

Prática 4

Purificação de proteínas – cromatografia de troca iônica

Objetivos

Melhorar a purificação da alfa-glicosidase utilizando resina de troca iônica.

Reagentes

Água destilada
Fração P2 dialisada
Resina DEAE-Sephadex
Tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 sem NaCl
Tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e NaCl 1M
Reagente de Bradford
Solução de PNP α Glc 2 mM
Tampão
Carbonato/Bicarbonato 100 mM pH 11,0

Materiais

Lã de vidro
Seringa de 20 ml
Mangueira
Presilha
Placa com 96 poços para ler absorbância no visível
Ponteiras
Tubos de 2,0 ml
Tubos de vidro

Aparelhagem

Banho térmico a 30 °C
Leitor de placas
Vortex
Pipetadores

Banho de gelo

Procedimento A – Hidratação da DEAE-Sephadex

(Executado pelas técnicas)

1. Pesar 0,5 g de DEAE-Sephadex em um béquer.
2. Adicionar 100 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0.
3. Misturar bem utilizando um bastão de vidro.
4. Decantar de um dia para o outro.

Procedimento B – Montagem da coluna de troca iônica

(Executado pelas técnicas)

Montagem da coluna

1. Utilizar o barril de uma seringa (~ 5 mL) como suporte da resina.
2. Prender a seringa em um suporte.
3. Colocar um pouco de lã de vidro em seu interior.
4. Compactar a lã de vidro na base utilizando um bastão de vidro.
5. Lavar com água destilada para retirar fragmentos de lã de vidro.
6. Adaptar uma mangueira de aproximadamente 6 cm na saída da seringa.
7. Fechar a mangueira com uma presilha.

Empacotamento da resina

8. Fechar a presilha.
9. Homogeneizar com um bastão de vidro a suspensão contendo a resina (*Procedimento A*).
10. Adicionar a suspensão até a marca de 1,0 mL.
11. Deixar decantar.
12. Repetir essa operação até a resina sedimentada ocupar o interior da seringa até 3,0 mL
13. Com a resina empacotada, lavá-la com 20 mL de tampão fosfato 10 mM **sem NaCl**.
14. Após a lavagem, fechar a presilha.
15. Deixar 3 mm de tampão acima do topo da resina. **NUNCA DEIXAR A RESINA SECAR.**

Procedimento C – Cromatografia de troca iônica

(Daqui para frente o procedimento deve ser executado pelos alunos)

1. Descongelar a fração P2 previamente dialisada contra tampão fosfato 10 mM pH 7,0.
2. Manter a fração descongelada sempre no gelo.
3. Homogeneizar e retirar uma alíquota de 100 μ l, diluir **10x** adicionando 900 μ l de tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Homogeneizar e manter a fração **P2 10x** no gelo.
4. Abrir a presilha, e deixar escoar todo o líquido com cuidado para não deixá-la secar. O eluato pode ser descartado. Deixe aproximadamente 3mm de tampão acima do nível da resina.
5. Fechar a presilha novamente.
6. Aplicar 1ml de **P2 10x** com cuidado para não ressuspender a resina.
7. Colocar um tubo de 2ml tipo "eppendorf" na saída da seringa.
8. Abrir a presilha, e coletar o eluato.
9. Deixe escoar toda a amostra até aproximadamente 3 mm acima do topo da resina.
10. Fechar a presilha. Transferir o tubo eppendorf 1 para o gelo.
11. Os tubos "eppendorf" com o eluato devem ser mantidos sempre no gelo.

Eluição das proteínas não retidas pela coluna

12. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **sem NaCl** (2 mL).
13. Colocar o tubo "eppendorf" 2 na saída da coluna e abrir a presilha permitindo que o tampão flua pela resina.
14. Coletar 1 mL em cada tubo "eppendorf", e depois mantê-los no gelo.
15. Trocar o tubo "eppendorf" e sempre adicionar mais 1 mL de tampão.
16. Após coletar o tubo 8, adicionar **cuidadosamente** mais 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
17. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
18. Ao final da coleta do tubo 10, o tampão deverá estar cerca de 3mm acima do topo da resina. Fechar a presilha.

Eluição das proteínas retidas pela coluna

19. Adicionar cuidadosamente tampão fosfato **com 400 mM de NaCl** (2,0 mL).
20. Abrir a presilha e permitir que o tampão flua pela resina.
21. Coletar 1,0 mL (mililitro) em cada tubo de 2ml tipo "eppendorf".
22. Trocar o tubo e sempre adicionar mais 1 mL de tampão.
23. Ao final da coleta do tubo 18, adicionar mais 1,0 mL de tampão. Assim, acima da resina deverá haver 2,0 mL de tampão.
24. Coletar mais dois tubos, **sem adicionar tampão**.
25. Fechar a presilha ao final da coleta do tubo 20. Não deixar a coluna secar.

Procedimento D – Identificação das frações que contêm a α -glicosidase

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Preparar um conjunto de tubos de ensaio numerados de 1 a 20. Adicionar em cada tubo 0,2 mL de substrato NP α Glc 4 mM. **Transferir os tubos para o banho de gelo.**
2. Adicionar em cada um destes tubos 0,2 mL das frações coletadas durante a cromatografia.
3. Numerá-los com uma caneta permanente para que você se lembre qual foi a ordem de aplicação das amostras.
4. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo para um banho de 30°C.
5. Incuba-los a 30°C por 10 min.
6. Ao removê-los, adicionar em cada um 2 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 11,0.

