

Prática 3

Precipitação com sulfato de amônio

Objetivos

Purificar parcialmente a α -glicosidase por *salting out*

Reagentes

- água destilada
- lisado de levedura
- sulfato de amônio 4.1M (pH 7,0)
- tampão fosfato 200mM (pH 7,0)
- reagente de Bradford
- NP α Glc 4mM
- tampão carbonato-bicarbonato (pH 11,0)
- tampão fosfato 10mM sem NaCl

Materiais

- tubos de centrífuga
- pipetadores
- ponteiras
- banho de gelo
- tubos de plástico de 2,0mL
- tubos de ensaio
- placa de 96 poços
- suportes para tubos

Aparelhagem

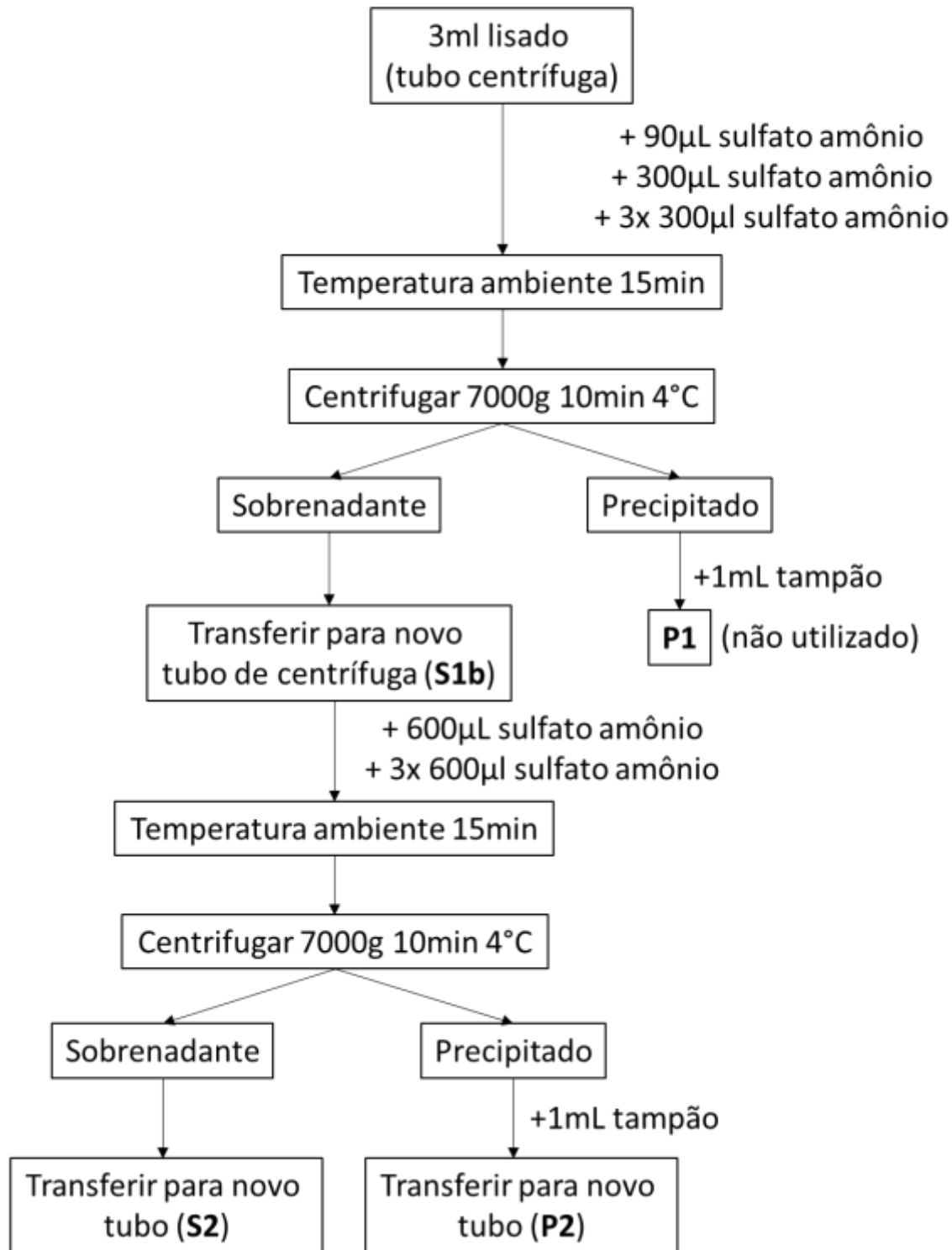
- vórtice
- centrífuga
- espectrofotômetro
- banho a 30°C

