

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 β -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 μ l) a cada uma das amostras, e aquecer (2 minutos, 100°C) para desnaturar as proteínas. Resfriar (gelo) e aplicar 12 μ 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.