

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 centrifuga
- tubos plásticos de 15ml

Aparelhagem

- centrífuga
- estufa
- freezer
- vórtice

Procedimento A – Fracionamento celular

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

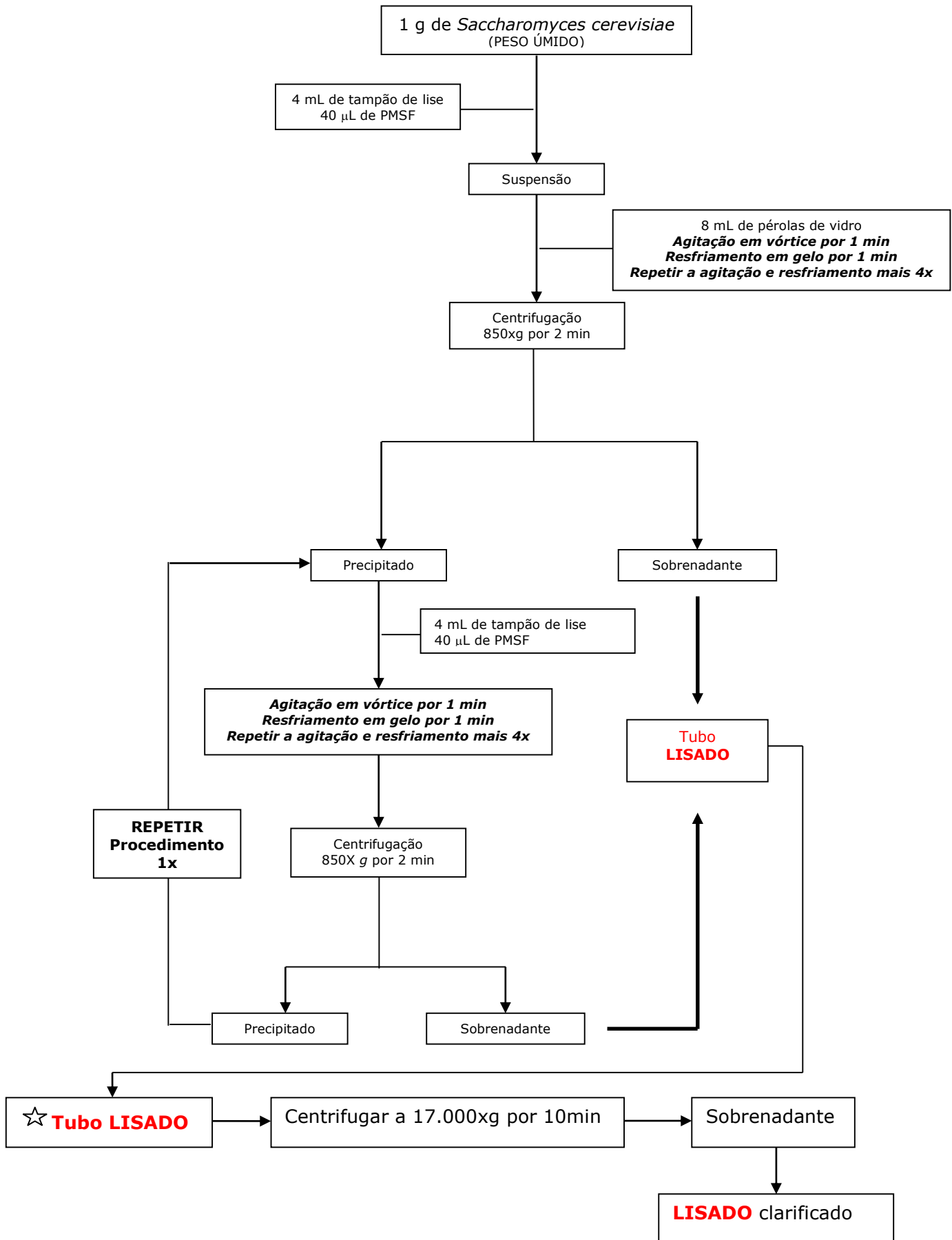
1. Em um tubo de centrífuga com tampa colocar aproximadamente 1 g (peso úmido) de células de leveduras crescidas até a fase logarítmica tardia
2. Adicionar 4 mL de tampão de lise
3. Ressuspender as células usando um vórtice
4. Adicionar 40 μ L de PMSF (100 mM em etanol)
5. Homogeneizar em vórtice
6. 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 μ L 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



B) Dosagem de açúcares redutores

Objetivos

Dosar colorimetricamente açúcares redutores solúveis no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

