comassie forma complexos com proteínas por meio de interações iônicas com aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) além de sofrer interações de van der Waals e hidrofóbicas (aminoácidos aromáticos).

A formação do complexo proteína-CBBG altera o espectro de absorção do corante, mudando o seu máximo de absorção de 465 nm para 595 nm.



Dosagem de proteínas – Reagente de Bradford

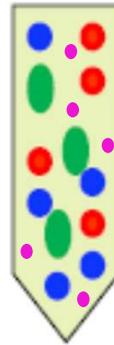
**Lisado bruto
contém:**

Proteínas

Lipídeos

Carboidratos (açúcares redutores)

Ácidos nucleicos



Determinar mg proteínas /mL do lisado

Estratégia para dosagem de proteínas no lisado das células de levedura

Dos métodos discutidos anteriormente, quais métodos seriam adequados para dosar a concentração de proteínas totais do lisado?

- **Medida direta da Abs** em 220 (ligações peptídicas), ou 280 nm (aminoácidos aromáticos)?
- **Métodos indiretos** – Biureto
 - BCA
 - Bradford

Considerações:

Minha proteína está pura ?

Pureza – interferentes proteicos e não proteicos

Tenho concentração suficiente?

Concentração – faixa linear

Tenho um padrão da proteína?
de BSA

Padrão – Ou então será determinado em equivalentes

Interferentes não proteicos

Table 1. Substances compatible with Thermo Scientific™ Pierce™ protein assays and the Qubit Protein BR Assay.

Test compound	Pierce Rapid Gold BCA	Pierce BCA	Pierce Microplate BCA-RAC*	Pierce Micro BCA	Pierce Modified Lowry	Pierce Detergent Compatible Bradford	Pierce Coomassie Plus	Pierce Coomassie	Pierce 660 nm	Qubit Protein BR Assay
2D sample buffer†	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Undiluted**	NA
2-mercaptoethanol	∅	0.01%	25 mM (35)	1 mM	1 mM	1 M	1 M	1 M	1 M	1 mM
ACES, pH 7.8	25 mM	25 mM	∅	10 mM	NA	NA	100 mM	100 mM	50 mM	NA
Acetone	10%	10%	∅	1%	10%	10%	10%	10%	50%	NA
Acetonitrile	10%	10%	30%	1%	10%	10%	10%	10%	50%	20%
Ammonium sulfate	∅	∅	∅	∅	∅	1 M	1 M	1 M	125 mM	200 mM
Aprotinin	10 mg/L	10 mg/L	∅	1 mg/L	10 mg/L	10 mg/mL	10 mg/L	10 mg/L	2 mM	NA
Ascorbic acid	NA	∅	NA	∅	1 mM	50 mM	50 mM	50 mM	500 mM	NA
Asparagine	NA	1 mM	∅	NA	5 mM	NA	10 mM	10 mM	40 mM	NA
Bicine	20 mM	20 mM	1 mM	2 mM	NA	100 mM	100 mM	100 mM	>1 M	100 mM
Bis-Tris, pH 6.5	NA	33 mM	16.5 mM	0.2 mM	NA	100 mM	100 mM	100 mM	50 mM	NA
Borate (50 mM), pH 8.5	Undiluted	Undiluted	∅	1:4	NA	Undiluted	Undiluted	Undiluted	Undiluted	Undiluted
B-PER reagent	Undiluted	Undiluted	1:3	NA	NA	Undiluted	1:2	1:2	1:2	Undiluted
B-PER reagent II	NA	NA	1:4	NA	NA	NA	1:4	NA	1:2	Undiluted
B-PER reagent PBS	NA	NA	1:4	NA	NA	Undiluted	NA	NA	1:2	Undiluted
Brij-35	5%	5%	0.63%	5%	0.031%	1%	0.062%	0.125%	5%	NA
Brij-56	NA	1%	NA	1%	0.062%	NA	0.031%	0.031%	NA	NA
Brij-58	1%	1%	0.50%	1%	0.062%	1%	0.016%	0.031%	5%	NA
Bromophenol blue (in 50 mM NaOH)	∅	∅	∅	∅	∅	NA	∅	∅	0.031%	NA
Calcium chloride (in TBS, pH 7.2)	10 mM	10 mM	1 mM	10 mM	NA	10 mM	10 mM	10 mM	40 mM	NA
Cesium bicarbonate	NA	100 mM	∅	100 mM	50 mM	NA	100 mM	100 mM	100 mM	NA
Cetylpyridinium chloride	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.5%**	NA
CHAPS	5%	5%	10% (10)	1%	0.062%	5%	5%	5%	5%	5%
CHAPSO	5%	5%	∅	5%	0.031%	5%	5%	5%	4%	NA
CHES	100 mM	100 mM	50 mM	100 mM	NA	NA	100 mM	100 mM	>500 mM	NA
Cobalt chloride (in TBS, pH 7.2)	0.8 mM	0.8 mM	0.4 mM	∅	NA	NA	10 mM	10 mM	20 mM	NA

