

QBQ1453 – Bioquímica Experimental

Lise celular

Nicolás Hoch

Proteínas: moléculas essenciais para a vida:

Enzimas

(ex. Alfa glicosidase
584 aminoácidos)



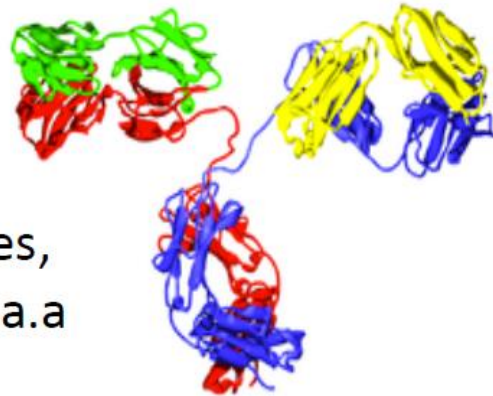
Hormônios

(ex. hormônio do crescimento
191 a.a)



Anticorpos

IgG (2 cadeias leves,
2 pesadas, ~1500 a.a)



Transportadores

(ex. Ca²⁺ATPase, 997 a.a)



- Análises clínicas, biofármacos e medicamentos, uso industrial

Tipos de macromoléculas presentes na célula

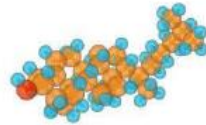
Ácidos nucleicos: DNA, RNA (ribossômico, mensageiro, transportador, micro RNAs).



Proteínas e/ou peptídeos.



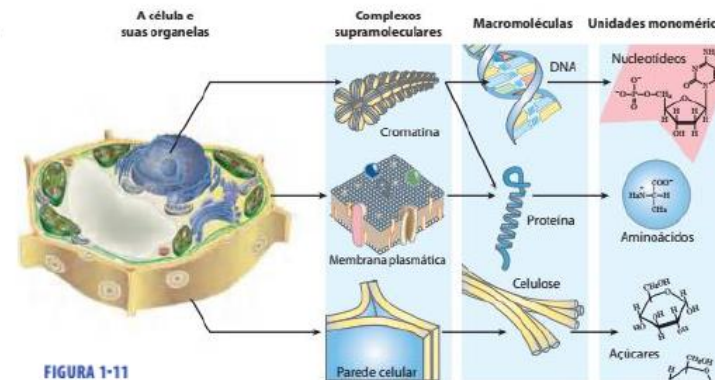
Lipídeos.



Carboidratos.



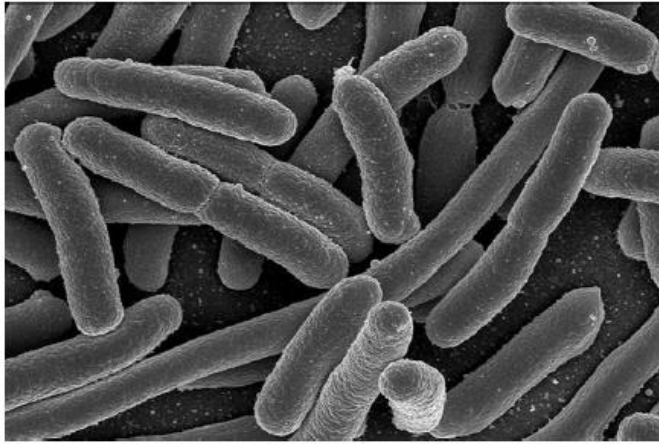
Metabólitos.



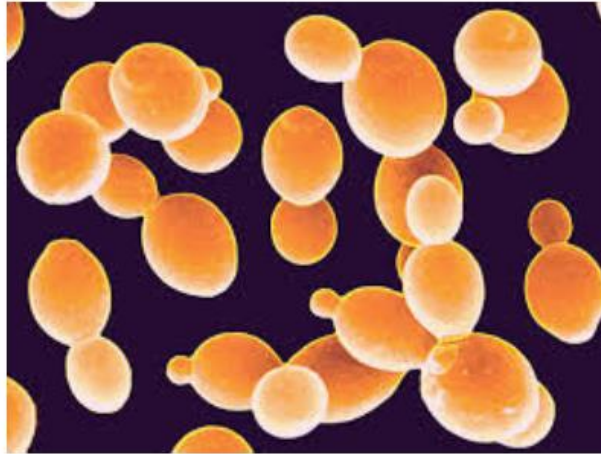
Proteínas: de onde e como extraí-las ?

