



Biotecnologia

ACH5545 Engenharia Genética

Atividades de Laboratório

2º Semestre 2024

Docente:

Felipe Chambergo (fscha@usp.br) - <https://sites.usp.br/lbbp>

Monitores:

Augusto Roldan Gonçalves - augusto.roldan@usp.br

Henrique dos Santos Hernandes - hernandesrique@usp.br

Servidores não-docentes:

Tec. Pedro Manoel dos Santos - pedroms@usp.br

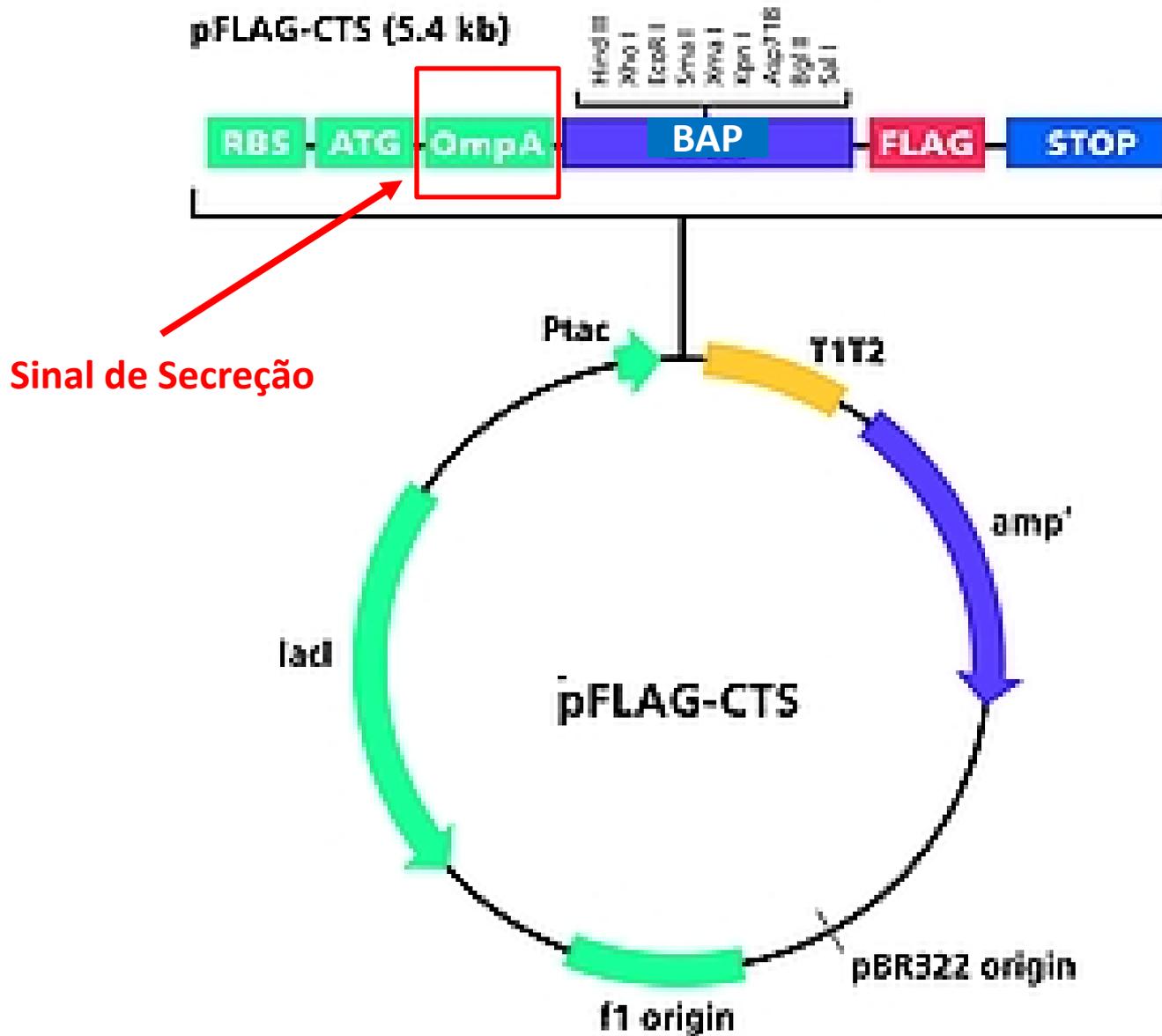
Créditos: 4

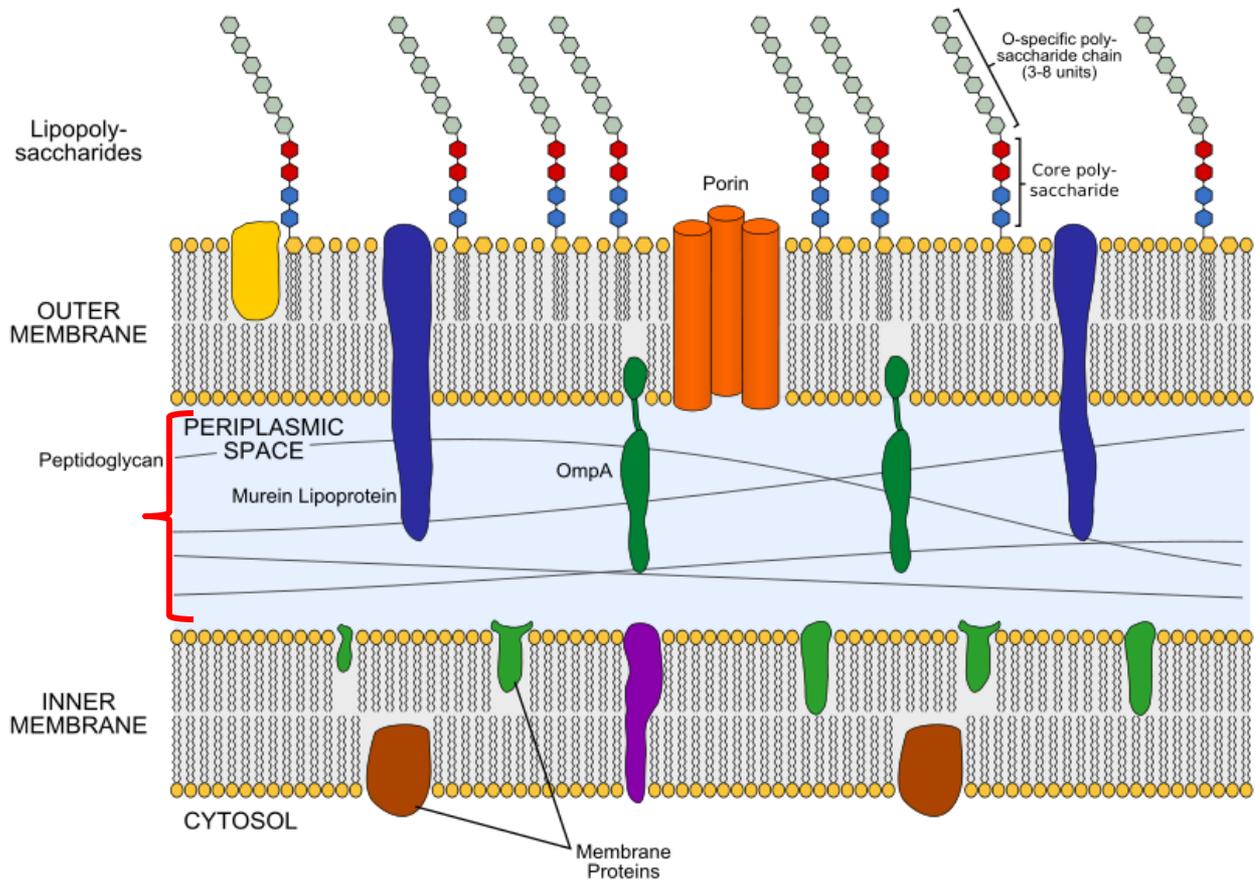
