

Prática 5

Purificação de proteínas – SDS-PAGE

Objetivos

Analisar a composição de proteínas da fração que contém α -glicosidase eluída na cromatografia de troca-iônica e compará-la com a composição de proteínas do lisado total e da fração P2 separada por precipitação com sulfato de amônio.

solução A

acrilamida	29,2 g
N'N'bis metilenoacrilamida	0,80 g
Água qsp	100 ml

solução B

Tris 1,5 M pH 8,8
(acertar o valor do pH com HCl)

solução C

Tris 0,5 M pH 6,8
(acertar o valor do pH com HCl)

Tampão de amostra

Água	3,55 ml
Solução C	1,25 ml
Glicerol	2,50 ml
SDS 100 g/l	2,00 ml
Azul de bromofenol 5 g/l	0,20 ml
β -mercaptoetanol	0,05 ml

Tampão de corrida

Tris	3,03 g
Glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
Água qsp	1 L

Obs: Não acertar o pH desta solução tampão

Solução de coloração

Comassie blue R	0,1 g
Metanol	40 ml
Ácido acético	10 ml
Água qsp	50 ml

Solução de descoloração

Metanol	40 ml
Ácido acético	10 ml
Água qsp	50 ml

Procedimento A – Preparação do gel de SDS-PAGE (executado previamente)

Todos os procedimentos serão realizados pelos alunos a menos quando indicado explicitamente.

Preparação do gel de separação

1. Adicionar em um tubo os volumes estipulados na Tabela 1.
2. Homogeneizar rapidamente.
3. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro previamente montadas.
4. Aguardar a polimerização – cerca de 60 min.
5. Colocar o pente entre as placas de vidro.

Preparação do gel de empilhamento

6. Após a polimerização do gel de separação, adicionar em outro tubo os volumes estipulados na Tabela 2.
7. Homogeneizar rapidamente.
8. Transferir a mistura, utilizando uma pipeta Pasteur, para as placas de vidro (com o pente) contendo o gel de separação polimerizado.
9. Aguardar a polimerização – cerca de 40 min.
10. Após a polimerização do gel de empilhamento, retirar cuidadosamente o pente.
11. Adicionar o tampão de corrida.

Tabela 1: Preparo do gel de separação

Soluções	Volume (ml)
Água	4,02
SDS 100 g/l	0,100
Solução A	3,33
Solução B	2,5
TEMED	0,005
Persulfato de amônio (APS)	0,050

Tabela 2: Preparo do gel de empilhamento

Soluções	Volume (ml)
Água	3,05
SDS 100 g/l	0,050
Solução A	0,65
Solução C	1,25
TEMED	0,005
Persulfato de amônio (APS)	0,025

Procedimento A – Preparação das amostras

Vocês analisarão por SDS-PAGE amostras do lisado, da fração P2, e da fração DEAE.

Diálise das amostras (Executado previamente)

1. Transferir para um microtubo (*ependorf*) o volume indicado de amostra.
2. Identificar o tubo com:
 - a) Nome da amostra.
 - b) Número do grupo.
3. Adicionar água, caso necessário, até completar 600 μ L.

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 tubo para um suporte de isopor.
7. Colocar o suporte dentro de um béquer contendo água.
8. Manter sob agitação por pelo menos 16 horas.

Secagem a vácuo (Executado previamente)

9. Após a diálise, transferir as amostras para um concentrador a vácuo.
10. Secar as amostras.

Diluição das amostras:

11. Dilua a fração P2 25x com água destilada. Agite levemente a fração P2 para torná-la homogênea. Em um tubo eppendorf identificado como P2 25x, adicione 40 µl da fração P2 e complete para 1 ml com 960 µl de água
12. Dilua o lisado 50x com água destilada. Agite levemente o lisado para torná-lo homogêneo. Em um tubo eppendorf identificado como L50x, adicione 20 µl de lisado e 980 µl de água destilada.

Determinação da concentração de proteínas no lisado e na fração P2 pelo ensaio de Bradford

13. Prepare os tubos 1, 2 e Branco conforme a Tabela 1, adicionando os reagentes na ordem estipulada da esquerda para a direita.
14. Feche os tubos, e agite no *vortex* para homogeneizar.
15. Incube por 5 minutos à temperatura ambiente.
16. Transfira 200 µl para a placa de 96 poços para medir a absorbância a 595 nm
17. Com auxílio da curva padrão de albumina construída na prática 2, complete a Tabela 2
18. Complete a Tabela 3. Você deve calcular o volume de P2 25x e de L 50x correspondentes a 20 µg de proteína total.
19. Confira o seu resultado com o monitor ou com o professor