método	Faixa linear	Interferentes
Bradford	Standard protocol: Sample-to-reagent ratio: 1:50 100–1,500 µg/mL (20 µL)	<ul style="list-style-type: none"> • Detergents
BCA	Standard protocol: 20–2,000 µg/mL (50 µL)	<ul style="list-style-type: none"> • Reducing sugars and reducing agents • Thiols • Copper-chelating agents • Ascorbic acid and uric acid • Tyrosine, cysteine, and tryptophan • 50 mM imidazole
Lowry	Standard protocol: 1–1,500 µg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Detergents (cause precipitation) • Thiols, disulfides • Copper-chelating reagents Carbohydrates including hexosamines and their <i>N</i>-acetyl derivatives • Glycerol, Tris, tricine, K⁺ ions

A escolha do Padrão

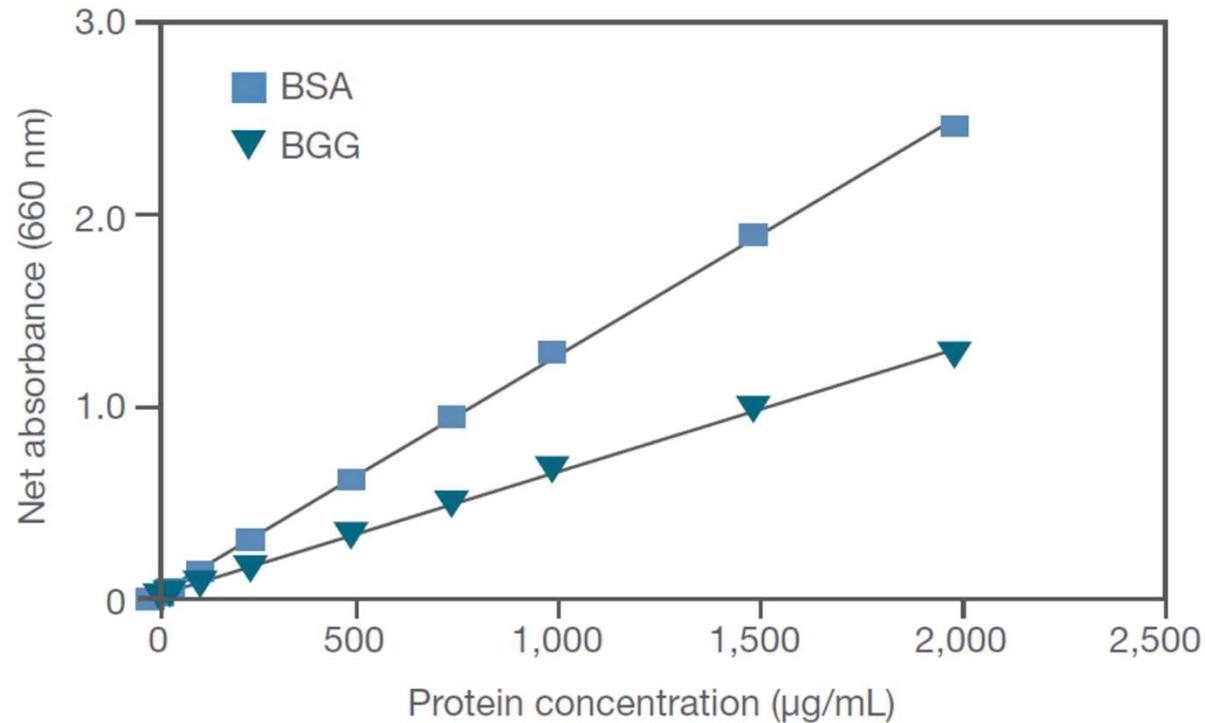
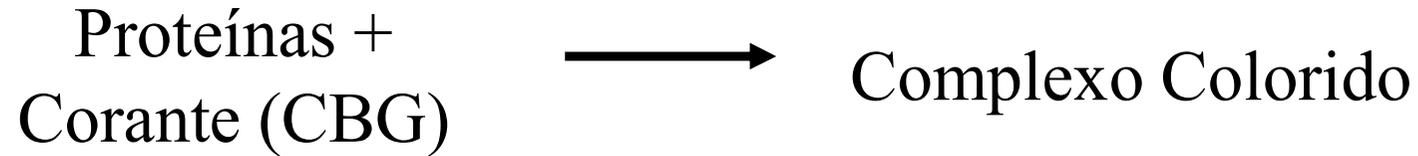


