

QBQ1453 – Bioquímica Experimental

04 de julho de 2023

Exercícios de revisão

Prof. Roberto K. Salinas

1) Um especialista trabalhando em uma startup recebeu como tarefa avaliar o grau de recuperação e enriquecimento de uma preparação de alfa-glicosidase recombinante. A enzima foi isolada em duas etapas, primeiro uma precipitação com 50% de sulfato de amônio. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 (fração P2), aplicado em uma coluna de troca iônica Q-sepharose e a enzima foi eluída em um gradiente de NaCl. A quantidade total de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford, encontrou-se 100, 40, e 7 mg no lisado, no P2, e na fração purificada por troca-iônica, respectivamente. O volume de lisado que foi submetido à precipitação com sulfato de amônio foi de 10 ml. O precipitado P2 também foi solubilizado em 10 ml de tampão, e toda a amostra foi aplicada na coluna de Q-sepharose. As frações eluídas da Q-sepharose foram combinadas, formando um volume de 5 ml. A concentração de atividade da enzima foi determinada usando o ensaio de hidrólise de PNP α Glc em um volume de reação de 0,2 ml. A equação da curva padrão de para-nitrofenolato foi $y = 0,010x - 0,00025$, onde x refere-se à quantidade de para-nitrofenolato em nmol e y a absorbância a 420nm. Todas as amostras foram diluídas 1000x para medir a atividade enzimática. O ensaio de atividade resultou nos seguintes valores de A_{420} em função do tempo:

Tempo (min)	Lisado (A_{420})	P2 (A_{420})	Q-sepharose (A_{420})
5	0,5	0,4	0,35
10	1,0	0,8	0,7
15	1,5	1,2	1,05
20	2,0	1,6	1,4

Pergunta-se:

- Calcule a atividade enzimática total de cada fração;
- Calcule a recuperação e o enriquecimento de cada etapa de purificação.

2) Você purificou uma enzima celulase em duas etapas cromatográficas:

- Cromatografia de troca iônica em pH 10,0
- Gel filtração em pH 6,0

Após cada etapa de purificação os tubos contendo atividade celulásica foram reunidos, e foi determinada a atividade celulásica total bem como a massa total de proteínas (proteína total recuperada) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Atividade celulásica e massa total de proteínas obtidas em cada etapa de purificação.

Etapa	Atividade aplicada (U)	Atividade recuperada* (U)	Proteína total aplicada (mg)	Proteína total recuperada** (mg)
Troca iônica	400	250	1,0	0,05
Filtração em gel	250	220	0,05	0,02

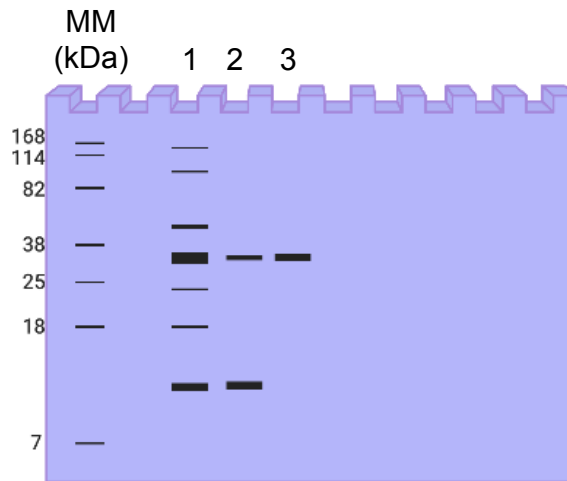
*Atividade total das frações coletadas

**Massa total de proteína nas frações coletadas

Responda:

- Qual foi a recuperação da enzima após a etapa de cromatografia de troca iônica? E após a cromatografia de filtração em gel?
- Qual foi o enriquecimento obtido na etapa de cromatografia de troca iônica? E na etapa de filtração em gel?