Período: Quinta-feira (14h00 -18h00), Laboratório de Biotecnologia – Edifício A2, 1º andar

USP - 2024

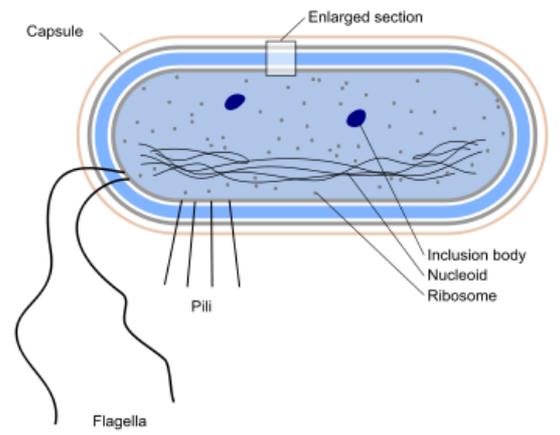
- **Extração e Determinação de atividade da enzima fosfatase alcalina**
- **Determinação de atividade da enzima acetil esterase**

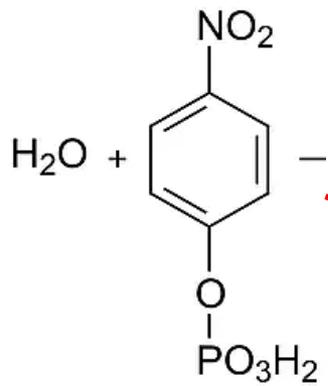
Enzima Fosfatase Alcalina Bacteriana (1338 pb; 49,5 kDa)





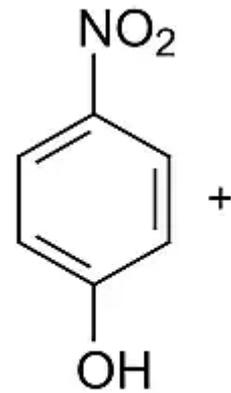
Gram Negative Bacterial Cell Wall



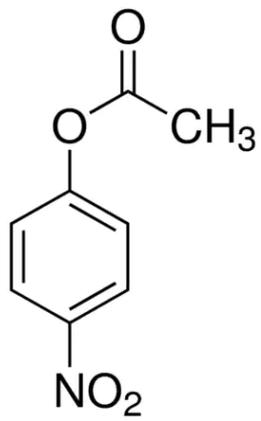


p-Nitrofenil fosfato (pNP)