Figure 24. Typical color response curves for the test tube procedure of the Pierce 660 nm Protein Assay Reagent. The linear detection ranges are 25–2,000 µg/mL for BSA and 50–2,000 µg/mL for BGG. The average absorbance for the blank replicates (control) was subtracted from the absorbance for individual standard replicates.

Estratégia para dosagem de proteínas no lisado das células de levedura

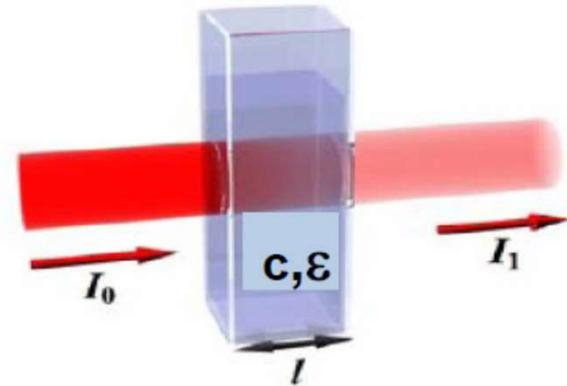


Como correlacionar a “cor formada” com a quantidade de proteína presente?

LEI DE BOUGER-LAMBERT-BEER

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times l$$

$$\text{Absorbância}_{nm} = \epsilon_{nm} \times c \times l$$



ϵ_{nm} = coeficiente de absorção molar

(característico da molécula; unidades = $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