-água destilada
-glicose 5 mM
-lisado de leveduras
-ácido 3,5-dinitrosalicílico
(DNS) 10 g/L

Materiais

-tubos de ensaio grandes
-pipetadores
-pipetas
-ponteiros
-suportes para tubos de ensaio
-placa de 96 poços

Aparelhagem

-espectrofotômetro
-vórtice
-banho-maria

Procedimento A - Curva padrão de glicose

1. em cada tubo, adicionar as quantidades estipuladas de água e de glicose, conforme a tabela 1
2. adicionar a quantidade necessária de reagente de DNS
3. Tampar o tubo de ensaio com plástico filme e homogeneizar cuidadosamente por inversão
4. Remover o plástico filme e colocar os tubos em banho-maria fervente por 10 min
5. esfriá-los em uma bandeja com água
6. adicionar 8 mL de água destilada, completando o volume para 10 mL totais
7. Homogeneizar o tubo novamente (usando plástico filme)
8. transferir 200µL de cada solução para pocinhos da placa de 96 poços
9. ler as absorbâncias a 540 nm, descontando o valor do branco

Solução padrão de glicose = 5 mM = 5 mmol/L = 5 µmol/mL;

Massa molar glicose = 180 g/mol

Tabela 1

tubos	Solução glicose (mL)	água (mL)	DNS (mL)	massa glicose (mg)	A ₅₄₀	A ₅₄₀ - branco
branco	0,0	1,0	1,0			
1	0,1	0,9	1,0			
2	0,2	0,8	1,0			
3	0,3	0,7	1,0			
4	0,4	0,6	1,0			
5	0,5	0,5	1,0			
6	0,6	0,4	1,0			
7	0,7	0,3	1,0			
8	0,8	0,2	1,0			
9	0,9	0,1	1,0			
10	1,0	0,0	1,0			

Procedimento B – Dosagem de açúcares redutores no lisado obtido

1. Agitar o lisado suavemente por inversão
2. Diluí-lo conforme indicado abaixo

OBSERVAÇÃO: para esse procedimento é necessário que o lisado seja diluído

1. Transferir 0,4 mL do lisado para um tubo de ensaio grande identificado como **L5X**.
2. Adicionar 1,6 mL de água destilada.
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir 0,5 mL do tubo **L5X** para um tubo de ensaio grande identificado como **L10X**.
5. Adicionar 0,5 mL de água destilada
6. Homogeneizar em vórtice.

3. Preparar os tubos segundo a **Tabela 2**

4. Proceder com o mesmo protocolo da curva padrão (passos 3 a 8)

Tabela 2

tubos	amostras (mL)	água (mL)	DNS (mL)	A ₅₄₀	A ₅₄₀ - branco
L1	0,25 (L)	0,75	1,0		
L2	0,25 (L)	0,75	1,0		
L3	0,25 (L)	0,75	1,0		
L5x 1	0,25 (L5X)	0,75	1,0		
L5x 2	0,25 (L5X)	0,75	1,0		
L5X 3	0,25 (L5X)	0,75	1,0		
L10X 1	0,25 (L10X)	0,75	1,0		
L10X 2	0,25 (L10X)	0,75	1,0		
L10X 3	0,25 (L10x)	0,75	1,0		

Caso a absorbância esteja fora dos limites da curva padrão, repita a dosagem com as modificações necessárias para que o valor obtido fique dentro dos limites da curva padrão.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados

PRÁTICA 1B - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

INSTRUÇÕES:

1. Completar as tabelas com os resultados experimentais.
2. Construir a curva padrão para quantificação de glicose com o reagente DNS.
3. Calcular a concentração de açúcares redutores (mg/mL) no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA PARA CURVA PADRÃO DE GLICOSE

tubos	massa de glicose (mg)	Ab _{S540}
1		---
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Equação de reta: $y = ax + b$	
coeficiente angular = a	
Intercepto no eixo y = b	

TABELA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NO LISADO DE *S. CEREVISIAE*

tubos	A ₅₄₀	Massa de açúcar calculada usando a curva padrão (mg)	Volume da amostra (mL)	Concentração (mg/mL)	Diluição prévia (X)	Concentração de açúcar redutor no lisado original (sem diluição)
L1			0,25			
L2			0,25			
L3			0,25			
L5X 1			0,25			
L5X 2			0,25			
L5X 3			0,25			
L10X 1			0,25			
L10X 2			0,25			
L10X 3			0,25			

Apenas valores de absorbância contidos na curva padrão podem ser utilizados. Caso seu grupo tenha usado uma diluição diferente do protocolo, ajustar de acordo.