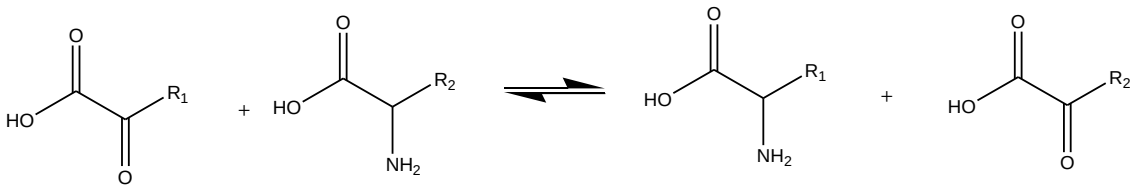
Aula prática: Transaminação

OBJETIVO:

Verificar as reações de transaminação em homogenato de fígado.

INTRODUÇÃO:

A transaminação consiste na transferência reversível do grupo amino de um aminoácido a um cetoácido, sem que o grupo NH_3 fique livre no meio aquoso. O aminoácido perde o grupo amino e converte-se no cetoácido correspondente, e num segundo par ocorre a reação inversa:



Cetoácido 1 aminoácido 1 aminoácido 2 cetoácido 2

As transaminases encontram-se na maioria dos tecidos animais, especialmente no fígado. Nesta experiência serão identificados os produtos de uma reação de transaminação por meio de cromatografia em papel.

MÉTODO:

O sistema completo de reação é composto por um aminoácido, um cetoácido, a preparação enzimática, arsenito de sódio e um tampão. O arsenito é empregado com a finalidade de evitar a oxidação dos cetoácidos pelo homogenato.

REAGENTES:

Mistura de reação:

Reagente	Volume (µL)
α-cetoglutarato	300
Preparo enzimático de homogenato	300
Alanina	300
Tampão fosfato	500
Arsenito de sódio	400

Controle negativo (branco):

Reagente	Volume (µL)
α-cetoglutarato	300
Água destilada	300
Alanina	300
Tampão fosfato	500
Arsenito de sódio	400

Solvente para cromatografia

Butanol (50:)

Etanol (20:)

NH_4OH(0,5N) (30:)

PROTOCOLO:

1. Preparar a Mistura de reação e o Branco em tubos, conforme os volumes da tabela.

2. Incubar a 37°C por 30 min, e em seguida num banho-maria fervente por mais 3 min (atenção, usar pinça para manipular a amostra no banho fervente, para evitar queimaduras).

Enquanto as amostras estão incubando no banho-maria, preparar o papel para a cromatografia: **manipular o papel Whatman com luvas, nunca pegar o papel sem luvas, sempre que possível, pegar o papel pelas bordas. Não colocar o papel direto na bancada, colocar um papel-toalha em cima da bancada. Não assoprar ou falar em cima do papel.**

Traçar suavemente com lápis e régua no papel as linhas, conforme indicado na figura abaixo, seguindo as medidas de espaço. Fazer pontos de lápis pequeno onde serão pipetadas as amostras.

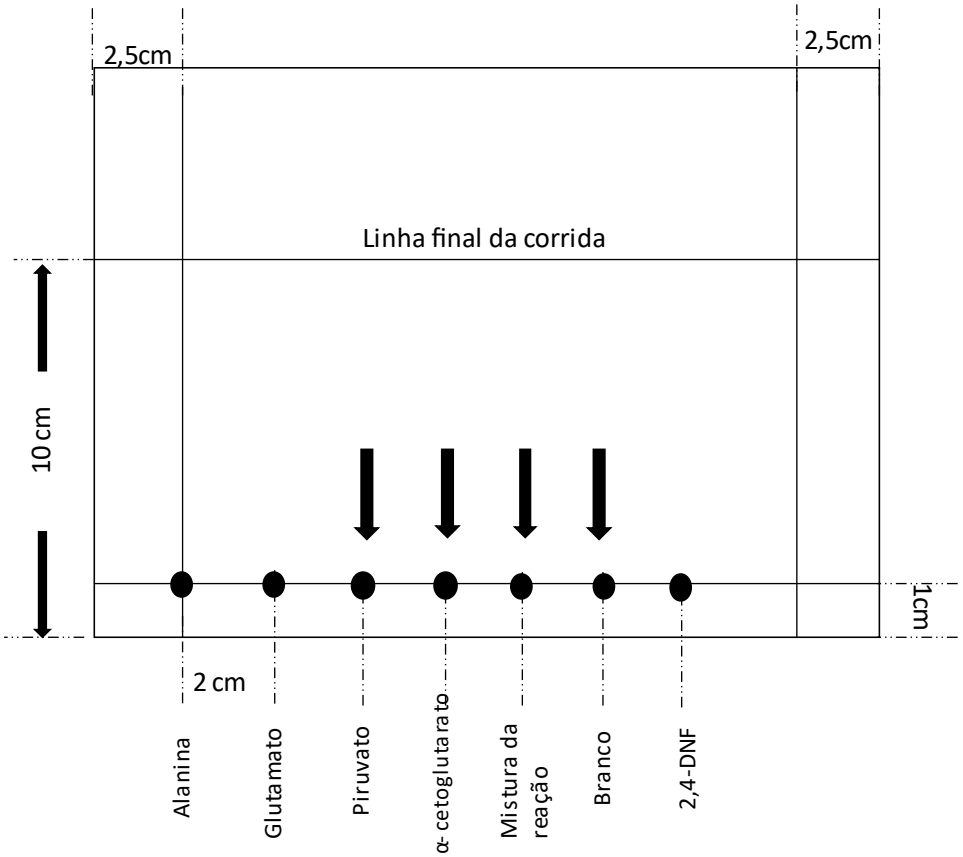


Figura 1: Esquema do papel para cromatografia. 2,4-DNF: 2,4-dinitrofenilhidrazina

3. Após incubar no banho, centrifugar as amostras por 10 min em centrífuga.

4. Transferir o sobrenandante dos tubos com pipeta para outros dois tubos.

5. Pipetar 2µL das respectivas amostras, conforme a figura 1. A cada troca de amostra, lembrar de trocar a ponteira da pipeta.

6. Esperar secar as amostras e então, nas 4 amostras indicadas pelas setas na figura 1, pipetar por cima 2µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina, e esperar secar (onde foi pipetado 2,4-dinitrofenilhidrazina deve ficar amarelo).

7. Enrolar o papel de cromatografia como um cilindro e prender com um clipe na parte superior, deixando o lado em que as amostras foram pipetadas para o exterior.

8. Pegar cerca de 20 mL de solvente para cromatografia na capela e colocar dentro do béquer, em seguida, colocar o papel enrolado no centro, com o lado onde as amostras foram pipetadas em contato com o fundo do béquer contendo solvente.

9. Fechar bem o béquer contendo o solvente com plástico PVC e levar para bancada. Esperar até que a frente do solvente chegue na linha final da corrida, conforme marcado na figura 1.

10. Após final da corrida, secar papel em estufa à 80°C e marcar os pontos coloridos com lápis.

11. Em seguida, embeber a cromatografia em solução de ninhidrina na capela, e depois secar o papel na estufa.

12. Marcar a posição onde as manchas aparecerem.