

Prática 5

Determinação do pH ótimo da alfa-glicosidase

Objetivos

Determinar o pH ótimo da alfa-glicosidase.

Reagentes	Materiais	Aparelhagem
Água destilada	Tubos de ensaio	Banho térmico a 30 °C
Fração DEAE	Pipetadores	Leitor de placas
Solução de PNP α Glc 8 mM em água	Ponteiras	Vortex
Tampão fosfato 200 mM pH 7,0	Suporte para tubos de ensaio	
Tampão borato 200 mM pH 8,0	Placa com 96 poços para ler absorbância no visível	
Tampão borato 200 mM pH 9,0		
Tampão citrato 200 mM pH 4,0		
Tampão citrato 200 mM pH 5,0		
Tampão citrato 200 mM pH 6,0		
Tampão Carbonato/Bicarbonato 100 mM pH 11,0		

Ensaio de atividade enzimática em três pHs diferentes

Observação: Cada grupo de três alunos escolherá um conjunto de três pHs diferentes para medir a atividade enzimática da alfa-glicosidase. Em seguida, este grupo se reunirá com outro grupo que selecionou pHs diferentes, e os dois grupos analisarão os dados em conjunto

1. Pegue 10 ml de cada tampão que você escolheu e transfira para um tubo Falcon de 15 ml identificado com o valor de pH correspondente.
2. Separe os tubos de ensaios necessários de acordo com a Tabela 1.
3. Mantenha os tubos de ensaio no gelo.
4. Adicione em cada tubo uma alíquota do substrato conforme especificado na Tabela 1.
5. Adicione em seguida o tampão de pH desejado (Tabela 1).
6. Repita os procedimentos 3 e 4 para os dois outros pHs escolhidos.
7. Finalmente, adicione em cada tubo a alíquota da fração DEAE purificada na prática 4 (Tabela 1), e agite-o manualmente.
8. Transfira todos os tubos simultaneamente para o banho a 30°C.
9. Incube os tubos pelos intervalos de tempo indicados na Tabela 1.
10. Ao retirar cada tubo do banho, interrompa a reação enzimática pela adição de 2 ml de tampão carbonato-bicarbonato pH 11.
11. Agite os tubos manualmente, e deixe-os à temperatura ambiente.
12. Use água para calibrar (zerar) o espectrofotômetro.
13. Uma vez que todos os tubos tenham sido retirados, leia as absorbâncias a 420 nm.
14. Complete a Tabela 2.

Tabela 1

tubos	NP α Glc 8 mM em H ₂ O (mL)	Tampão pH (mL)	Fração DEAE (ml)	H ₂ O (ml)	Tempo de incubação a 30°C (min)
1	0,2	0,18	0,02	-	5
2	0,2	0,18	0,02	-	10
3	0,2	0,18	0,02	-	15
4	0,2	0,18	0,02	-	20
Branco da Enzima	---	0,20	-	0,2	20

Tabela 2

tubos	pH ____ A ₄₂₀	pH ____ A ₄₂₀	pH ____ A ₄₂₀
1			
2			
3			
4			
Branco da Enzima			

Análise dos Resultados

1. Calcule a concentração de atividade (em mU/ml) em cada um dos três pHs.
2. Em conjunto com outro grupo que analisou pHs diferentes, construa um gráfico da atividade relativa (%) (em relação à maior atividade) em função do pH. Em qual pH a alfa-glicosidase é mais ativa?

pH	Atividade na fração DEAE (mU/ml)	Atividade enzimática relativa (%)
4,0		
5,0		
6,0		
7,0		
8,0		
9,0		