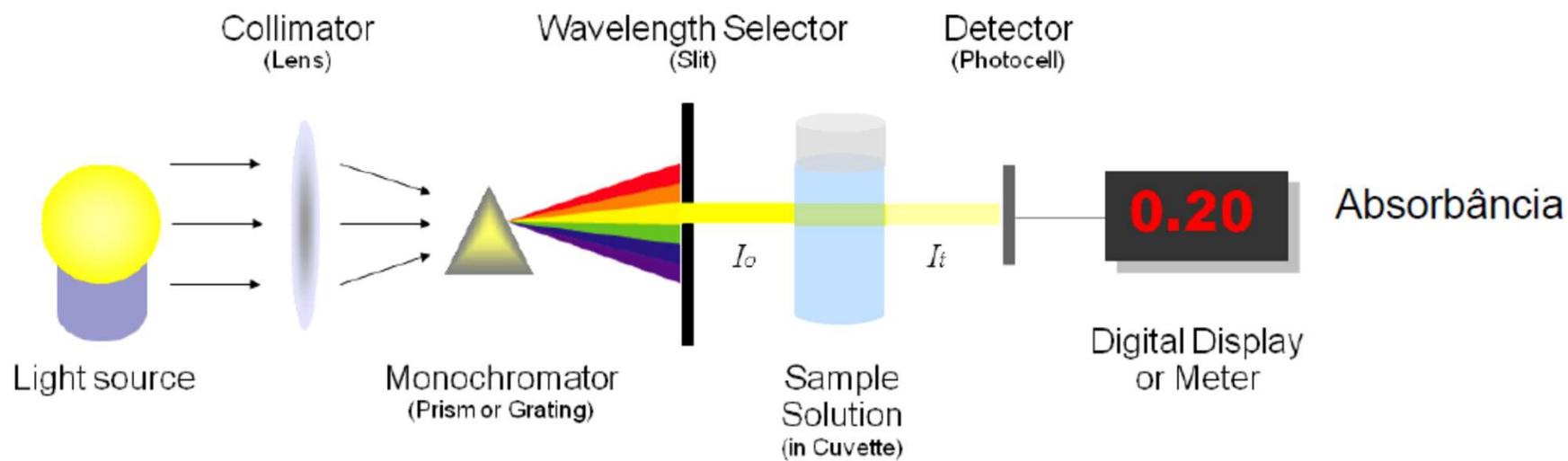
c = concentração Molar (M)

l = caminho percorrido pela luz (caminho óptico) cm

I = luz “recuperada”

I_0 = luz incidente

ESPECTROFOTÔMETRO & LEITOR DE PLACAS



Curva padrão para dosagem de proteínas com Reagente de Bradford (Comassie Blue G)

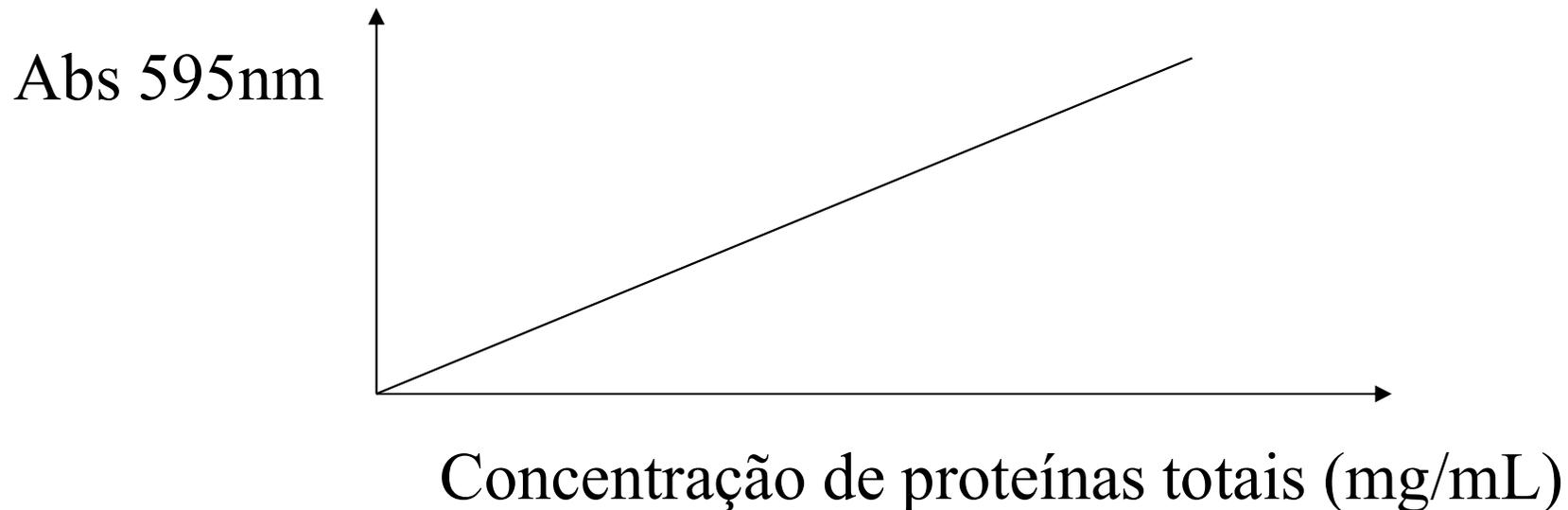
Diferentes massas de proteína



Corante



Absorbância (595 nm)