- A obtenção da proteína em forma pura (ou quase pura) é necessária para desvendar a sua estrutura e função através de métodos analíticos.
- Amostras biológicas (células, tecidos animais ou vegetais) são misturas complexas de biomoléculas com milhares de proteínas distintas.
- A **purificação de proteínas** é uma etapa importante nos processos de produção de fármacos, insumos alimentares e industriais.

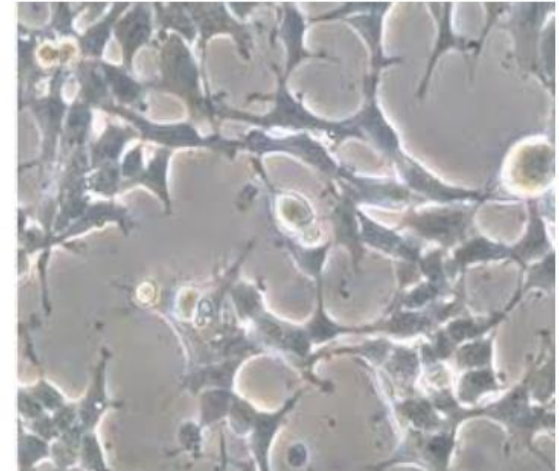
Proteínas: de onde e como extraí-las ?



Bactérias (0,1 – 5,0 μm)



Leveduras (3,0 - 5,0 μm)



Células animais (10 - 100 μm)

