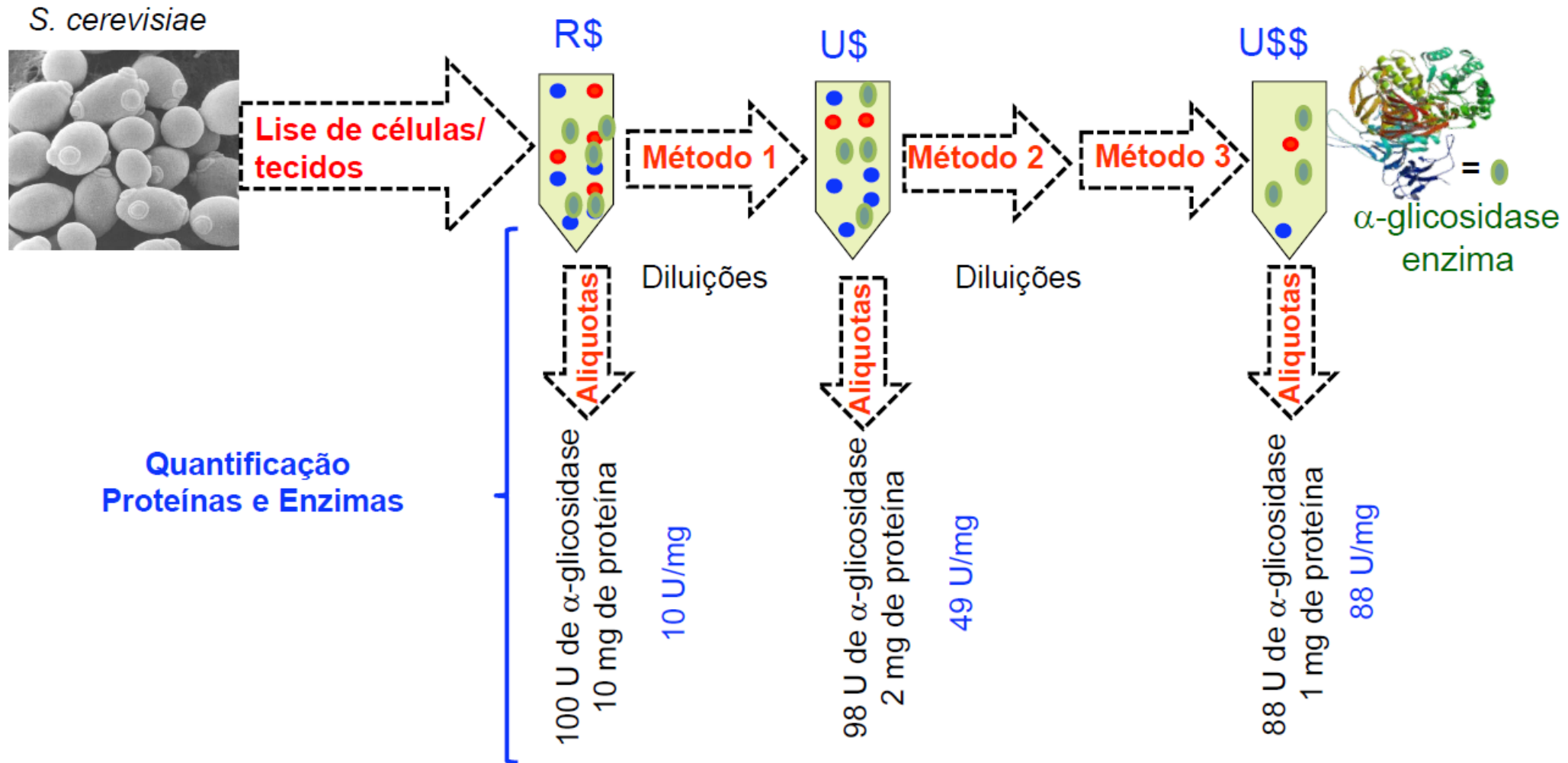


# QBQ1453 – Bioquímica Experimental

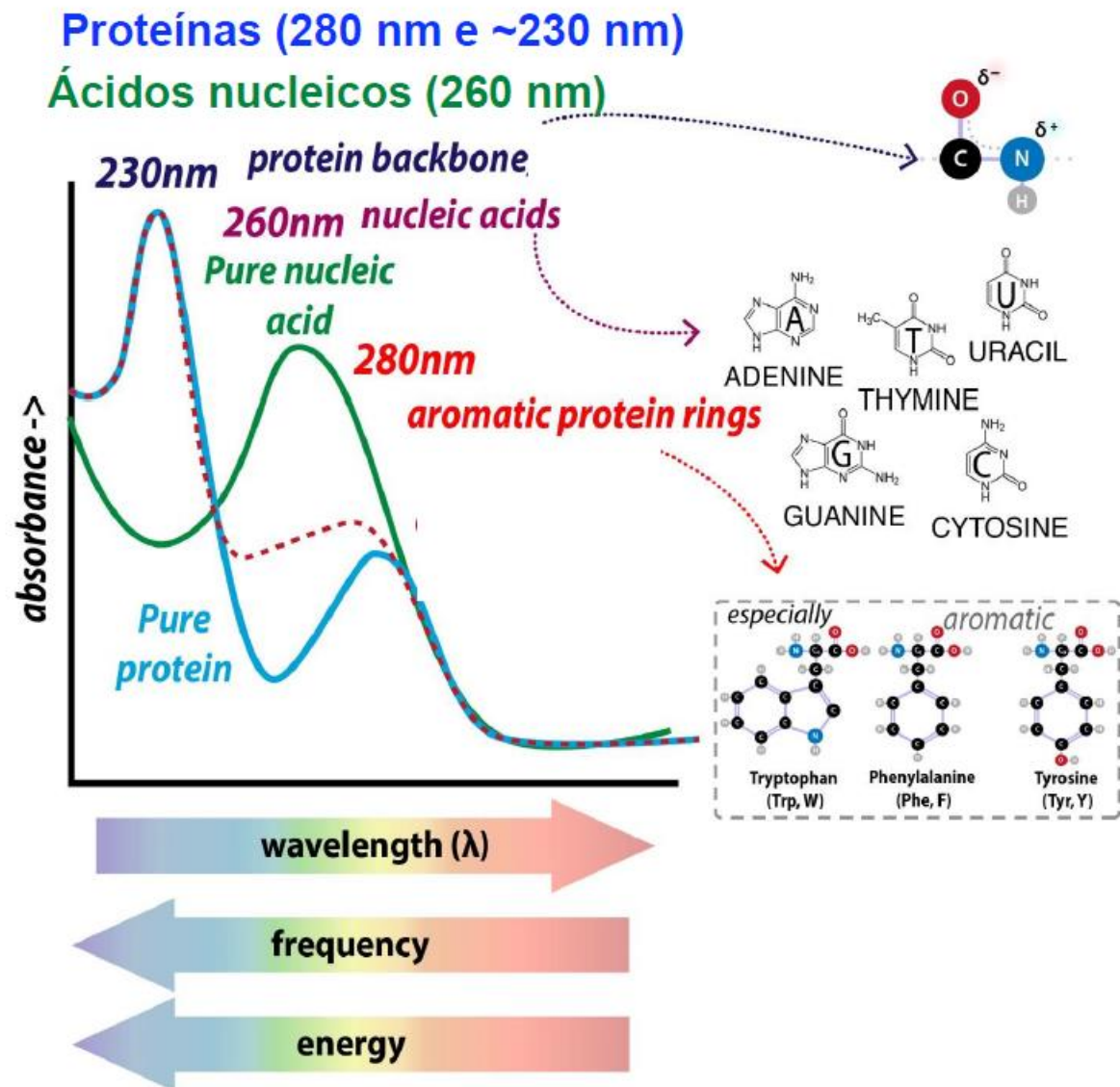
Dosagem de proteínas e de atividade enzimática

Nícolás Hoch

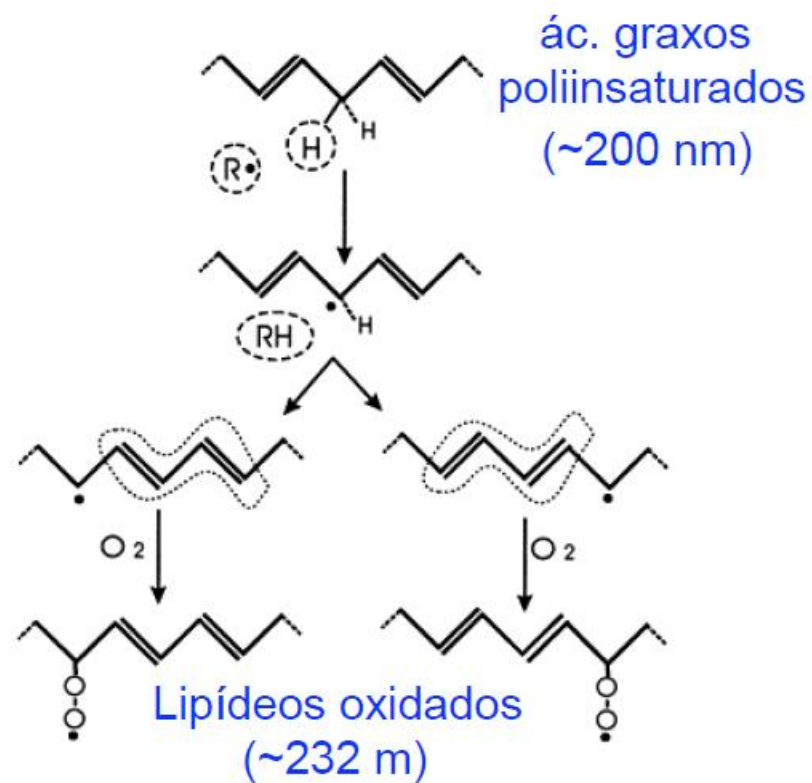
# Purificação de Proteínas



# Quantificação direta de proteínas

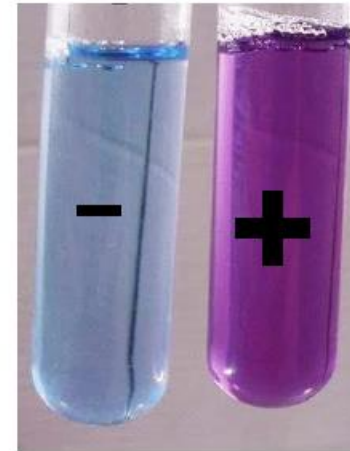
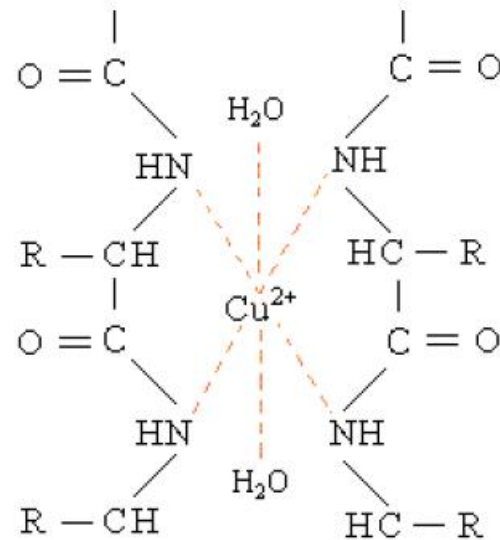


## Lipídeos e CH X



# Métodos indiretos: Reação de Biureto

Baseia-se em uma reação entre  $\text{CuSO}_4$  e os grupos amino da proteína em meio alcalino. É um método específico para proteínas. O produto desta reação (um cátion  $\text{Cu}^{2+}$  coordenado com 4 grupos amino) absorve em  $\lambda$  540nm.



