

Prática 2

Dosagem das Proteínas presentes no lisado

Objetivos

Dosar colorimetricamente proteínas no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes

água destilada
albumina 1,0 g/L
lisado de leveduras
reagente de Bradford
 ácido fosfórico 85%
 Coomassie Blue G[®]
 metanol

Materiais

tubos de 1,5mL
suportes para tubos
pipetadores
pipetas
ponteiras
placa de 96 poços
tubo de ensaio de vidro

Aparelhagem

espectrofotômetro
vórtice

Procedimento A – Curva-padrão de proteína

OBSERVAÇÃO: para esse procedimento é necessário que a albumina seja diluída. Para isso segue o procedimento para diluição.

Diluição 100X:

1. Transferir 10 µL da albumina para um tubo de 1,5 mL identificado como **A100X**.
2. Adicionar 0,99 mL de água destilada.
3. Homogeneizar em vórtice.

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 200µL 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	A100X (µL)	água (µL)	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	80	20	1,0
8	100	0	1,0

Tabela 2

tubos	massa de proteína (µg)	A ₅₉₅
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 (ependorf) 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 μ 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 (μ L)	H ₂ O (μ 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 ₅₉₅ 1	A ₅₉₅ 2	A ₅₉₅ 3	A ₅₉₅ Média	A ₅₉₅ - Branco
A1					
A2					
A3					
A4					

Determinação da Atividade Enzimática do lisado

Objetivo

Determinar a atividade da α -glicosidase no lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

Reagentes

água destilada
lisado de leveduras
p-nitrofenil- α -glicosídeo (NP α Glc) 4 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0
tampão carbonato-bicarbonato 250 mM
pH 11,0
para-nitrofenol 2 mM

Materiais

banho de gelo
tubos de ensaio
pipetadores
pipetas
ponteiras
suportes para tubos de ensaio
placa de 96 poços

Aparelhagens

banho a 30°C
espectrofotômetro
vórtice

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 μ 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 2 mM (μ L)	H ₂ O (μ 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) (calcular)	A ₄₂₀ (já descontado o branco)
1		0,052
2		0,091
3		0,167
4		0,253
5		0,397
6		0,568
7		0,737
8		0,917
9		1,109
10		1,287
11		1,493

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

Tabela 7

tubos	NP α 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 α 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

	L50x	L200X	L1000x
tubos	A ₄₂₀	A ₄₂₀	A ₄₂₀
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 (μg /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 α -glicosidase (nmols de produto x 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 μmol de substrato por minuto

tubos	massa de proteína (μg)	Abs ₅₉₅
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 ₅₉₅	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 ₄₂₀	produto (nmol)	A ₄₂₀	produto (nmol)	A ₄₂₀	produto (nmol)
1	5						
2	10						
3	15						
4	20						