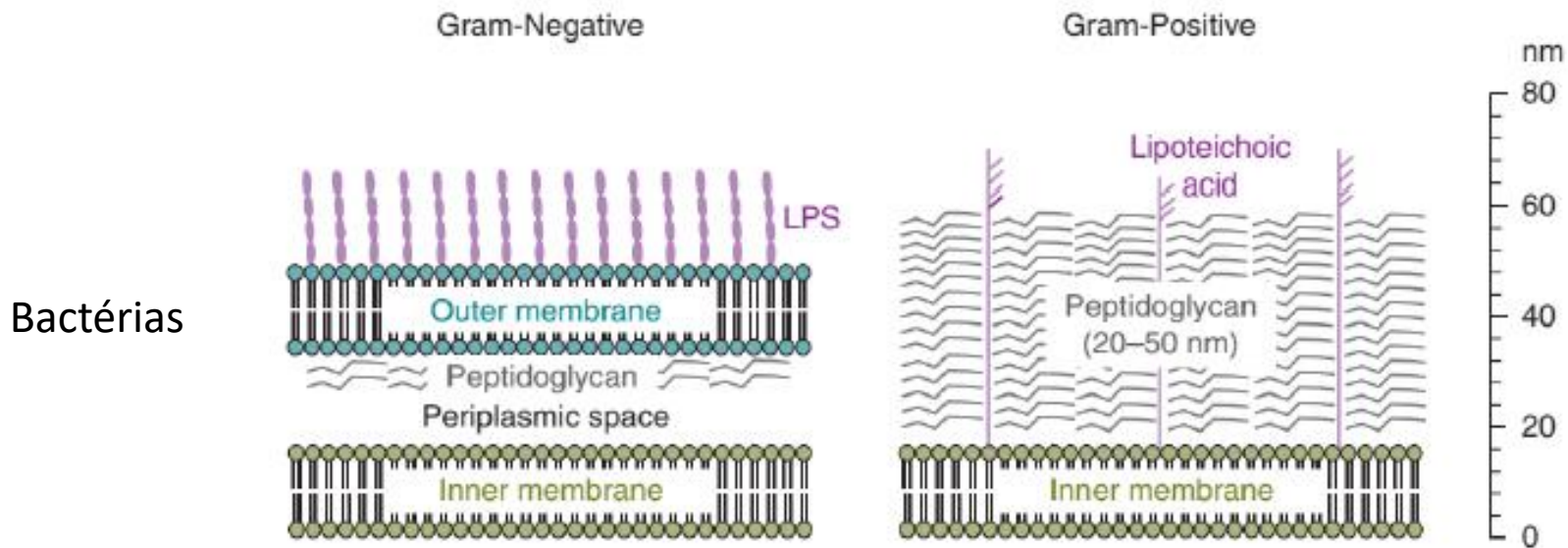
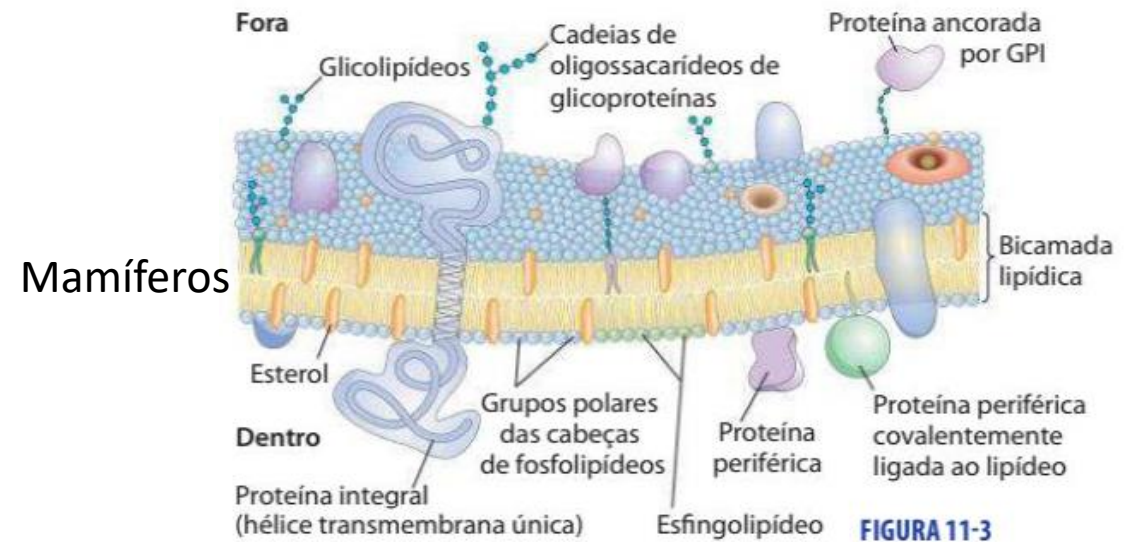
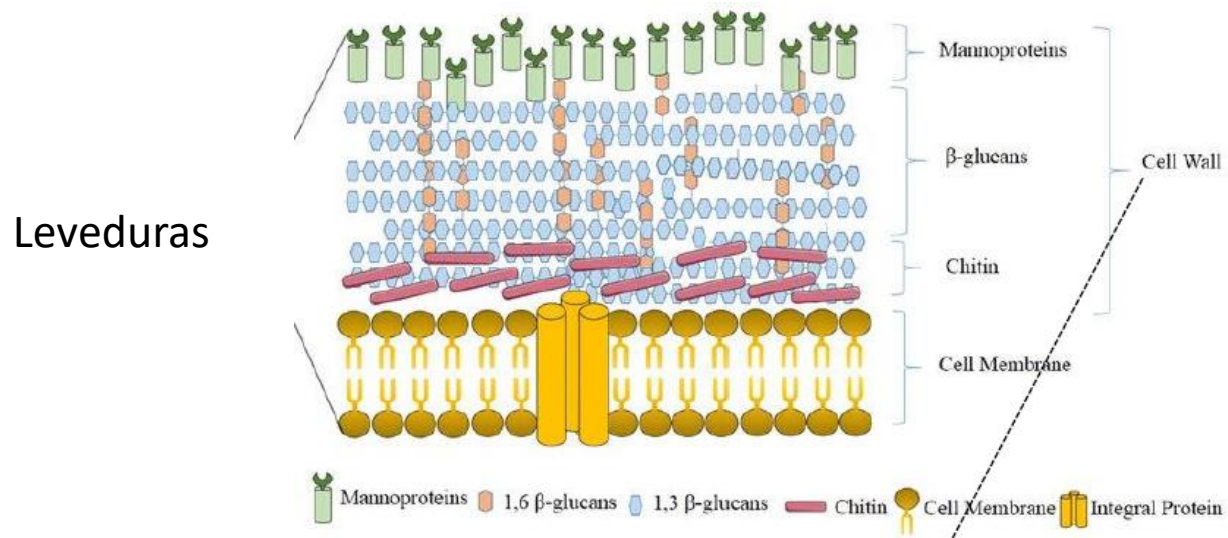