Procedimento A – Precipitação com sulfato de amônio

**ATENÇÃO! MANTENHA OS TUBOS DE ENSAIO NO GELO!
IMPORTANTE: ADICIONE A SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO LENTA E GRADUALMENTE, SEMPRE SOB AGITAÇÃO NO NÍVEL MÍNIMO DO VÓRTEX OU COM AGITAÇÃO MANUAL.**

1. Adicionar 3mL de lisado de levedura em um tubo de centrífuga
2. Adicionar lentamente 90 μ L de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo sob agitação constante
3. Adicionar lentamente 300 μ L de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo sob agitação constante
4. Repetir o passo 3 outras três vezes
- 5. No total devem ser adicionados ao tubo 1290 μ L de solução de sulfato de amônio**
6. Manter a solução em temperatura ambiente durante 15min
7. Centrifugar a 7000g por 10min a 4°C
8. Remover 200 μ L do sobrenadante para um tubo de 2,0mL identificado como **S1a** (Sobrenadante 1 - Guardar este tubo no gelo para uso posterior)
9. Transferir o restante do sobrenadante, de 500 μ L em 500 μ L, com o auxílio de uma p1000, para um novo tubo de centrífuga identificado como **S1b** (aprox. 4mL - cuidado para não ressuspender o precipitado!)
10. Ressuspender o material precipitado em 1mL de tampão fosfato e transferir para um tubo de plástico de 2,0mL identificado como **P1** (Precipitado 1) (não será mais utilizado)
11. Ao material do tubo **S1b** (o sobrenadante de 4mL), adicionar lentamente 600 μ L de solução de sulfato de amônio, mantendo o tubo sob agitação constante
12. Repetir o passo 11 mais três vezes
- 13. No total devem ser adicionados ao tubo 2400 μ L de solução de sulfato de amônio**
14. Manter a solução em temperatura ambiente durante 15min
15. Centrifugar a 7000g por 10min a 4°C
16. Transferir o sobrenadante, de 500 μ L em 500 μ L, com o auxílio de uma p1000, para um tubo de ensaio limpo e identificar como **S2** (sobrenadante 2)
17. Ressuspender o material precipitado em 1mL de tampão fosfato e transferir para um tubo de plástico de 2,0mL identificado como **P2** (Precipitado 2)

Fluxograma



Procedimento B – Diluição das amostras para análise

As diluições a seguir são **sugeridas**, mas podem variar de acordo com o lisado que seu grupo obteve. Baseie-se nas diluições utilizadas nas aulas práticas anteriores, e confirme sua decisão com o monitor ou professor antes de realizar as diluições.

Lisado 50x (p/ dosagem de proteínas)

1. Transferir 20 μ L do lisado clarificado para um tubo de 2,0mL identificado como **L 50x**
2. Adicionar 980 μ L de água destilada e homogeneizar

Lisado 800x (p/ dosagem da atividade enzimática)

1. Transferir 75 μ L do **L 50x** para um tubo de 2,0mL identificado como **L 800x**
2. Adicionar 1125 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração S1a 20x (p/ dosagem de proteínas)

1. Transferir 50 μ L de **S1a** para um tubo de 2,0mL identificado como **S1a 20x**
2. Adicionar 950 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração S1a 500x (p/ dosagem da atividade enzimática)

1. Transferir 50 μ L de **S1a 20x** para um tubo de 2,0mL identificado como **S1a 500x**
2. Adicionar 1200 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração S2 10x (p/ dosagem de proteínas)

1. Transferir 100 μ L de **S2** para um tubo de 2,0mL identificado como **S2 10x**
2. Adicionar 900 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração S2 200x (p/ dosagem da atividade enzimática)

1. Transferir 60 μ L de **S2 10x** para um tubo de 2,0mL identificado como **S2 200x**
2. Adicionar 1140 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração P2 40x (p/ dosagem de proteínas)

1. Transferir 25 μ L de **P2** para um tubo de 2,0mL identificado como **P2 40x**
2. Adicionar 975 μ L de água destilada e homogeneizar

Fração P2 2000x (p/ dosagem da atividade enzimática)

1. Transferir 25 μ L de **P2 40x** para um tubo de 2,0mL identificado como **P2 2000x**
2. Adicionar 1225 μ L de água destilada e homogeneizar

NÃO JOGAR NENHUM FRASCO FORA ANTES DE ESCOLHER A FRAÇÃO ADEQUADA PARA CONTINUAR A PURIFICAÇÃO

Procedimento C – Dosagem de proteínas

1. Adicionar em cada tubo de 2,0mL os volumes de água e amostras (devidamente diluídas) conforme a **Tabela 1**
2. Adicionar 1,0 mL do reagente de Bradford em cada tubo
3. Homogeneizar em vórtice
4. Transferir 200 μ L de cada tubo para a placa de 96 poços (em triplicata), conforme **Tabela 2**
5. Ler a absorbância a 595nm no espectrofotômetro e preencher a **Tabela 3**