**Desvantagens:** a) baixa sensibilidade (> 1 mg prot.)  
b) somente para proteínas simples

# Métodos indiretos: BCA (bicinchoninic acid)

Começa com a formação do complexo entre o cátion  $\text{Cu}^{+2}$  e a proteína,

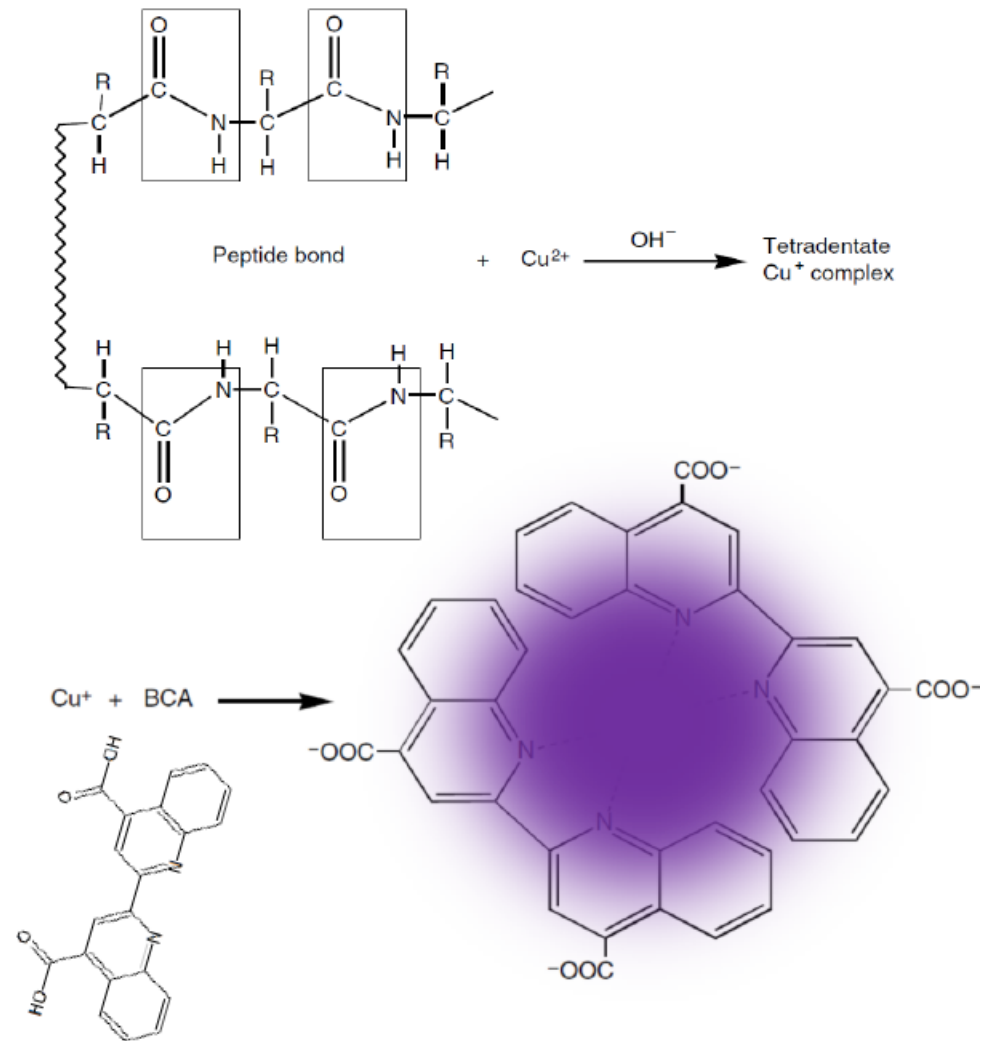
Esse complexo cuproso reage com o BCA (2 moléculas por íon cuproso) o qual pela sua vez forma uma **cor violeta** que pode ser medida a  $\lambda$  562 nm

sensibilidade **0.5  $\mu\text{g/mL}$** .

**Desvantagens:**

alguns compostos como fructose e lactose podem interferir na leitura.

A coloração não se mantém estável por muito tempo.