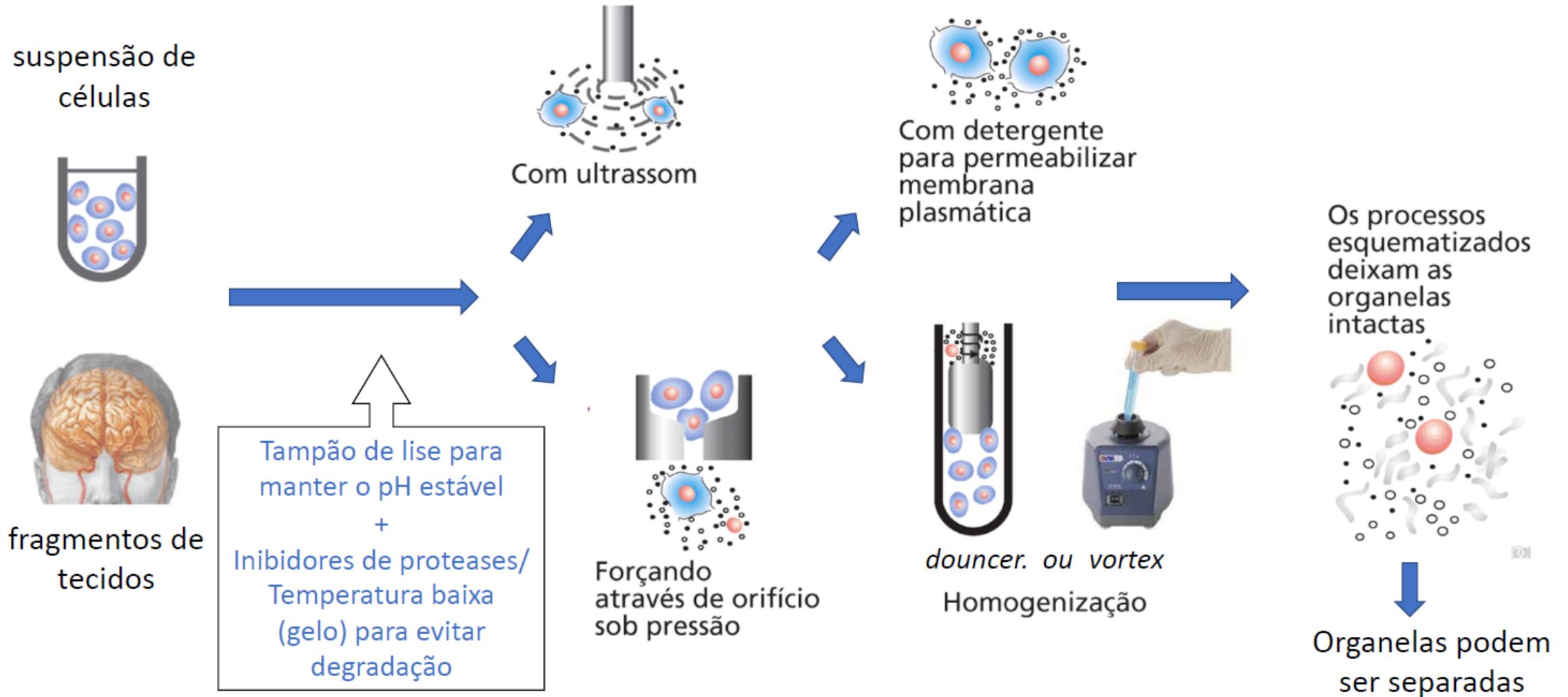
Figure 5.2 The structure of the cell wall of Gram-negative and Gram-positive bacteria. LPS, lipopolysaccharide.



