



Curso de Biotecnologia
ACH5545 Engenharia Genética
Atividade Aula 17/10/2024

Purificação e determinação de atividade da Enzima Acetil Esterase (TfAEST)

Procedimento para Purificação por Cromatografia de afinidade:

1. Massa bacteriana será rompida por sonicação (10s on / 50s off, por 4 minutos) em tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,2) e centrifugada durante 30 minutos à 4°C e 10.000 rpm;
2. Coletar o sobrenadante e adicionar NaCl até concentração final de 500 mM, objetivando deixar a mistura protéica nas condições do tampão de ligação a ser utilizado na etapa de purificação.

Procedimento:

1. **ETAPA DE LIGAÇÃO:** Em microtubo de 2 mL, acrescentar 1,5 mL do sobrenadante bacteriano e adicionar 250 uL de resina agarose Ni-NTA (Qiagen, USA).
2. Homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 10 minutos.
3. Em seguida, centrifugar por 1 min a 5.000 rpm, para sedimentar a resina, e transferir 100 µL do sobrenadante para um microtubo limpo de 1,5 mL (identificar como **T1**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar. Conservar a resina.

Obs: As amostras de sobrenadante conterão proteínas que não se ligaram à resina.

4. **ETAPA DE LAVAGEM:** Adicione 1 mL de **TAMPÃO A** (tampão fosfato de sódio 50 mM/ NaCl 500 mM, pH7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.
5. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir 100 µL do sobrenadante para um microtubo limpo de 1,5 mL (identificar como **T2**, armazenar no gelo). Remover o sobrenadante restante (cuidadosamente com a micropipeta) e descartar. **REPETIR OS PASSOS 4 e 5** (identificar como **T3**, armazenar no gelo)
6. **ETAPA DE ELUIÇÃO:** Acrescentar 300 µL de **TAMPÃO B** (tampão fosfato de sódio 50 mM/ NaCl 500 mM/ Imidazol 500 mM, pH 7,2) à resina. Em seguida, homogeneizar a amostra manualmente (com cuidado) durante 5 minutos.
7. Centrifugar por 1 minuto a 5.000 rpm, transferir **TODO** o sobrenadante restante cuidadosamente para um novo microtubo limpo de 1,5 mL (identificar como **T4**, armazenar no gelo).

Obs: O sobrenadante dessa etapa contém a enzima purificada.

8. Correr as amostras coletadas nos tubos T1 – T4 (25 µL) em gel SDS-PAGE.

Procedimento para determinação da atividade enzimática

1. Em microtubos devidamente identificados, monte o experimento seguindo a tabela abaixo:

	Branco	T1	T2	T3	T4
Tampão de atividade	75 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Substrato	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L
Enzima	0	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L
Volume Final	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
DO 405 nm					
Micromols de Produto					

Substrato: p-nitrofenil acetato - pNPa, 5 mM em metanol 50%

Tampão de Atividade: Fosfato de sódio 50mM pH7,2

2. Misture bem e incube a temperatura ambiente por 10 minutos.
3. A reação deve ser parada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 M.
4. Adicionar 100 μ L da amostra em uma microplaca e o *p*-nitrofenolato liberado será medido a DO_{405} nm.
5. Converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da atividade da aula anterior.

Mapa do gel SDS-PAGE

Gel 1, 2, 3 e 4: Purificação enzima Acetil Esterase

- | | |
|-------------------------------|--------------------|
| 1- Marcador de Peso Proteínas | 6- TFAEST T4 – G1 |
| 2- Sobrenadante | 7- TFAEST T1 – G2 |
| 3- TFAEST T1 - G1 | 8- TFAEST T2 – G2 |
| 4- TFAEST T2 – G1 | 9- TFAEST T3 – G2 |
| 5- TFAEST T3 – G1 | 10- TFAEST T4 – G2 |