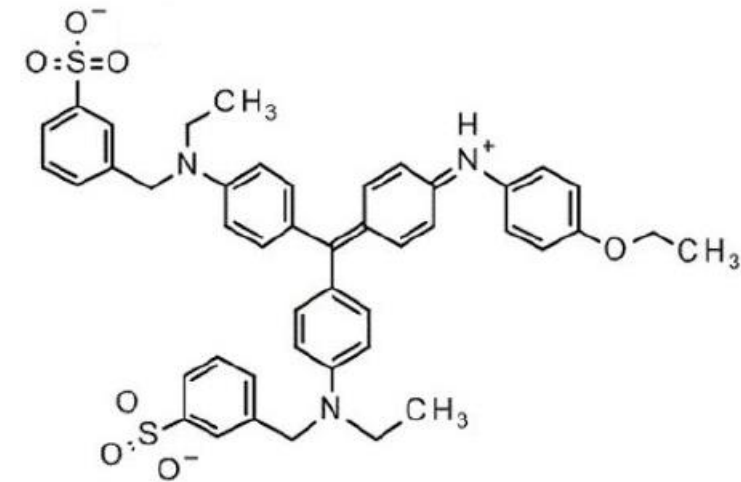
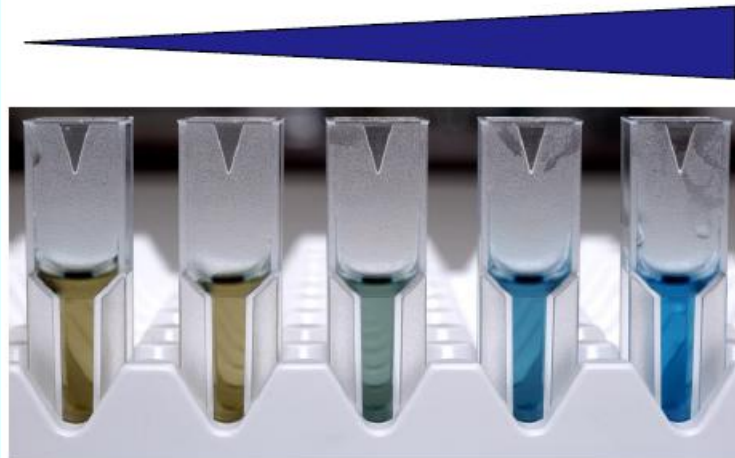
# Métodos indiretos: Bradford

Este corante forma complexos com proteínas por meio de interações iônicas com aminoácidos básicos e interações de van der Waals. A formação do complexo proteína-CBBG altera o espectro de absorção do corante, mudando o seu máximo de absorção de  $\lambda$  465 nm para 595 nm.  $< 5 \mu\text{g/mL}$ .

## Desvantagens:

a) o corante não liga igualmente em todas as proteínas.

b) lipídeos, polissacarídeos e fenóis, glicerol interferem neste método.

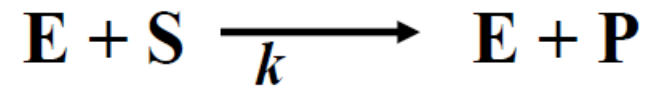


Coomassie Brilliant Blue G-250

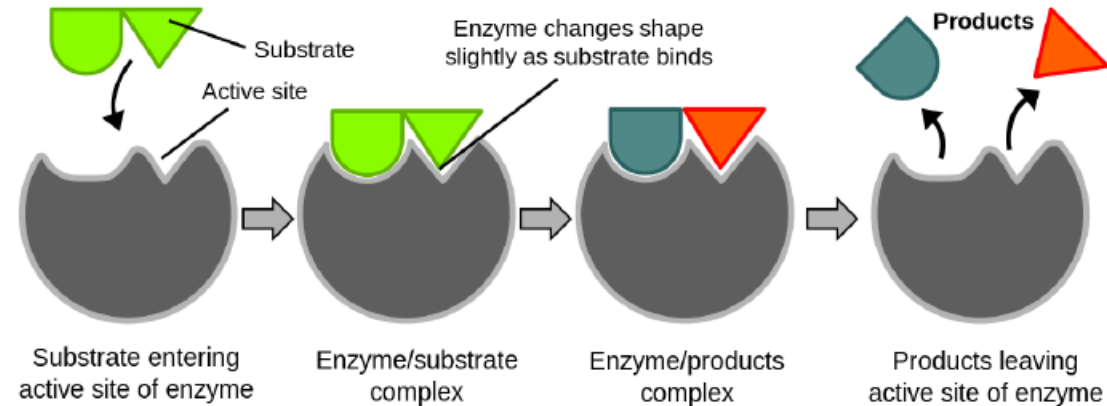
# Como identificar a nossa enzima?

**Enzimas são catalisadores biológicos.**

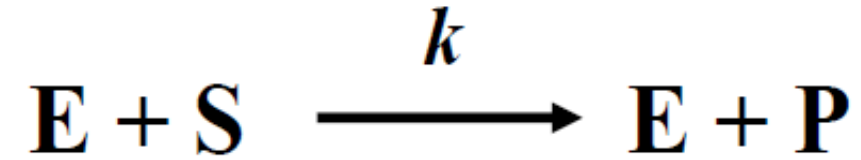
**Apresentam especificidade em relação aos produtos e reagentes**



**A presença de uma enzima específica pode ser detectada através da ocorrência da reação**  
*(formação do produto a partir de substrato específico)*



Como **quantificar** a nossa enzima?

