

## **LABORATÓRIO: ANÁLISE DO FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS DO LEITE**

---

### **I. FUNDAMENTOS**

Proteínas podem ser isoladas e purificadas utilizando-se princípios físico-químicos, que levam em conta as propriedades como hidrofobicidade, polaridade e carga dessas biomoléculas. Na prática de hoje, vamos utilizar a diferença da solubilidade de proteínas em diferentes pH para isolar as proteínas do leite.

#### *Eletroforese para Separação de Proteínas em Gel de Poliacrilamida Desnaturante com Dodecil Sulfato de Sódio (em inglês, SDS-PAGE)*

A eletroforese é um método de separação que se baseia na migração das moléculas em relação a um campo elétrico, devido à sua carga. É amplamente utilizada para a análise de macromoléculas (proteínas, DNA e RNA) numa matriz sólida, como um gel ou papel. Normalmente se utiliza um gel, devido à supressão das correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura e porque o gel funciona como uma peneira molecular, permitindo a separação das macromoléculas por tamanho.

O gel para a eletroforese de proteínas é constituído de um polímero de acrilamida. Esta polimerização ocorre na presença de radicais livres, os quais são gerados por persulfato de amônio e estabilizados por TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamino). A polimerização também depende da presença de um agente de 'crosslinking', o N,N'-metileno-bis-acrilamida, que facilita a ligação das cadeias entre si, formando um gel cuja porosidade é determinada pelo comprimento das cadeias e pelo grau de interligação entre estas.

A separação de proteínas ocorre em condições desnaturantes. A mistura de proteínas é dissolvida em tampão de amostra, que contém dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um detergente aniônico que rompe as ligações não-covalentes existentes na proteína nativa resultando na sua desnaturação. Neste tampão também temos  $\beta$ -mercaptoetanol, que reduz as pontes de dissulfeto existentes nas proteínas.

### **II. OBJETIVOS**

Fracionar as proteínas do leite em base a precipitação no ponto isoeletrico (pI) seguida de sua análise por SDS-PAGE

### III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 1. Precipitação no pI

- Preparar uma série de tubos de ensaio de acordo com a tabela 1.
- Adicionar, a cada um dos tubos, uma alíquota (5,0 mL) de solução de leite em pó desnatado (5%, previamente centrifugado).
- Agitar os tubos e aguardar 5 minutos.

**Tabela 1 – Precipitação de proteínas do leite em distintos pH.**

Tubo	1	2	3	4	5
pH	6,7	5,7	4,7	3,7	2,7
Ácido acético 0,1 mM	1.0 mL				
Ácido acético 1 mM		1.0 mL			
Ácido acético 50 mM			1.0 mL		
Ácido acético 1 M				1.0 mL	
Ácido acético 2 M					1.0 mL
Turvação (sim/ Não)					

- Separar alíquotas de 1,0 mL, distribuir em tubos plásticos ("eppendorfs") e centrifugar 5000 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente.
- Descartar a fase sobrenadante e suspender o precipitado em 1,0 mL de NaOH 0,1M. (Observação: utilizar o mesmo procedimento mesmo para os tubos que aparentemente não apresentam precipitado)
- Após a dissolução total do precipitado, separar uma alíquota da solução obtida (10,0 µl) para SDS-PAGE, em tubos "eppendorf".

#### 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE)

- Para este experimento, serão utilizadas como amostras:
  - alíquotas das proteínas purificadas anteriormente, a partir de uma solução de leite em pó (amostras 1 a 5).
  - a solução contendo o extrato bruto de proteínas totais de leite em pó (5,0 µl) para comparação (amostra 6).
  - Soro bovino diluído a 10% (10,0 µl) para comparação (amostra 7).
  - Albumina bovina a 4,0 mg/mL (5,0 µl) (padrão de peso molecular: 66,0 KDa) (amostra 8).

-Montar o aparato para eletroforese (o gel de eletroforese será preparado previamente), adicionar na cuba o tampão de corrida até cobrir os poços do gel para eletroforese.

-Adicionar tampão de amostra (10  $\mu$ l) a cada uma das amostras, e aquecer (2 minutos, 100°C) para desnaturar as proteínas. Resfriar (gelo) e aplicar 12  $\mu$ l nos poços do gel para eletroforese seguindo a ordem da tabela 2.

Poço n	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Amostra	padrão	1	2	3	4	5	6	7	8

-Aplicar a tensão nos eletrodos do aparato de eletroforese (150 V) e aguardar (cerca de 50 minutos) até que o corante marcador (Azul de Bromofenol) se aproxime da base do gel. Aproveite o tempo para pensar no relatório!

-Interromper a eletroforese e mergulhar o gel em uma 'solução de coloração': Coomassie Blue R (0,25g) em metanol:ácido acético:água (45%:10%:45%). Aguardar (5-10 minutos).

-Substituir a solução de coloração pela solução de descoloração: metanol:ácido acético:água (45%:10%:45%) (15 minutos).

**ATENÇÃO:** Usar luvas ao manipular os géis, pois os monômeros de acrilamida são tóxicos.

-Verificar as proteínas coradas, e estimar por comparação, a purificação da amostra.