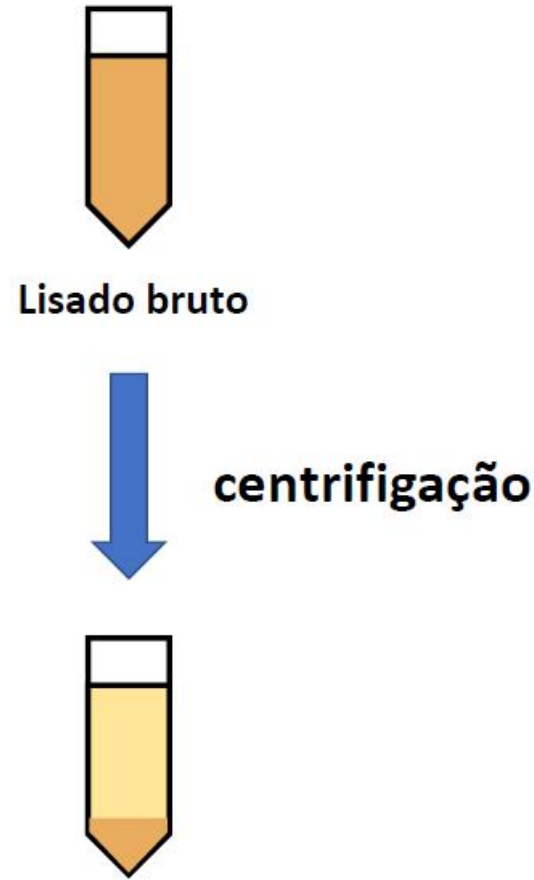
Lise celular

- interrupção da membrana da célula através de métodos **físicos, químicos ou enzimáticos**.
- Resulta em um fluido, o “**lisado**” ou “**homogenato**” que é uma mistura de fragmentos celulares e componentes moleculares.
- Etapa que **antecede a purificação** de componentes moleculares (proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos) ou organelas celulares.

Métodos para obtenção de lisado a partir de células/tecidos



Fracionamento do lisado por centrifugação



Lisado bruto

centrifugação

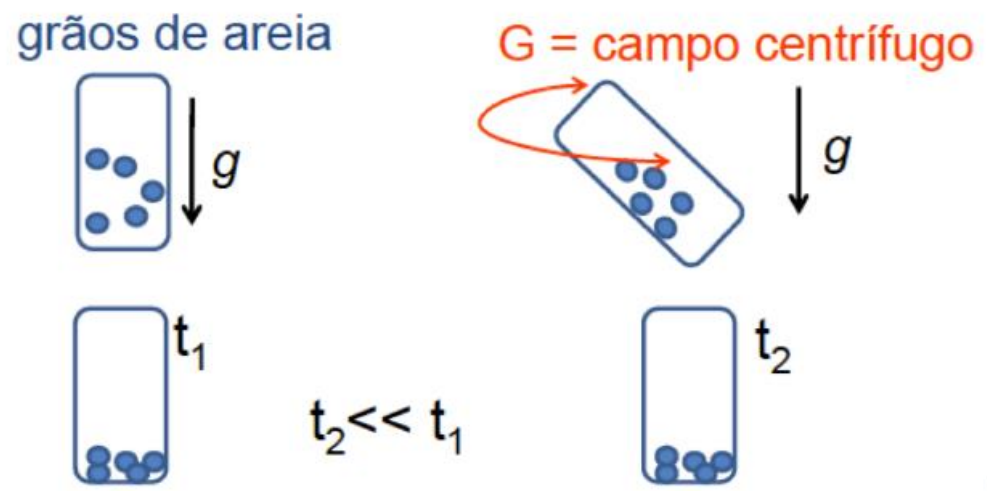
Lisado clarificado

Sobrenadante: moléculas em solução no citoplasma
Precipitado: células íntegras, fragmentos de células/tecidos, organelas

