

Curso de Biotecnologia
ACH5545 Engenharia Genética

Atividade Aula 24/10/2024

1. Extração e Determinação de atividade da enzima fosfatase alcalina

A proteína foi expressa utilizando um vetor com sinal de secreção ao espaço periplasmático, assim a metodologia para recuperação da proteína será por Choque Osmótico (Neu and Heppel, 1965).

Procedimento:

1. Suspender a massa bacteriana em 1 mL de tampão (Tris-HCl 30 mM; sacarose 20%; EDTA 1 mM, pH 8,0), homogeneizar por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugar a 10.000 rpm/10min, temperatura ambiente, descartar o sobrenadante,
2. Adicionar 300 µL de H₂O **destilada gelada, manter a amostra no gelo**, vortexar por 15 segundos fortemente a cada 2 minutos, até completar 10 minutos.
3. Após esse período centrifugar a 10.000rpm/10min, temperatura ambiente. Recuperar o sobrenadante (S) e massa bacteriana (P).

- Realizar eletroforese SDS-PAGE com o sobrenadante (S) e uma fração do precipitado (P)

Obsv: O sobrenadante contém a enzima que será utilizada para os ensaios de atividade enzimática.

4. Em tubos devidamente identificados, adicione o volume de substrato (1 mg/mL p-nitrofenil fosfato dissolvido em Tris-Cl 1 M, pH 8) indicado e em seguida adicione o volume de amostra de enzima, de acordo com a tabela abaixo. Misture bem e incube em temperatura ambiente, no tempo indicado.

Obsv: Após o tempo de incubação, adicionar a solução de parada da reação enzimática e manter o tubo no gelo.

5. Transferir 100 µL de cada tubo, para poços devidamente identificados em uma microplaca. Faça leitura da absorbância, no leitor de microplacas Locus, no tempo indicado na tabela e anote o valor na coluna 6.

6. Com os dados da coluna 6, converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão de pNP e preencha a coluna 7.

7. Com os dados da coluna 4 (eixo X) e 7 (eixo Y), construa um gráfico, calcule a equação da reta e determine a inclinação da reta (coeficiente angular) o qual corresponde à velocidade da reação, ou seja, o valor de micromols de produto formado por minuto e que corresponde à

atividade enzimática presente em cada um dos tubos.

8. Determinação da concentração de atividade enzimática (U/mL):

Sabendo que cada um dos tubos recebeu igual volume de amostra com enzima (0,01 mL), conclui-se que a solução inicial contendo a enzima apresenta uma concentração de U/mL, igual à multiplicação do valor obtido na coluna 6 vezes 100. Se a amostra de enzima antes de ser adicionada em cada um dos tubos foi diluída o valor anteriormente obtido deve-se multiplicar pelo fator de diluição para finalmente obter a concentração da atividade enzimática em U/mL.

Tabela. Determinação da atividade enzimática

Coluna	1	2	3	4	5	6	7
Tubo nº	Substrato (uL)	Amostra Enzima (uL)	Tampão Atividade (uL)	Tempo Incubação (min)	Tampão de parada (Na ₂ CO ₃) 1 M (uL)	Absorbância (405 nm)	Micromols de Produto
Branco	20	0	80	2	100		
1	20	10	70	2	100		
2	20	10	70	5	100		
3	20	10	70	10	100		
4	20	10	70	15	100		
5	20	10	70	20	100		

2. Determinação de atividade da enzima acetil esterase

Utilizando a enzima acetil esterase purificada na aula anterior (tubo T4), siga o roteiro da atividade 1, a partir do passo 4, utilizando o substrato específico.

Mapa do gel SDS-PAGE

Gel 1 e 2: Purificação enzima Fosfatase alcalina Bacteriana (BAP)

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1- Marcador de Peso Proteínas | 6- BAP-S – G3 |
| 2- BAP-S – G1 | 7- BAP-P – G3 |
| 3- BAP-P - G1 | 8- BAP-S – G4 |
| 4- BAP-S – G2 | 9- BAP-P – G4 |
| 5- BAP-P – G2 | 10- X |