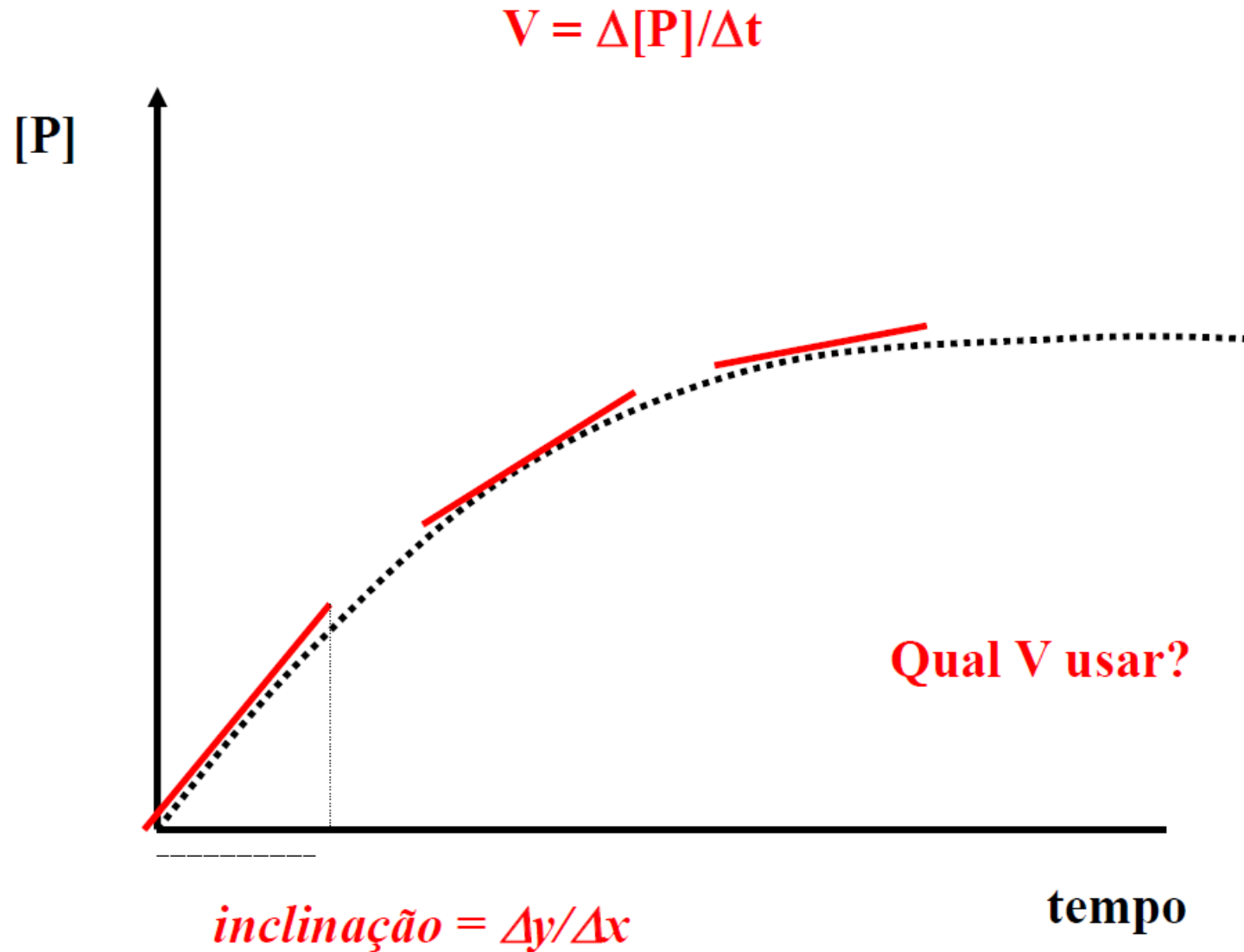


$$v = k [\mathbf{E}] [\mathbf{S}]$$

**Assim, se  $[\mathbf{S}] \sim$  constante, a velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima**



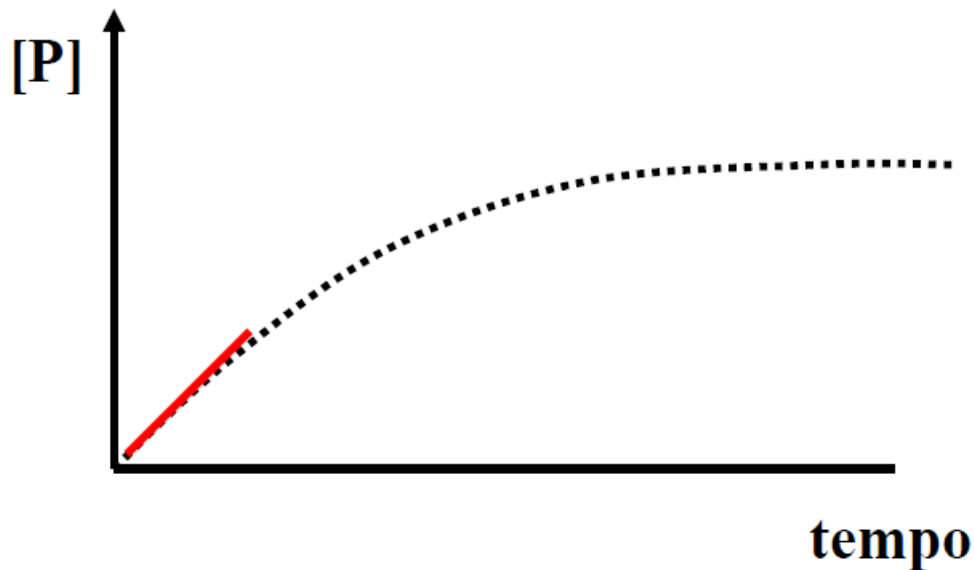
# Como determinar a velocidade da reação?



# Como determinar a velocidade da reação?

$$v = k [E] [S]$$

Assim, se  $[S] \sim \text{constante}$  (igual à inicial; muito S e pouca E saturada), a velocidade é diretamente proporcional a concentração de enzima

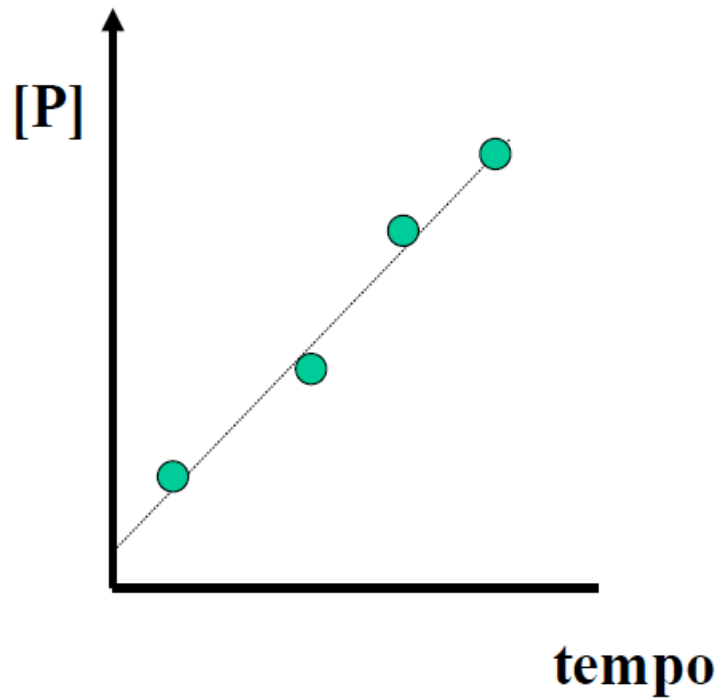


Se menos de 5% de S for consumido, podemos assumir  $v \sim \text{constante}$  ( $v_0$ )