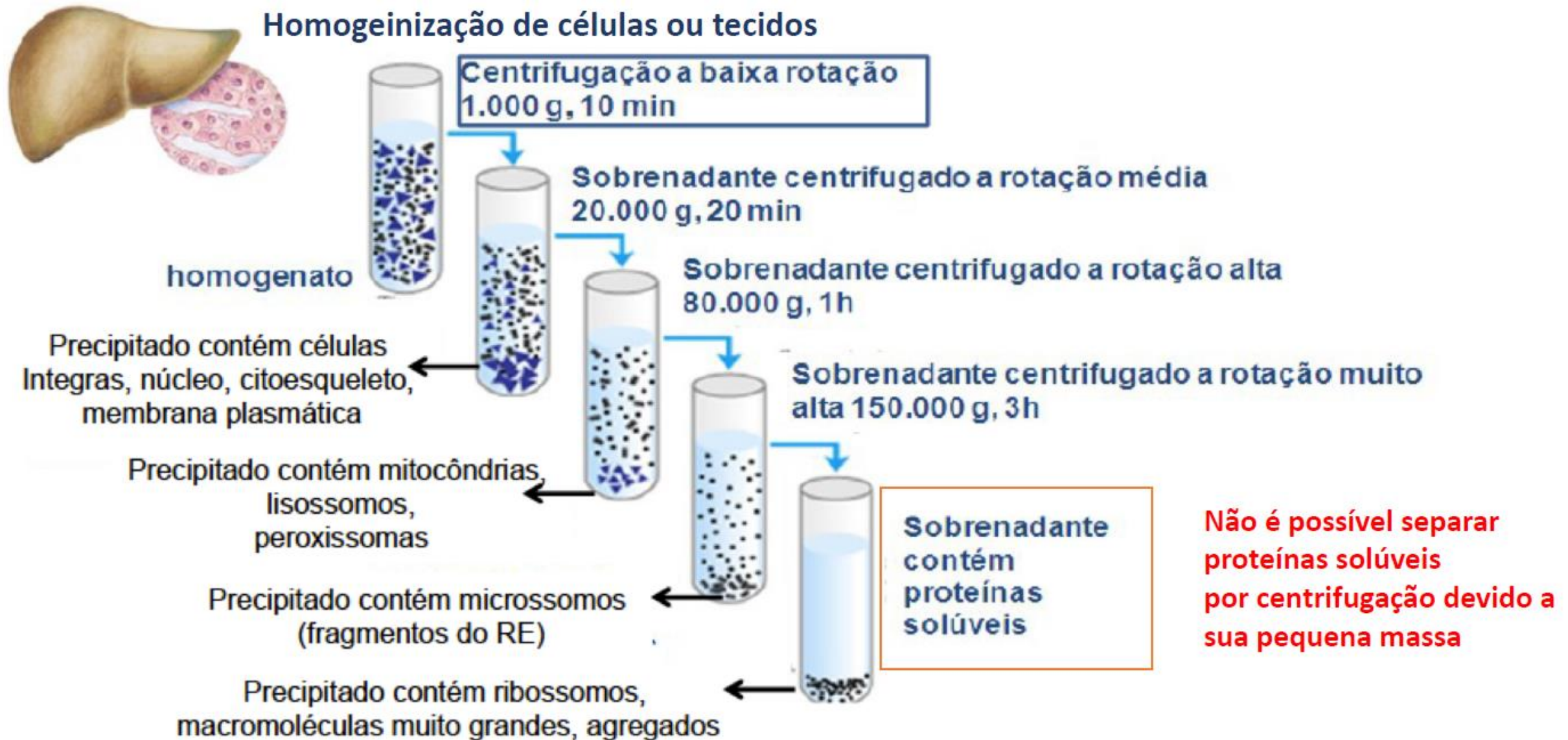


Centrífuga

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



Fracionamento de componentes celulares por centrifugação diferencial



Composição do tampão de extração

- Agente tamponante para manter constante o pH do meio
Ex: Tris, HEPES, fosfato, bicarbonato
- Sal para manter força iônica da solução (em geral entre 0.1 e 0.2M)
Ex: NaCl 150mM
- Agentes redutores/antioxidantes para regular estado redox
Ex: cisteína, DTT, beta-mercaptoetanol, glutathiona reduzida
- Inibidores de protease
Ex: PMSF (serina proteases), E-64 (cisteína proteases), Pepstatina (aspartato proteases), EDTA (metaloproteases).
Manter amostra no gelo

Prática 1

A) Lise de Células de Levedura

Objetivos

Romper as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

- água destilada
- células de levedura (fase log tardia)
- etanol
- fluoreto de α -fenilmetilsulfonila (PMSF) 100 mM em etanol
- hipoclorito de sódio 20 g/L (água sanitária)
- tampão fosfato 100 mM pH 7,0 com EDTA 5 mM (tampão de lise)

Materiais

- banho de gelo
- pérolas de vidro 0,5 mm \varnothing
- pipetadores
- pipetas
- ponteiras
- suporte para tubos
- tubos de centrífuga
- tubos plásticos de 15ml

Aparelhagem

- centrífuga
- estufa
- freezer
- vórtice

Procedimento A – Fracionamento celular

OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO
--

1. Em um tubo de centrífuga com tampa colocar aproximadamente 1 g (peso úmido) de células de leveduras crescidas até a fase logarítmica tardia
2. Adicionar 4 mL de tampão de lise
3. Ressuspender as células usando um vórtice
4. Adicionar 40 μ L de PMSF (100 mM em etanol)
5. Homogeneizar em vórtice
6. Adicionar à suspensão 8 mL de pérolas de vidro lavadas e secas