Fosfatasa alcalina

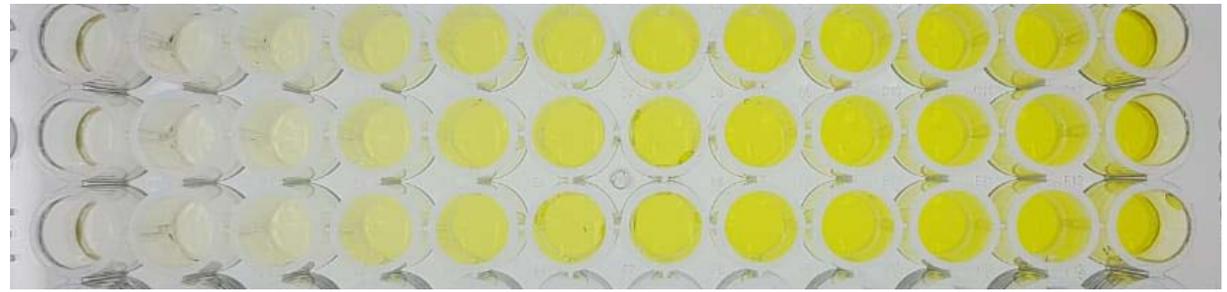


p-Nitrofenol (405 nm)



p-Nitrofenil acetato (pNPa)

Acetil Esterasa



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 10.000rpm/10min, temperatura ambiente, descarte o sobrenadante,
2. Adicionar 300 μ L de H₂O destilada gelada, manter a amostra no gelo, vortexar por 30 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 a massa bacteriana (P). Recuperar o sobrenadante (S).

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.

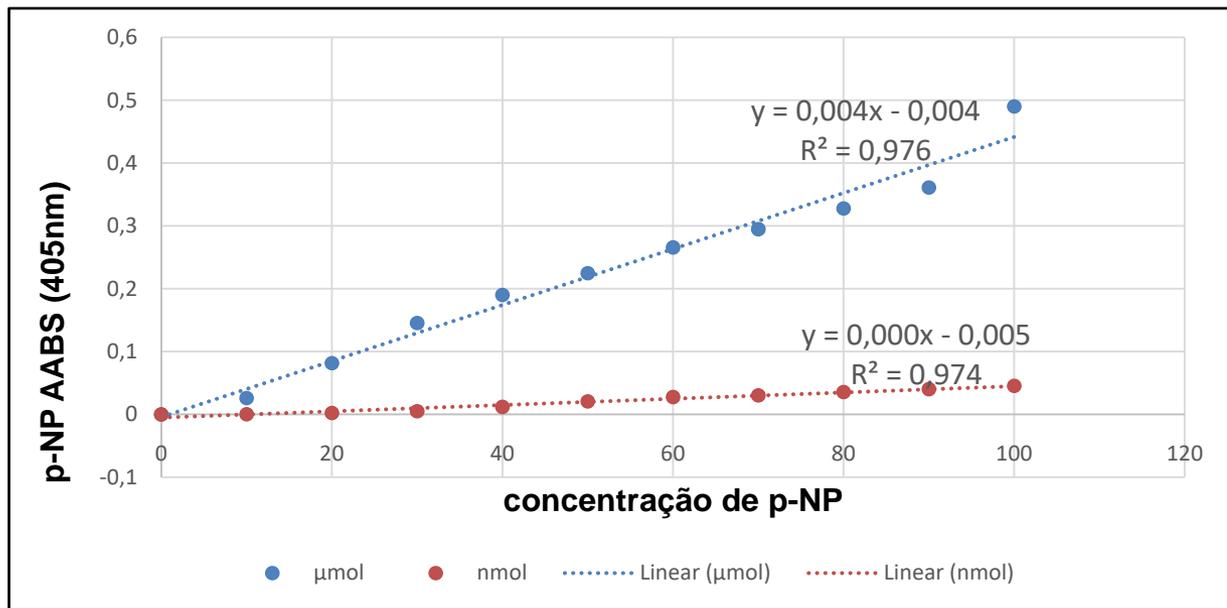
5. Transferir 100 μ L de cada tubo, para poços devidamente identificados em uma microplaca. Faça leitura da absorbância, no leitor de microplacas Locus, no tempo indicado na tabela e anote o valor na coluna 6.
6. Com os dados da coluna 6, converta os valores de absorbância em micromols de produto formado, utilizando a equação da reta da curva padrão da Figura 1 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.

2. Determinação de atividade da enzima fosfatase alcalina

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.

2. Determinação de Atividade Enzimática Fosfatase Alcalina/Acetil Esterase

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		



Tarefa: Aula 31/10/2024

Elaborar o procedimento para marcação de uma proteína recombinante

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.



Obrigado

fscha@usp.br

USP – 2º Semestre 2024