Tabela 1: Preparação de amostras para o ensaio de Bradford

Tubo	P2 25x ou L 50x (ml)	Água (ml)	Reagente de Bradford (ml)
1	0,100	-	1,0
2	0,100	-	1,0
Branco	-	0,100	1,0

Tabela 2: Determinação da concentração de proteínas

Tubos	A595	Massa de proteína (µg)	Concentração de proteína (mg/ml)
1			
2			

Tabela 3: Volumes de P2 25x e de L50x que devem ser aplicados no gel

Amostra	Volume correspondente a 20 µg de proteína total (µl)
P2 25x	
L 50x	

Desnaturação das proteínas presentes nas amostras

20. Antes de começar, complete a Tabela 4 com os dados da Tabela 3. O volume total de amostra aplicado no gel (amostra + tampão de amostra + água) deve ser igual a 20 µl.
21. Adicione os volumes especificados na Tabela 4 a tubos eppendorfs identificados (L 50x, P2 25x, DEAE). A amostra da fração DEAE para aplicação no gel será preparada a partir da dissolução da alíquota liofilizada em tampão de amostra preparado conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Preparação de amostras para serem aplicadas no gel de SDSPAGE

Tubos de amostra	Amostra (µl)	Tampão de amostra (µl)	Água (µl)
L 50x		5	
P2 25x		5	
DEAE	-	5	

22. Transferir os microtubos para um banho fervente.
23. Incubar os microtubos por 5 min.
24. Retirar os microtubos e mantê-los em gelo por 5min.
25. Dar um spin nestes tubos por no máximo 1min.
26. Homogeneizar e aplicar as amostras nos devidos poços de um gel de eletroforese com o auxílio de micropipetas (evitar bolhas e derrame de amostras e tentar aplicar o máximo da amostra que conseguir no poço).

Procedimento C – Eletroforese, coloração e descoloração

1. Correr a eletroforese a 200V durante aproximadamente 60 min no mínimo.
2. Desligar a fonte quando o corante marcador e a linha de frente atingirem a base do gel.
3. Desconectar os cabos.
4. Retirar o gel.
5. Colocar o gel no frasco contendo a solução de coloração.
6. Corar o gel por 10 min.
7. Retirar o gel do frasco de coloração.
8. Colocar o gel no frasco contendo a solução de descoloração.
9. Descorar o gel segundo protocolo informado em aula.
10. Visualizar as bandas de proteínas e fotografar o gel.

Procedimento D – Desidratação do gel (Opcional)

1. Colocar o gel num frasco contendo água.
2. Trocar tantas vezes quanto for necessário a água do frasco até a remoção completado ácido acético.
3. Retirar o gel hidratado do frasco com água.
4. Colocar o gel num frasco contendo solução de glicerol 50 g/L.
5. Molhar com a solução de glicerol lâminas de celofane natural

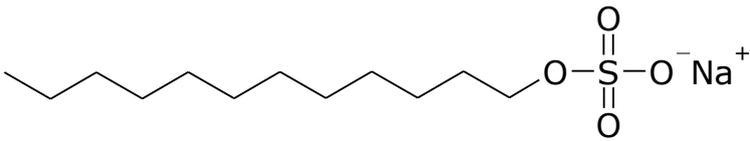
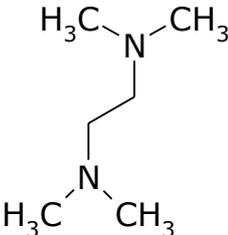
6. Dispor as folhas de celofane sobre placas limpas de vidro.
7. Colocar os géis sobre as lâminas de celofane devidamente hidratadas e limpas.
8. Colocar outra folha de celofane previamente hidratada sobre o gel, formando assim um sanduíche.
9. Retirar delicadamente as bolhas de ar que estiverem aprisionados pelas folhas de celofane.
10. Esticar as folhas e prendê-las.
11. Deixar secar à temperatura ambiente.

Análise dos Resultados (Relatório 5)

INSTRUÇÕES:

1. Detalhar os cálculos do volume de amostra diluída que deve ser aplicado no gel
2. Identificar a banda correspondente à α -glicosidase no gel de SDS-PAGE.
3. Calcular a provável massa molar relativa da enzima com base no padrão de massa molar utilizado na eletroforese e fornecido em aula através de cálculo da migração.

FÓRMULAS ESTRUTURAIS E MASSAS MOLARES

<p style="text-align: center;">SDS (288,38 g/mol)</p> 	<p style="text-align: center;">TEMED (116,20 g/mol)</p> 
<p>CONVERSÃO DE PERSULFATO EM ÍON SULFATO</p> $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{e}^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{\cdot -}$	
<p style="text-align: center;"><i>REAÇÃO DE</i> POLIMERIZAÇÃO DA ACRILAMIDA E COM A BIS-ACRILAMIDA</p>	