3) As amostras purificadas no exercício anterior foram aplicadas em um gel SDSPAGE, corado com azul de Coomassie, e cujo resultado é mostrado abaixo. A amostra indicada por MM refere-se ao padrão de massa molar, "1" refere-se à amostra aplicada na coluna de troca iônica, "2" é a fração que eluiu da coluna de troca iônica, e "3" a fração separada por filtração em gel:



A coluna de gel filtração foi calibrada com um conjunto de amostras de massa molar conhecida, sendo que a única fração com atividade celulásica eluiu em 9,58 ml. O volume total da coluna era de 25 ml (Tabela 2).

Tabela 2. Calibração da coluna de gel filtração. Volume total: 25 ml.

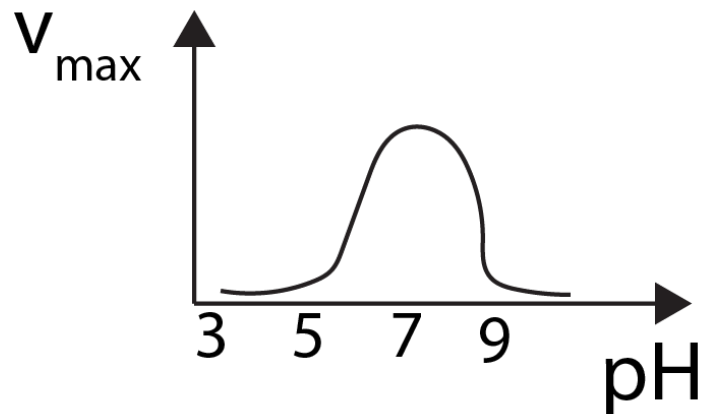
Amostra	Volume de eluição (ml)
Proteína padrão de 2000000 Da	8,30
Proteína padrão de 120000 Da	9,38
Proteína padrão de 45000 Da	11,91
Proteína padrão de 12400 Da	14,20

Proteína padrão de 6500 Da	16,22
Fração contendo atividade celulásica	9,67

Com base nos dados de SDSPAGE e de gel filtração responda:

- Qual é a massa molar da enzima em seu estado nativo?
- Há discrepância entre a massa molar determinada por gel filtração e por SDSPAGE? Em caso positivo, proponha uma explicação.
- Qual é a função do SDS em um gel SDSPAGE?
- Qual é a diferença entre um gel nativo e um gel desnaturante?

4) O gráfico abaixo ilustra o comportamento da velocidade máxima de uma enzima em função do pH.



Você testou duas resinas de troca iônica, uma Q-sepharose (troca aniônica) e uma S-sepharose (troca catiônica) para purificar essa enzima a partir do extrato de leveduras, utilizando a medida de atividade no pH ótimo como forma de detecção. Você testou dois tampões para realizar a cromatografia de troca iônica: tampão acetato pH 5,0 e tampão Tris pH 8,0. Você testou a presença da enzima na fração não ligada e na fração eluída com 1,0 M de NaCl. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Atividade enzimática observada nas frações não ligada e eluída com NaCl 1M

Tampão	Resina Q-sepharose		Resina S-sepharose	
	Fração não ligada	Fração eluída com NaCl 1 M	Fração não ligada	Fração eluída com NaCl 1M
pH 5,0	++	-	-	++
pH 8,0	-	+	+	-

Responda:

- Qual é o pH ótimo da enzima?
- Qual é o pI da enzima?

5) A atividade da enzima COX foi medida utilizando como substrato ácido araquidônico. Foram realizadas duas medidas, na presença e ausência de ibuprofeno, um inibidor de COX. Com base nos valores descritos abaixo determine V_{max} e K_m na ausência e presença do inibidor. Qual é o mecanismo de inibição do ibuprofeno?

[ácido araquidônico] (μM) *¹	v_0 ($\mu\text{M s}^{-1}$) *¹	v_0 (+ ibuprofeno) ($\mu\text{M s}^{-1}$) *¹
1.0	1.7	0.9
3.25	3.9	2.4
5.5	5.2	3.5
7.75	6.1	4.4
10	6.7	5.0

*¹As concentrações de substrato e produto são expressas em unidades de μM (10^{-6} M).