Dosagem das Proteínas presentes no lisado

Dosagem de proteínas – Reagente de Bradford

A) Diluir a amostra

Não se pode extrapolar uma concentração acima ou abaixo do maior ou menor ponto linear da curva de calibração.

Diluições são muito importantes para uma amostra desconhecida – para dosar na faixa linear

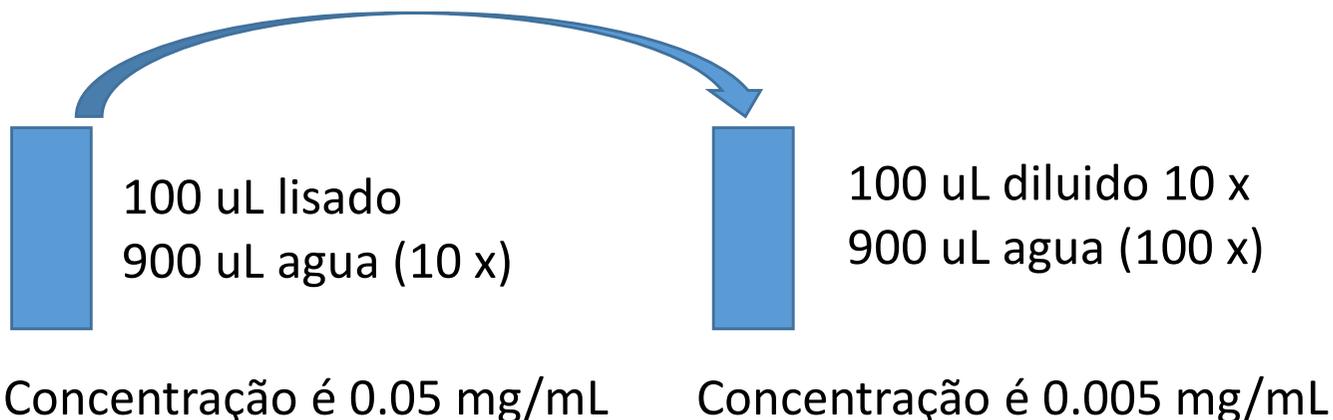
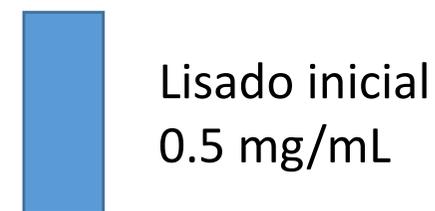
microtubo	Lisado	Água (uL)
10x	100 uL	900
50x	100 uL do 10x	400
100x	100 uL do 10x	900

A importância da diluição

– a absorbância da amostra precisa cair dentro dos limites da curva de calibração – fazemos várias “tentativas na forma de diluições”

Diluição prévia: Não sabemos a concentração de proteínas no lisado.

Mas: Supor concentração de proteínas no lisado é 0.5 mg/mL



Homogeneização é essencial!!!