# Como determinar a velocidade da reação?

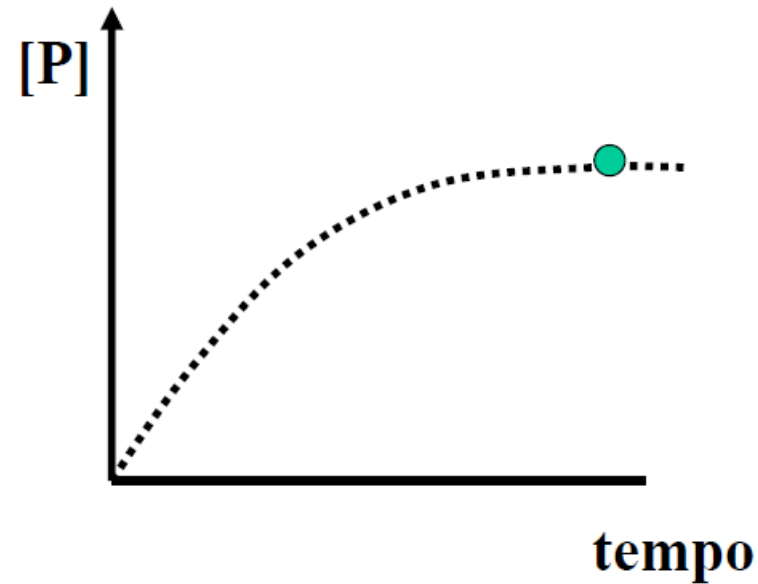
## Medida de velocidade inicial

Construir uma curva de  $[P]$  x tempo e verificar se é linear.