- 7. Agitar ininterruptamente em vórtice durante 1 min (processo de lise)**
- 8. Resfriar em banho de gelo por 1 min**
- 9. Repetir as operações 7 e 8 por mais 4 vezes**

10. Centrifugar a suspensão de células + pérolas de vidro a 850xg por 2 min a 4°C
11. Remover cuidadosamente o sobrenadante – **evitar coletar o material precipitado** – para um tubo de centrífuga limpo e identificado como **LISADO**
12. Manter tubo LISADO em banho de gelo
13. Ressuspender o precipitado + pérolas de vidro em 4 mL de tampão de lise
14. Adicionar 40 µL de PMSF (100mM em etanol)
15. Homogeneizar em vórtice
16. Repetir as etapas 7 a 15 mais duas vezes, reunindo os sobrenadantes no mesmo tubo LISADO
17. Centrifugar o LISADO a 17.000xg por 10min a 4°C
18. Transferir o sobrenadante do LISADO clarificado para um tubo de 15mL
19. Determinar o volume aproximado do LISADO clarificado observando a graduação do tubo
20. Homogeneizar o lisado clarificado e dividir em 3 alíquotas de igual volume em tubos de 15mL
21. **Identificar os tubos com o nome do grupo.**
22. Armazenar em freezer a -20°C.

Procedimento B – Lavagem das pérolas de vidro

(Executado por monitores ou técnica)

1. Transferir as pérolas de vidro para um erlenmeyer.
2. Adicionar hipoclorito de sódio no erlenmeyer.
3. Agitar algumas vezes durante 15 min.
4. Descartar cuidadosamente o hipoclorito de sódio
5. Repetir a lavagem com hipoclorito de sódio.
6. Adicionar água no erlenmeyer
7. Lavar as pérolas.
8. Descartar cuidadosamente a água.
9. Repetir as etapas 6 a 8 por mais 5 vezes.
10. Adicionar etanol no erlenmeyer.
11. Colocar o erlenmeyer numa estufa.
12. Aguardar a secagem das pérolas.

FLUXOGRAMA

