

Curso de Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética e Biologia Molecular

Atividade Aula 10/10/2024

Proteína Recombinante I: Análise de Expressão

1- Lise bacteriana

1. Suspender a massa celular bacteriana em 250 uL de tampão de lise (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM e EDTA 1mM).
2. Adicionar um volume equivalente a 50 uL de microesferas/perolas de vidro (tamanho de 450 a 600 nm);
3. Agitar em vortex por 15 min, em velocidade máxima, em intervalos de 5 min on-off, no gelo;
4. Adicionar 1/10 de volume de lisozima 10 mg/ml e incubar a 37 °C por 30 min
5. Adicionar 1/20 vol de Triton X-100 20% e incubar a 37 °C por 15 min.
6. Transferir a parte superior a novo tubo eppendorf limpo.
7. Centrifugar 10.000 rpm/10 min,
8. Transferir o sobrenadante a novo tubo eppendorf limpo.
9. Identificar os tubos como sobrenadante (S) e precipitado (P)
10. Realizar análise de eletroforeses SDS-PAGE, das amostras S e P.

2- Determinação de atividade de fosfatase alcalina (BAP) e Acetile esterase (TfAEST)

Com o material coletado (tubos com 50 uL de cultura induzida) da aula anterior:

1. Em tubos devidamente identificados, contendo 50 uL de massa bacteriana, adicione 50ul de água, suspenda a bactéria e adicione o volume do substrato indicado:
 - BAP: 50 uL de 1 mg/mL p-nitrofenil fosfato (pNP) dissolvido em Tris-Cl 1 M, pH 8
 - TfAEST: 50 uL de p-nitrofenil acetato (pNP_a), 5 mM em metanol 50%
2. Misture bem e incube em temperatura ambiente, por 5 minutos, a reação deve ser parada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 1 M.
3. Transferir 100 µL da amostra aos poços da microplaca (96 poços), segundo a tabela, e o p-nitrofenolato liberado será medido pela absorbância a 405 nm, anote o valor na coluna 4.
4. Com os dados da coluna 4, na tabela abaixo, converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da figura abaixo e preencha a coluna 5.

Tabela. Atividade enzimática de fosfatase alcalina/acetil esterase

Coluna	1	2	3	4	5
Tubo INDZ n°/h	Substrato (mL)	Enzima (ml)	Absorbância (600 nm)	Absorbância (405 nm)	Micromols de Produto
1/0	0,05	0,05			
2/2	0,05	0,05			
3/4- 14 h	0,05	0,05			
4/6 – 16 h	0,05	0,05			
5/8 – 18 h	0,05	0,05			

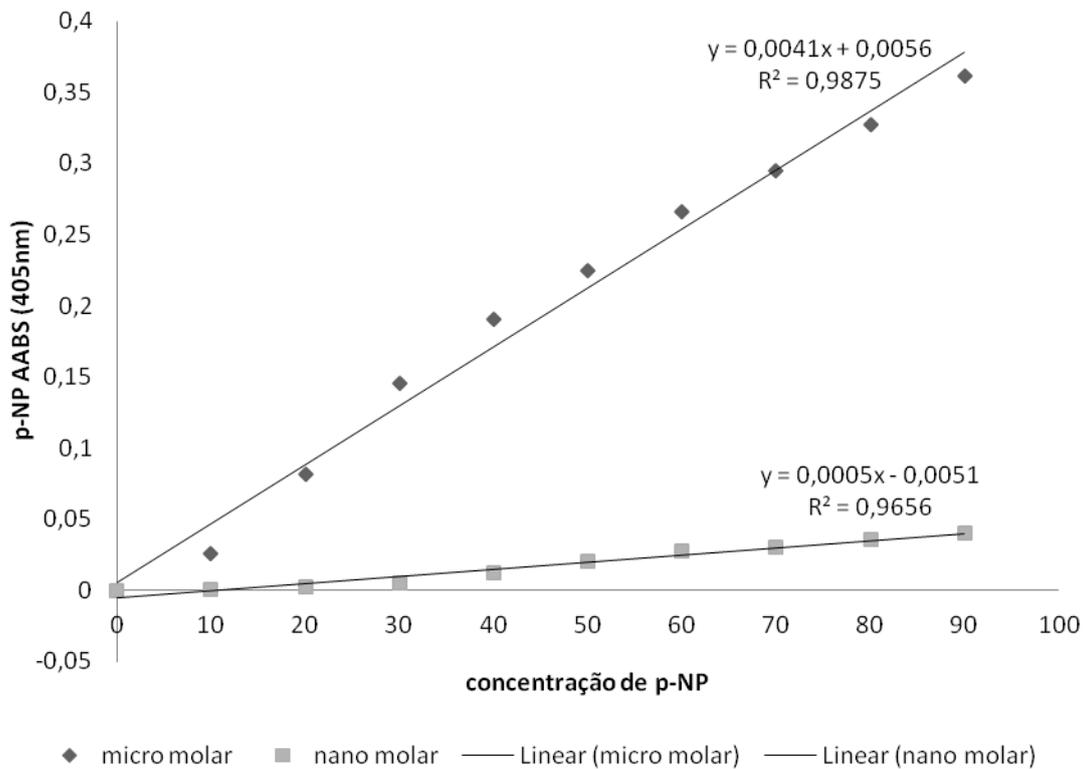


Figura 1. Curva padrão do produto p-nitrofenol