vários tempos

x

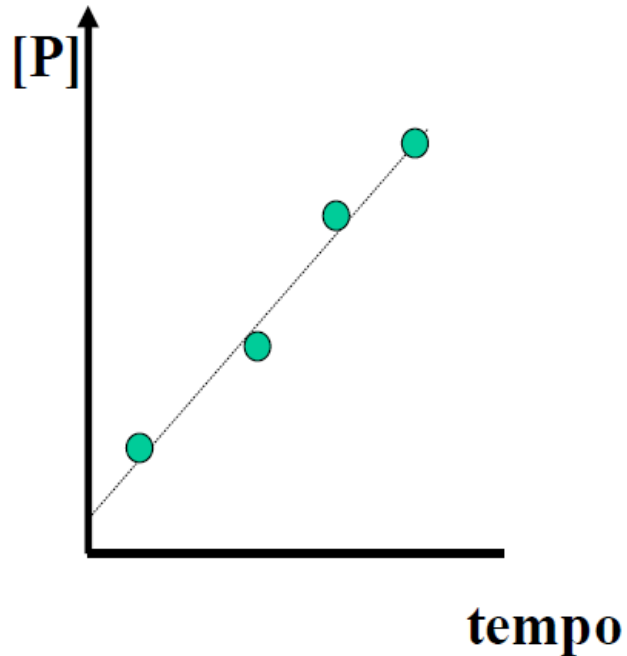


1 único tempo

# Como determinar a velocidade da reação?

$$y = mx + b$$

$m = \textit{inclinação} = \textit{velocidade média}$



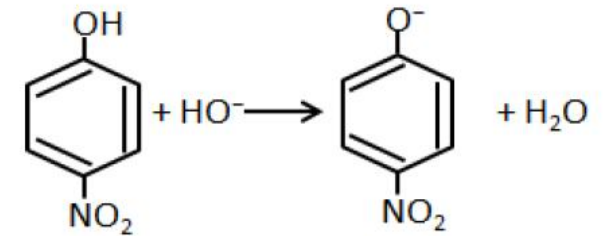
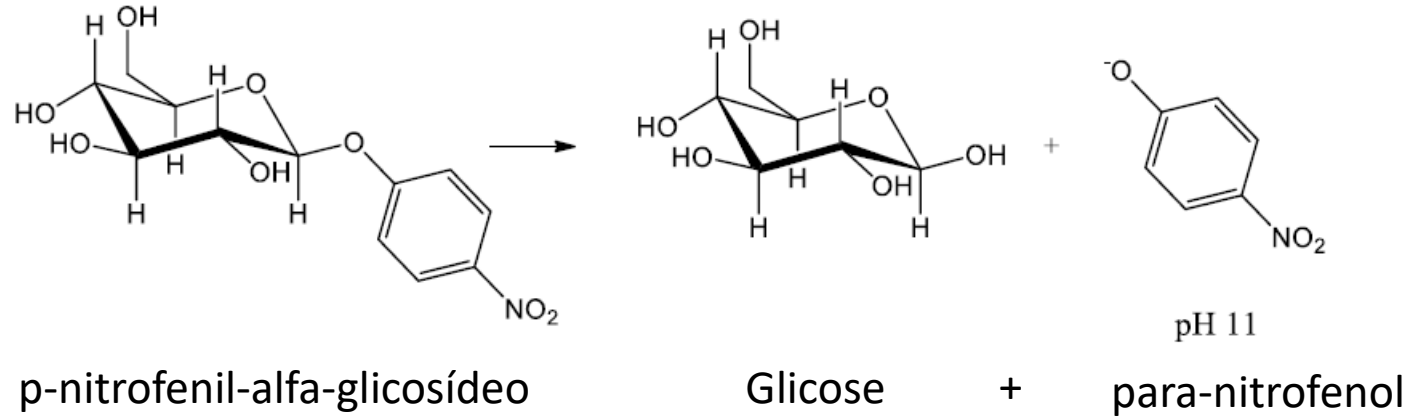
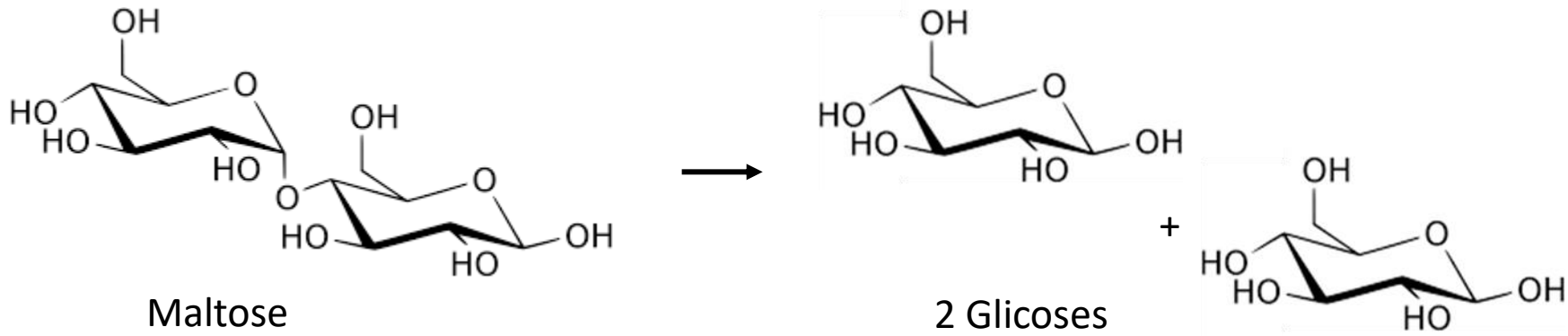
$$y = mx + b$$

$m = \textit{inclinação} = \textit{produto produzido/tempo} = \textit{Velocidade inicial} = \textbf{Unidade enzimática.}$

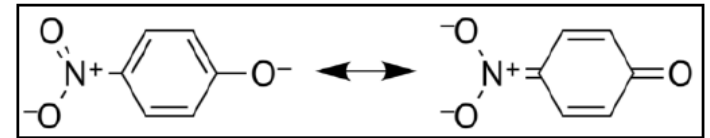
**1 U de atividade enzimática corresponde a formação de 1 micromol de produto/min**

$$\mathbf{1\ U = 1\ \mu\text{mol P} / \text{min}}$$

# Alfa-glicosidase



estabilização por ressonância



## Procedimento A – Curva-padrão de proteína

1. Adicionar em cada tubo de 1,5mL (eppendorf) os volumes de albumina e água estipulados na **Tabela 1**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Fechar os tubos e homogeneizar em vórtice
4. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente
5. Transferir 200 $\mu$ L do branco e de cada uma das amostras para os pocinhos da placa
6. Ler as absorbâncias a 595 nm.
7. Completar a **Tabela 2**.
8. Construir a curva-padrão para detecção de proteínas com reagente de Bradford.

**Tabela 1**

tubos	albumina 0,2 g/L ( $\mu$ L)	água ( $\mu$ L)	reagente de Bradford (mL)
branco	0	100	1,0
1	10	90	1,0
2	20	80	1,0
3	30	70	1,0
4	40	60	1,0
5	50	50	1,0
6	60	40	1,0
7	70	30	1,0
8	80	20	1,0

**Tabela 2**

tubos	massa de proteína ( $\mu$ g)	A <sub>595</sub>
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		



## Procedimento B – Dosagem de proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

**OBSERVAÇÃO:** para esse procedimento é necessário que o lisado seja diluído. Para isso segue o procedimento para diluição.

### Diluição 100X:

1. Transferir 0,1 mL do lisado para um tubo de ensaio grande identificado como **L100X**.
2. Adicionar 9,9 mL de água destilada.
3. Homogeneizar em vórtice.

1. Adicionar em cada tubo de 1,5 mL (eppendorf) os volumes de água e amostras do lisado (**devidamente diluído**) estipulados na **Tabela 3**.
2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Fechar os tubos e homogeneizar em vórtice
4. Aguardar 5 minutos com os tubos em temperatura ambiente
5. Transferir 200 $\mu$ L do branco e de cada uma das amostras (em triplicata) para a placa
6. Ler as absorbâncias a 595 nm.
7. Completar a **Tabela 4**.

**OBSERVAÇÃO:** Caso a absorbância das amostras experimentais esteja fora dos limites das absorbâncias obtidas na curva-padrão. Discuta com o professor ou monitor um novo valor de diluição.

**Tabela 3**

tubos	L100X ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	reagente de Bradford (mL)
branco	-	100	1,0
A1	100	-	1,0
A2	50	50	1,0
A3	30	70	1,0
A4	20	80	1,0

**Tabela 4**

tubos	A <sub>595</sub> 1	A <sub>595</sub> 2	A <sub>595</sub> 3	A <sub>595</sub> Média	A <sub>595</sub> - Branco
A1					
A2					
A3					
A4					

## Procedimento A – Curva padrão de para-nitrofenolato (já feito pelas técnicas)

1. Adicionar em cada tubo de ensaio os volumes de para-nitrofenol e água estipulados na **Tabela 5**.
2. Adicionar o tampão bicarbonato, pH 11,0
3. Homogeneizar em vórtice.
4. Transferir 200 $\mu$ L do branco e de cada uma das amostras para a placa de 96 poços
5. Ler as absorbâncias a 420 nm.
6. Completar a **Tabela 6**.