Tabela 1

tubos	Lisado 50x (μ L)	S1a 20x (μ L)	S2 10x (μ L)	P2 40x (μ L)	Água (μ L)	Reagente de Bradford (mL)
Branco	-	-	-	-	100	1,0
1	30	-	-	-	70	1,0
2	60	-	-	-	40	1,0
3	-	30	-	-	70	1,0
4	-	60	-	-	40	1,0
5	-	-	30	-	70	1,0
6	-	-	60	-	40	1,0
7	-	-	-	30	70	1,0
8	-	-	-	60	40	1,0

Tabela 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tubo 1			Tubo 2			Tubo 3			Tubo 4		
B	Tubo 5			Tubo 6			Tubo 7			Tubo 8		
C	Branco											
D												
E												
F												
G												
H												

Tabela 3

tubos	Réplica 1 (A ₅₉₅)	Réplica 2 (A ₅₉₅)	Réplica 3 (A ₅₉₅)	Média
Branco				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

* Caso a absorbância das amostras esteja fora dos limites da curva padrão do seu grupo, discuta com o professor ou monitor uma possível solução

Procedimento D - Determinação da Atividade Enzimática

1. Preparar os tubos em banho de gelo.

- Adicionar em cada tubo os volumes de NP α Glc ou água estipulados nas **Tabelas 4 e 5**.
- Adicionar em cada tubo as amostras devidamente diluídas
- Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.
- Incubar os tubos pelos intervalos de tempos indicados nas **Tabelas 4 e 5**.
- Ao remover cada tubo, interromper a reação enzimática adicionando 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.
- Agitar manualmente
- Deixar os tubos em temperatura ambiente.**
- 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 (em triplicata), conforme **Tabela 6**
- Incluir um poço adicional com apenas 200 μ L de água para zerar o espectrofotômetro (marcar esse poço como "branco" no leitor de placas).
- Ler a absorbância a 420nm
- Completar a **Tabela 7**.

Tabela 4

tubos	NP α Glc 4 mM (mL)	Água (mL)	Amostras (L 800x, S1a 500x, S2 200x ou P2 2000x) (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 5
Basta preparar este tubo apenas uma única vez

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 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C							ZERO			Branco Substr.		
D	L 800x - 1			S1a 500x - 1			S2 200x - 1			P2 2000x - 1		
E	L 800x - 2			S1a 500x - 2			S2 200x - 2			P2 2000x - 2		
F	L 800x - 3			S1a 500x - 3			S2 200x - 3			P2 2000x - 3		
G	L 800x - 4			S1a 500x - 4			S2 200x - 4			P2 2000x - 4		
H	L 800x - Branco			S1a 500x - Branco			S2 200x - Branco			P2 2000x - Branco		

Tabela 7

tubos	L 800 x (A ₄₂₀)	S1a 500x (A ₄₂₀)	S2 200x (A ₄₂₀)	P2 2000x (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.

*Refleta sobre a adequação do ensaio para cada fração não só quanto à absorbância das amostras, mas também sobre a reação estar em velocidade inicial ou não. Discuta com o professor ou monitor sobre a necessidade de ajustes no ensaio.

NÃO JOGAR NENHUM FRASCO FORA ANTES DE ESCOLHER A FRAÇÃO ADEQUADA PARA CONTINUAR A PURIFICAÇÃO

Procedimento E – Diálise da amostra purificada

1. Escolher a fração com maior atividade enzimática (discutir com monitor/professor)
2. Transferir toda a fração de interesse para um tubo de 2,0mL (caso já não esteja)
3. Adicionar **80 μ L de PMSF** e identificar o tubo com o número do grupo
(deste ponto em diante, será realizado pelas técnicas)
4. Cobrir o tubo com um pedaço de membrana de diálise
5. Prender a membrana de diálise com um anel de borracha
6. Transferir o microtubo para um suporte de isopor
7. Colocar o tubo dentro de um béquer contendo tampão fosfato 10mM pH 7.0
8. Manter em agitação constante por 16h.

Tratamento de Dados e Análise dos Resultados

INSTRUÇÕES:

1. Determinar a concentração de proteínas (em mg/mL) em cada uma das frações, utilizando os dados obtidos na Tabela 3 e a curva padrão construída na aula anterior.
2. Construir o gráfico dos ensaios de atividade enzimática utilizando os dados da Tabela 7 e a curva padrão construída na aula anterior.
3. Calcular a quantidade total (em mU) e a concentração (em mU/mL) de atividade enzimática em cada fração.
4. Calcular a atividade específica (em mU/mg) de cada uma das frações.
5. Calcular a recuperação e o enriquecimento da enzima α -glicosidase após a precipitação com sulfato de amônio, comparando a fração escolhida com o lisado original.