

Prática 6

Caracterização da alfa-glicosidase: K_m e V_{max}

Objetivo

Caracterizar a α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* através da determinação da afinidade da enzima pelo substrato p-nitrofenol- α -glicosídeo (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) de hidrólise do substrato. Determinar o mecanismo de inibição exercida pela maltose e calcular a afinidade pelo inibidor (K_i).

Reagentes

Água destilada

Lisado bruto de levedura
p-nitrofenol- α -glicosídeo (NP α Glc) 1,0 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

p-nitrofenol- α -glicosídeo (NP α Glc) 2,0 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

p-nitrofenol- α -glicosídeo (NP α Glc) 8,0 mM
em tampão fosfato 100 mM pH 7,0

Tampão carbonato-bicarbonato 250 mM pH
11,0

Tampão fosfato 100 mM pH 7,0

Maltose 0,4 M em água

Materiais

Banho de gelo
Placa de 96 poços para leitura
de absorbâncias na leitora de
placas

Pipetadores

Tubos de ensaio

Ponteiras

Suporte para tubos de ensaio

Aparelhagens

Banho a 30 °C
Espectrofotômetro

Leitora de placas

Vortex

A) Diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

Abaixo segue o procedimento sugerido para a diluição do lisado de *Saccharomyces cerevisiae*:

1. Transferir 0,10 mL do lisado de *Saccharomyces cerevisiae* para um tubo identificado como **L10X**
2. Adicionar 0,90 mL de água destilada
3. Homogeneizar suavemente
4. Transferir 0,04 ml de L10X para um novo tubo de ensaio identificado como **L500X**
5. Adicionar 1,96 ml de água destilada
6. Homogeneizar suavemente

B) Medir as velocidades da reação de hidrólise do substrato

MANTER OS TUBOS DE ENSAIO EM BANHO DE GELO

1. Preparar os tubos em banho de gelo
2. Adicionar em cada tubo os volumes de substrato, tampão, lisado (**L500X**) e eventualmente maltose estipulados na Tabela 1. Agitar manualmente com cuidado
3. Transferir todos os tubos ao mesmo tempo do banho de gelo para o banho a 30 °C
4. Incubar todos os tubos por **20** minutos
5. Remover todos os tubos do banho simultaneamente
6. Adicionar 2 ml de tampão carbonato-bicarbonato em cada tubo e homogeneizar
7. Deixar os tubos a temperatura ambiente
8. Transferir 0,2 ml de cada tubo para a placa de 96 poços em duplicata ou triplicata

9. Completar um pocinho como água e usar como branco de água
10. Ler as absorvâncias a 420 nm
11. Completar a Tabela 2

Tabela 1

Tubo	NPαGlc 1,0 mM (ml)	NPαGlc 2,0 mM (ml)	NPαGlc 8,0 mM (ml)	Tampão fosfato 100 mM pH 7,0 (ml)	Lisado bruto diluído (ml)	Maltose 0,4 M
Branco				0,20	0,20	-
1	0,01			0,19	0,20	-
2	0,02			0,18	0,20	-
3	0,04			0,16	0,20	-
4	0,06			0,14	0,20	-
5	0,08			0,12	0,20	-
6	0,10			0,10	0,20	-
7		0,08		0,12	0,20	-
8		0,10		0,10	0,20	-
9			0,05	0,15	0,20	-
10			0,06	0,14	0,20	-
11			0,07	0,13	0,20	-
12	0,01			0,09	0,20	0,10
13	0,02			0,08	0,20	0,10
14	0,04			0,06	0,20	0,10
15	0,06			0,04	0,20	0,10
16	0,08			0,02	0,20	0,10
17	0,10			0	0,20	0,10
18		0,08		0,02	0,20	0,10
19		0,10		0	0,20	0,10
20			0,05	0,05	0,20	0,10
21			0,06	0,04	0,20	0,10
22			0,07	0,03	0,20	0,10

Tabela 2

Tubo	[S] no tubo de ensaio (mM)	A420	A420 - Branco	nmols de produto	Velocidade (nmol/min)
Branco					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					

Com os dados obtidos e com auxílio da curva padrão de p-nitrofenolato determine K_m e V_{max} da α -glicosidase para o substrato utilizado (tubos 1 a 11). Em seguida, com os dados dos tubos 12 a 22 calcule o K_m e V_{max} na presença do inibidor maltose. Qual é o mecanismo de inibição? Determine o K_i para a maltose.

Os dados para a confecção da curva padrão estão abaixo:

PNP (nmol)	Abs $\lambda = 420$ nm
20	0,076
60	0,207
100	0,342
200	0,686
240	0,808
280	0,935
320	0,999
360	1,249
400	1,342