7. Agitar manualmente.
8. **Deixar os tubos à temperatura ambiente.**
9. Usar água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
10. Transferir uma alíquota de 0,2 ml de cada tubo para uma placa de 96 poços.
11. Ler as absorvâncias a 420 nm
12. Completar a **Tabela 1**.
13. Construir um gráfico Absorvância *versus* números dos tubos (volume).
14. Uma vez identificados os tubos que contém atividade enzimática, reunir as frações (eluídas na cromatografia) correspondentes em um único tubo "Falcon" identificado como **Fração DEAE – Nome do grupo**.
15. **Atenção: não jogue fora a fração DEAE, ela será usada na aula subsequente!**

Tabela 1

tubos	A ₄₂₀	tubos	A ₄₂₀
1		11	
2		12	
3		13	
4		14	
5		15	
6		16	
7		17	
8		18	
9		19	
10		20	

Procedimento E – Diluição das amostras para a medida da atividade ou da concentração de proteínas

Para o ensaio de Bradford:

Fração P2 100x (para ensaio de Bradford)

1. Transferir 10 µl da fração P2 para um tubo de 2ml (tipo "eppendorf") e adicionar 990 µl de água destilada.

Fração DEAE (para ensaio de Bradford) – Não é necessário diluir

Para medir a atividade da alfa-glicosidase:

Fração P2 1000x (para medida de atividade)

1. Transferir 200 µl da fração P2 100x para um tubo de 2ml (tipo "eppendorf") e adicionar 1800 µl de água destilada.

Fração DEAE 10x (para medida de atividade)

1. Transferir 200 µl da fração DEAE para um tubo de 2ml ("tipo eppendorf") e adicionar 1800 µl de água destilada.

Procedimento F – Determinação de atividade enzimática na fração P2 e na fração DEAE

(Manter os tubos de ensaio em banho de gelo)

Todos os tubos deste ensaio 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 do P2 ou da fração DEAE previamente diluídos.

1. Preparar os tubos de ensaio em banho de gelo.

2. Adicionar em cada tubo 0,2 ml de NP α Glc conforme estipulado na **Tabela 2**.
3. Adicionar em cada tubo 0,2 ml da fração P2 ou DEAE devidamente diluídas (**Tabela 2**).
4. Transferir **todos os tubos ao mesmo tempo** para o banho a 30°C.
5. Incuba-los pelos intervalos de tempos indicados na **Tabela 2**.
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. Usar a água para calibrar (*zerar*) o espectrofotômetro.
10. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, transferir alíquotas de 0,2 ml para uma placa de 96 poços. Adicionar água em um dos pocinhos e usar como branco (marcar como branco no leitor de placas).
11. Ler as absorbâncias a 420 nm.
12. Completar a **Tabela 3**.
13. Com os dados obtidos, e a curva padrão de p-nitrofenolato obtida nas aulas anteriores, determine a concentração de atividade enzimática de α -glicosidase (U/mL) presente na fração P2 e na fração DEAE. Não se esqueça de levar em conta as diluições.

Tabela 2

tubos	NP α Glc 4 mM (mL)	Amostras (P2 1000x ou DEAE 10x) (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 da Enzima	---	0,2	20

Tabela 3

tubos	A ₄₂₀ (P2 1000x)	A ₄₂₀ (DEAE 10x)
1		
2		
3		
4		
Branco da Enzima		

Procedimento G – Dosagem de proteínas

1. Adicionar em um tubo de 2ml do tipo "ependorf" os volumes de água, fração P2 100x ou fração DEAE estipulados na **Tabela 4**.

2. Adicionar o reagente de Bradford.
3. Homogeneizar em vórtice
4. Aguardar 5 minutos
5. Transferir 0,2 ml de cada amostra para uma placa de 96 poços. Adicionar água em um dos pocinhos para *zerar* o espectrofotômetro.
6. Ler as absorbâncias a 595 nm.
7. Completar a **Tabela 5**.
8. Calcule o valor médio da concentração de proteínas na fração P2 e na fração DEAE originais, isto é, levando em conta as diluições. Para isso utilize a curva padrão de albumina obtida nas aulas anteriores.

Tabela 4

tubos	P2 100x ou DEAE (mL)	água (mL)	reagente de Bradford (mL)
branco	-	0,1	1,0
1	0,1	-	1,0
2	0,1	-	1,0
3	0,1	-	1,0

Tabela 5

tubos	A ₅₉₅
1 (P2 100x)	
2 (P2 100x)	
3 (P2 100x)	
Branco	
1 (DEAE)	
2 (DEAE)	
3 (DEAE)	
Branco	

Análise dos Resultados

1. Calcular a concentração de atividade (em mU/ml) e a atividade total (em U) de cada uma das frações.
2. Calcular a concentração de proteínas (mg/ml) em cada uma das frações.
3. Calcular a recuperação e o enriquecimento da alfa-glicosidase após a cromatografia de troca iônica. Comparar com o resultado obtido na aula anterior após a precipitação com sulfato de amônio.