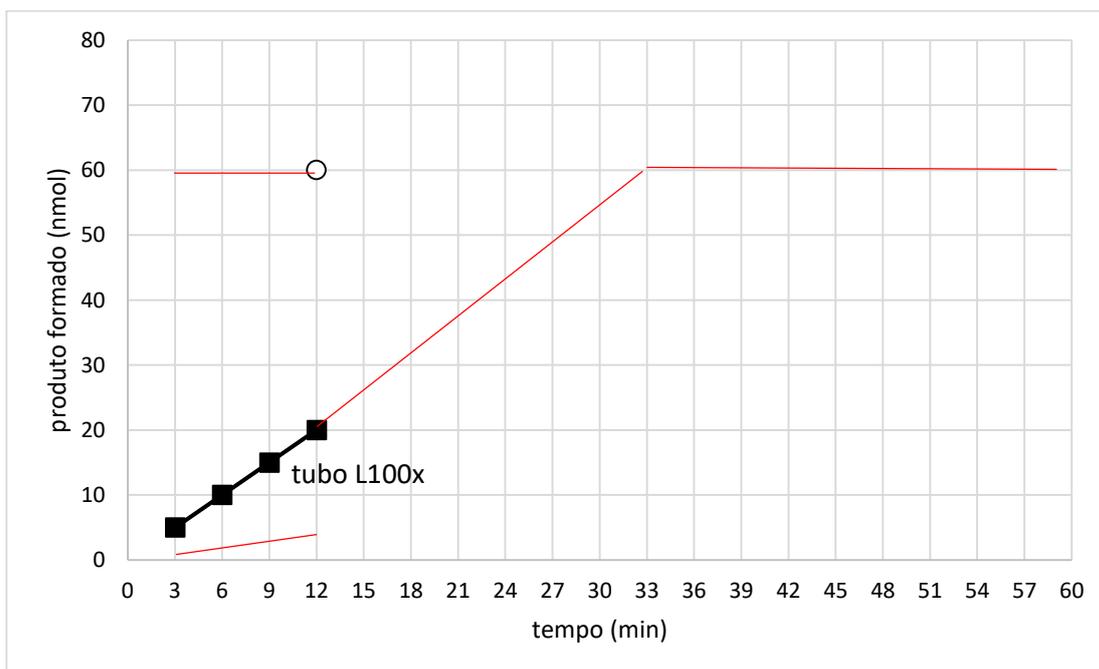


Nome: _____ nr. USP: _____

Questão 1 (2,0 pontos) Você preparou um lisado de células de levedura (chamado tubo “L”), e subsequentemente diluiu esse lisado 100x (tubo “L100x”) e 500x (tubo “L500x”). Utilizando esses três tubos, você então preparou um conjunto de quatro reações enzimáticas para cada tubo, totalizando 12 reações, utilizando um substrato adequado para a enzima de interesse e incubou estes tubos por 3 a 12min a 30°C. Com auxílio de alguns brancos e uma curva padrão, você então determinou a quantidade de produto formado (em nmol) nestes 12 tubos ao longo do tempo. O resultado para o conjunto de reações do tubo “L100x” (■) e para o último tubo (12min) de um dos outros conjuntos (O) geraram o seguinte gráfico:



a) (0,5 ponto) O conjunto de reações utilizando o material do tubo L100x está em velocidade inicial? Justifique sua resposta detalhadamente.

0,25: Sim +

0.15: Porque está linear +

0.1: porque depletou substrato/taxa de formação de produto constante

b) (1 ponto) A partir desse gráfico, **deduza** (não calcule) a quantidade **plausível** de produto formado nas reações utilizando os tubos “L” e “L500x” entre 3min e 12min de reação e desenhe no gráfico acima duas curvas adicionais, uma para cada conjunto de reações, incluindo o ponto (O) já desenhado, indicando qual curva se refere a qual conjunto de tubos. Justifique sua resposta.

0,25 cada reta correta

0,25 cada justificativa:

L porque muito concentrado, já depletou todo substrato antes dos 3 min

L500x muito diluído, taxa de formação mais lenta (inclinação reta menor), mas ainda velocidade inicial

c) (0,5 ponto) De maneira análoga, deduza a quantidade de produto formado plausível para incubações mais prolongada das reações utilizando o tubo L100x, estendendo o gráfico até 60 min de reação. Justifique sua resposta.

0,25 reta com platô em 60 (platô em lugar diferente de 60 = 0,15)

0.25 justificativa: reação continua em Vo até depletar substrato, depois taxa de reação diminui

Questão 2 (1,0 ponto) Responda cada uma das perguntas abaixo, utilizando **uma frase** em cada resposta:

- a) (0,25 pontos) Qual foi o processo utilizado em aula para lisar células de levedura? **Lise mecânica com pérolas de vidro e agitação (vórtex)**
- b) (0,25 pontos) Por que é necessário ferver a amostra durante a reação com DNS? **Para linearizar o açúcar e permitir reação da extremidade redutora**
- c) (0,25 pontos) Como funciona o reagente de Bradford e o que ele quantifica? **Quantifica proteínas, interage com proteínas (aminoácidos básicos), mudando espectro de absorção**
- d) (0,25 pontos) Qual foi a função do reagente para-nitrofenil alfa-glicosídeo em aula? **Substrato da enzima que queremos purificar**

Questão 3 (2,0 pontos) Você está buscando otimizar as condições para purificação de uma enzima de seu interesse usando sulfato de amônio. Você prepara um lisado de levedura e divide esse lisado em seis frações iguais. Mantendo uma fração como controle, você adiciona a cada um dos cinco tubos restantes uma quantidade crescente de sulfato de amônio, de acordo com a tabela abaixo:

Tubo	[Sulfato de Amônio]
1	500mM
2	1M
3	1,5M
4	2M
5	2,5M

Após a incubação com sulfato de amônio, você centrifuga os cinco tubos (1-5), separando os precipitados (P1, P2, P3, etc.) dos sobrenadantes (S1, S2, S3, etc.).