Dosagem das Proteínas presentes no lisado

Dosagem de proteínas – Reagente de Bradford

B) Construção da curva padrão

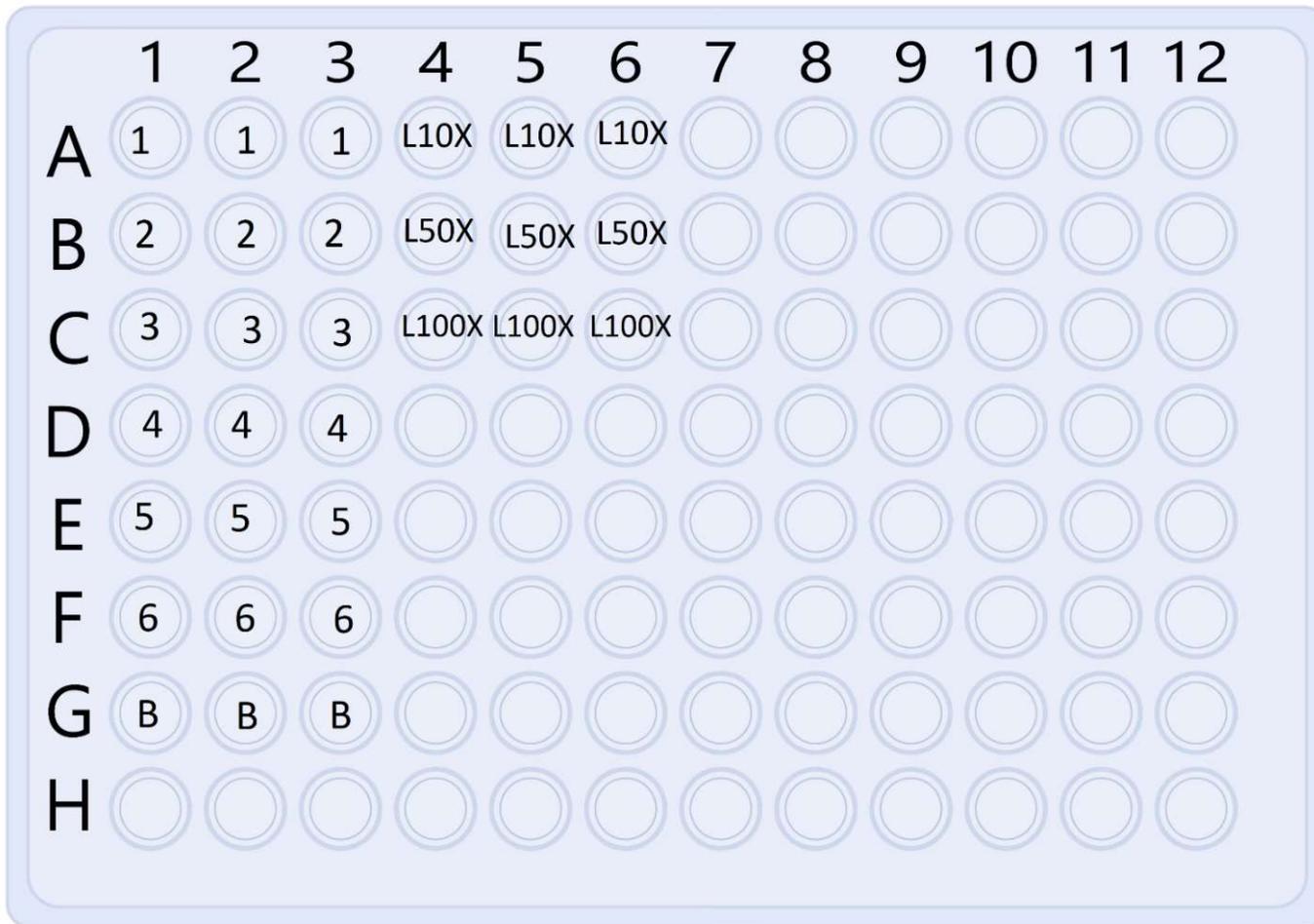
Concentrações crescentes de albumina

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

Dosagem das Proteínas presentes no lisado

Reagente de Bradford

Transferir 10 uL da curva ou diluições da amostra para uma microplaca **em triplicata**



200 uL do reagente de Bradford
5 min a T ambiente



Ler em 595 nm –
fazer 2 leituras comparativas:
1) zerando com o branco
2) Lendo a abs do branco

Dosagem das Proteínas presentes no lisado

A importância da reprodutibilidade

- 1) Sempre homogeneizar as amostras antes de cada diluição
- 2) Pipetar com muito cuidado
- 3) Fazer sempre em triplicatas – representar com media, SD e CV