**Tabela 5**

tubos	p-nitrofenol 1 mM ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Tampão Bicarbonato (ml)
Branco	0	200	2
1	5	195	2
2	10	190	2
3	20	180	2
4	30	170	2
5	50	150	2
6	75	125	2
7	100	100	2
8	125	75	2
9	150	50	2
10	175	25	2
11	200	0	2

**Tabela 6**

tubos	p-nitrofenolato (nmol) <i>(calcular)</i>	A <sub>420</sub> (já descontado o branco)
1		0,06
2		0,09
3		0,13
4		0,21
5		0,3
6		0,48
7		0,63
8		0,75
9		0,91
10		1,09
11		1,24

## Procedimento B – Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

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

**Abaixo segue o procedimento *sugerido* para a diluição da preparação do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.**

1. Transferir 0,2 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado como **L10X**.
2. Adicionar 1,8 mL de água destilada gelada.
3. Homogeneizar suavemente  
(Esse tubo L10X só será utilizado para obter as diluições – não usar para determinação da atividade enzimática)
4. Transferir 0,4 mL de L10X para um novo tubo identificado como **L50X**.
5. Adicionar 1,6 mL de água destilada gelada.
6. Homogeneizar suavemente
7. Transferir 0,5 mL de L50X para um novo tubo identificado como **L200X**.
8. Adicionar 1,5 mL de água destilada gelada.
9. Transferir 0,4 mL de L200X para um novo tubo identificado como **L1000X**.
10. Adicionar 1,6 mL de água destilada gelada.
11. Homogeneizar suavemente
12. Manter todos os tubos no gelo

## Procedimento C - Determinação da atividade da $\alpha$ -glicosidase

### **OBSERVAÇÃO: MANTER TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO**

Este procedimento deve ser feito para cada uma das diferentes diluições do lisado que foram preparadas. Todos estes ensaios podem ser montados simultaneamente, iniciando o procedimento sempre pela adição do substrato. Somente quando todos os tubos já tiverem recebido o substrato deverá ser iniciada a adição das diferentes diluições de lisado.

- 1. Preparar os tubos em banho de gelo.**
- Adicionar em cada tubo os volumes de NP $\alpha$ Glc estipulados na **Tabela 7 e 8**.
- Adicionar em cada tubo o lisado devidamente diluído.
- Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.
- Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 7**.
- Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
- Agitar manualmente
- 8. Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
- Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, transferir 200 $\mu$ L de cada branco e de cada amostra para pocinhos da placa de 96 poços.
- Incluir um poço adicional com apenas 200 $\mu$ L de água para zerar o espectrofotômetro (marcar esse poço como "branco" no leitor de placas).
- Ler a absorbância a 420nm
- Completar a **Tabela 9**.

**Tabela 7**

tubos	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	Água (mL)	lisado diluído (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
1	0,2	---	0,2	5
2	0,2	---	0,2	10
3	0,2	---	0,2	15
4	0,2	---	0,2	20
Branco de Enzima	---	0,2	0,2	20

**Tabela 8**

**Basta preparar este tubo apenas uma única vez, mesmo quando se trabalha com diferentes diluições do lisado**

tubo	NP $\alpha$ Glc 4 mM (mL)	Água (mL)	lisado diluído (mL)	Tempo de incubação a 30°C (min)
Branco de Substrato	0,2	0,2	---	20

**Tabela 9**

tubos	L50x A <sub>420</sub>	L200X A <sub>420</sub>	L1000x A <sub>420</sub>
1			
2			
3			
4			
Branco de Enzima			
Branco de Substrato			

Os brancos de enzima e de substrato devem ser somados para chegar a um valor de "branco total" a ser subtraído das amostras.



# Tratamento de Dados e Análise dos Resultados

## PRÁTICA DE DOSAGEM DE PROTEÍNAS

## PRÁTICA DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO LISADO

### INSTRUÇÕES:

1. Completar as tabelas com os resultados experimentais das duas práticas.
2. Construir a curva padrão que relaciona a quantidade de proteína (albumina) em micrograma ( $\mu\text{g}/\text{tubo}$ ) com a Absorbância a 595 nm após reação com o reagente de Bradford.
3. Construir a curva-padrão que relaciona a quantidade de p-nitrofenolato (nmoles/tubo) com a Absorbância a 420 nm, utilizando os valores da tabela 6.
4. Calcular a concentração de proteínas (mg/mL) no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Construir o gráfico do ensaio de atividade da  $\alpha$ -glicosidase (nmols de produto  $\times$  tempo) para cada diluição de lisado utilizada
6. Calcular a Concentração de Atividade Enzimática (U/mL) e a Atividade específica (U/mg) do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

1U = quantidade de enzima suficiente para converter 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto



tubos	massa de proteína (µg)	Abs <sub>595</sub>
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

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

**TABELA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO LISADO DO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

tubos	A <sub>595</sub>	Massa de proteína calculada utilizando a curva-padrão (mg)	Volume da amostra (mL)	Concentração (mg/mL)	Diluição prévia (x)	concentração do lisado original (sem diluição) (mg/mL)
A1			0,10			
A2			0,05			
A3			0,03			
A4			0,02			

**TABELA PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

tubos	Tempo (min)	L50x		L200x		L1000x	
		A <sub>420</sub>	produto (nmol)	A <sub>420</sub>	produto (nmol)	A <sub>420</sub>	produto (nmol)
1	5						
2	10						
3	15						
4	20						