Você então determina a quantidade de proteínas totais e a atividade enzimática total da sua enzima de interesse tanto no lisado original quanto em cada uma das frações, obtendo os resultados listados na tabela abaixo:

Amostra	Proteína Total (mg)	Atividade enzimática (U)
Lisado	50	10
S1	45	9,9
P1	5	0,1
S2	40	9,8
P2	10	0,2
S3	35	9,7
P3	15	0,3
S4	30	1,5
P4	20	8,5
S5	25	0,2
P5	25	9,8

Considerando esses dados, responda:

- a) (0,5 pontos) Como o sulfato de amônio causa a precipitação diferencial de proteínas?
Salting-out-> dessolvatação de proteína -> interação entre aminoácidos hidrofóbicos -> mais hidrofóbicas precipitam com menos sal
- b) (0,5 pontos) Sua enzima de interesse está entre as 50% mais hidrofóbicas ou 50% mais hidrofílicas do lisado? Justifique sua resposta.
0,25: Está entre as 50% mais HIDROFÓBICAS
0,25: 50% das proteínas totais não precipitou nem na condição 5 (S5 tem 25mg de proteína total), então essas 50% mais hidrofílicas precisam de mais sal ainda. Nossa proteína precipitou antes disso, então está em entre as mais hidrofóbicas
- c) (1 ponto) Para purificar sua enzima, você decide usar dois passos de precipitação com sulfato de amônio, de maneira semelhante ao protocolo de purificação realizado em aula. Sugira as duas concentrações de sulfato de amônio mais adequadas para maximizar a purificação da sua enzima de interesse por esse protocolo e identifique em qual fração desse protocolo sua enzima se encontraria, descrevendo seu raciocínio para chegar nessas conclusões.
1.5M no primeiro passo – enzima de interesse no sobrenadante
2.5M no segundo passo – enzima no precipitado (aceitei 2M se justificado corretamente em termos de enriquecimento vs recuperação)

Questão 4 (5 pontos)

Você está purificando a enzima alfa-glicosidase e preparou um lisado de leveduras de 12mL. Você separou 2mL desse material para uso posterior e empregou os 10mL restantes em uma purificação por sulfato de amônio. Ao final do processo de purificação, você gerou uma solução de 2mL de volume contendo seu material purificado. Você então gerou uma curva padrão usando 200µL de padrão de albumina e 1.0mL de reagente de Bradford e determinou a absorvância a 595nm, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1: Curva padrão do ensaio de Bradford

Tubos	Albumina (µg)	Absorbância a 595nm (branco já descontado)
1	0.8	0.057
2	1.6	0.077
3	4	0.137
4	8	0.237
5	12	0.337
6	16	0.437
7	20	0.537
8	24	0.637

9	28	0.737
10	32	0.837

A seguir, você pipetou 10 μ L do seu lisado original em 990 μ L de água (tubo “L diluído”) e pipetou 50 μ L do material purificado em 950 μ L de água (tubo “P diluído”) e utilizou estes tubos para realizar um ensaio de Bradford, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2: Ensaio de Bradford

Tubo	Amostra	Água	Reagente de Bradford	Absorbância a 595nm
1	-	0,2mL	1,0mL	0,260
2	0,2mL de “L diluído”	-	1,0mL	0,560
3	0,2mL de “P diluído”	-	1,0mL	0,710

Para quantificar a atividade enzimática da alfa-glicosidase presente nas amostras, você então gerou uma curva padrão do produto da reação enzimática, relacionando a absorbância desse produto a 420nm com a quantidade (em nmol), obtendo a equação: $y=0,05x-0,008$.

A seguir, você diluiu seu lisado original em 200x (tubo “L200x”) e o material purificado em 100x (tubo “P100x”) e realizou um ensaio de atividade enzimática com pontos de 5min, 10min, 15min e 20min, conforme tabela abaixo:

Tabela 3: Ensaio de atividade enzimática

Tubos	Amostra	Água	Substrato (2 mM)	Tempo de incubação	Absorbância a 420nm, já descontado o branco
1	100 μ L L200x	-	100 μ L	5min	0,08
2	100 μ L L200x	-	100 μ L	10min	0,160
3	100 μ L L200x	-	100 μ L	15min	0,240
4	100 μ L L200x	-	100 μ L	20min	0,320
5	50 μ L P100x	50 μ L	100 μ L	5min	0,200
6	50 μ L P100x	50 μ L	100 μ L	10min	0,400
7	50 μ L P100x	50 μ L	100 μ L	15min	0,450
8	50 μ L P100x	50 μ L	100 μ L	20min	0,460

As reações foram interrompidas no intervalo de tempo indicado com a adição de 2,0 ml de tampão carbonato-bicarbonato pH 11, da mesma maneira como foi feito na curva padrão do produto.

A partir desse conjunto de dados, preencha a tabela abaixo, **demonstrando os cálculos e indicando as unidades** adequadas:

Amostra	Volume	Concentração de proteínas	Quantidade total de proteínas	Concentração de atividade enzimática	Quantidade total de atividade enzimática	Atividade específica	Recuperação	Enriquecimento
Lisado Original	10mL	5,26 mg/mL	52,6 mg	0,64 U/mL	6,4 U	0,12 U/mg	-	-
Fração Purificada	2mL	1,65 mg/mL	3,3 mg	1,6 U/mL	3,2 U	0,97 U/mg	50%	8x

0,5

1,0

0,2

1,6

0,2

0,5

0,5

0,5

(considere 1U = 1 µmol/min)