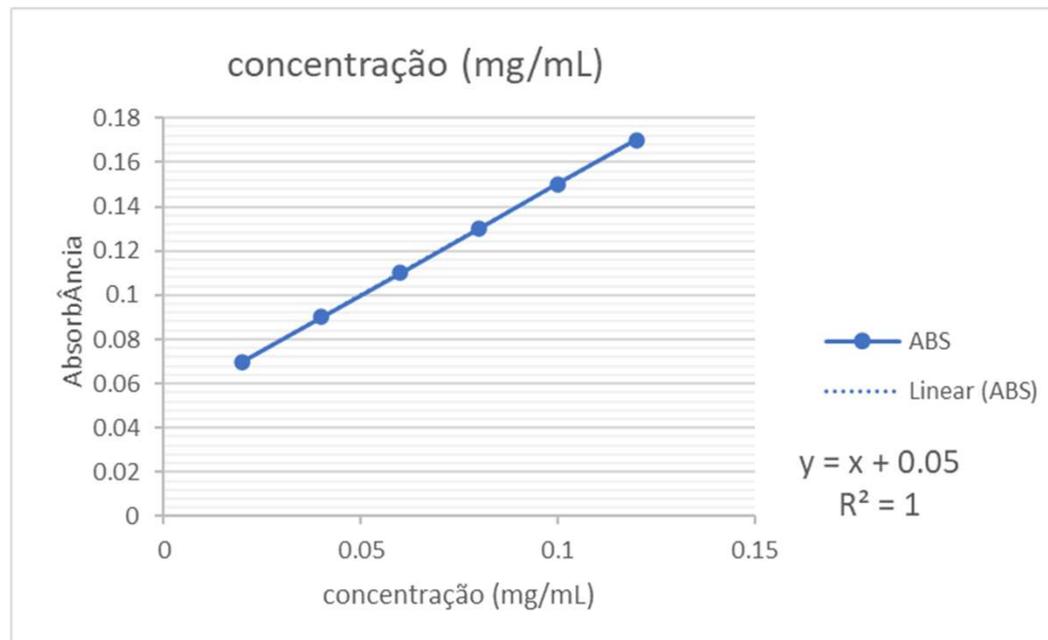
Dosagem das Proteínas presentes no lisado

A atividade no laboratório será considerada realizada se:

1) Construção da curva padrão – precisa ser linear

Plotar o valor de Abs versus a concentração de albumina e obter o gráfico e equação da reta, relacionando a Abs a 595 nm com a quantidade de proteína.

2) Foto da absorbância das diluições - Uma ou mais diluições do lisado precisam ter abs dentro dos limites da curva de calibração



Lembretes finais:

- Rever a aula e os protocolos das práticas 1 e 2 **antes** da aula e estudar o material especificado
- Uso de avental é obrigatório no laboratório e o uso de sandálias, shorts é proibido.
- Trazer sempre a apostila de práticas **inteira** e completar as tabelas durante as práticas (caderno de laboratório) as quais devem ser apresentadas ao professor antes de deixarem o laboratório.
- Preparar o lisado com cuidado pois o material será utilizado durante todo o curso. Manter sempre no gelo. Evitar coletar o precipitado!!**
- Rever cálculos de soluções, diluições e Eq. da reta.
- Trazer a **primeira página** da declaração sobre segurança em laboratório assinada.

Referências

Proteins – Structure and Molecular Properties, Thomas E. Creighton, Segunda edição – 1993 -Capítulo 1

Krystal et al. (1985). Anal. Biochemistry 148, 451 – 460 ([prata](#))

M. M. Bradford (1976). Anal. Biochemistry 72, 248 – 254
([Comassie Blue](#))

G. L. Peterson (1979). Anal. Biochemistry 100, 201 – 220
([Reagente de Folin](#))

S.C. Gill e P.H. von Hippel (1989). Anal. Biochemistry 182, 319 – 326. ([Absorção na região de luz UV](#))

H. Ahmed (2005). Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization ([todos os métodos](#))