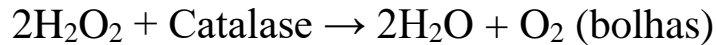




Curso de Biotecnologia
ACH5545 Engenharia Genética
Atividade Aula 31/10/2024

Atividade 1. Atividade Enzima Catalase



Procedimento:

1. Em uma lâmina de vidro, aplique 25 uL de uma solução 3% de H_2O_2 .
2. Adicione 25 uL da enzima catalase e misture.
3. Visualize a formação de bolhas, no tempo máximo de 3 minutos.
4. Registrar o resultado
5. Lave a lâmina com etanol 70% e deixe secar a temperatura ambiente.

Atividade 2. Determinação de atividade da Enzima Superóxido Dismutase (TrSOD) por Zimograma

O ensaio de atividade enzimática foi adaptado por Flohé e Otting (1984; DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05013-8) em gel de poliacrilamida não desnaturante.

Procedimento:

1. Preparar sistema PAGE não desnaturante 15% e tampão de corrida não desnaturante (Trizma base 3,02 g/glicina 14,4 g por litro).
2. Aplicar 50 μL de solução de enzima SOD em tampão de amostra não desnaturante (glicerol 87%; azul de bromofenol 0,1%; tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8).
3. Separar as proteínas por eletroforese a 40 V, na temperatura de 16 °C, durante 12 horas.
4. Retirar o gel e submergir em solução A (nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,025%/ riboflavina 0,010%). Manter no escuro, sob agitação suave durante 30 minutos.
5. Transferir o gel para uma solução B (TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine 0,01%) e expor à luz intensa até a observação das bandas da zona acromática branca, indicativa da atividade da SOD.
6. Registrar o resultado.

Atividade 3. Atividade Biotecnologia - Preparação de Marcador de massa molecular de Proteínas

Materiais:

- 1- Remazol Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich, USA. cat R8001) - Azul
- 2- Remazol Brilliant Orange 3R (Sigma-Aldrich, USA, cat, 306509) - Laranja
- 3- Solução SDS 10% (Pesar 1g de SDS e diluir em 10 ml de água destilada)
- 4- Solução carbonato de sódio 100 mM pH 10 (pesar 1,06 g e diluir em 100 ml de água destilada, ajustar o pH para 10)
- 5- Lisina 1 mg
- 6- Proteína de interesse a ser corada (vide tabela)

Procedimento

1. Preparar o corante remazol (Azul ou Laranja) na concentração de 10 mg/mL em SDS 10% (pesar 10 mg e diluir em 1 ml de SDS 10%)
2. Suspender 1 mg da proteína de interesse em 25 ul de carbonato de sódio 100 mM pH 10
3. Adicionar 5 ul do corante remazol (Azul ou Laranja), em SDS 10%
4. Incubar a 60 °C por 30 minutos
5. Adicionar 5 uL (1 mg) de lisina para parar a reação
6. Incubar por mais 10 minutos a 60 °C
7. Pegar 15 uL da proteína corada, adicionar 15 ul de tampão de aplicação de amostra, SDS-PAGE
8. Ferver por 5 minutos
9. Aplicar 20 uL no SDS-PAGE

Tabela. Proteína de Interesse

Nº	Proteína	Massa Molecular estimada (kDa)	Grupo
1	Albumina de Soro Bovino	67	1, 3, 5, 7
2	Ovalbumina	43	2, 4, 6, 8
3	Quimotripsinogênio A	25	1, 3, 5, 7
4	Ribonuclease A	13,7	2, 4, 6, 8

Referência

Compton MM, Lapp SA, Pedemonte R. Generation of multicolored, prestained molecular weight markers for gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2002 Sep;23(19):3262-5. doi: 10.1002/1522-2683(200210)23:19<3262::AID-ELPS3262>3.0.CO;2-8.