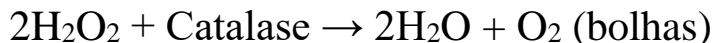




Curso de Biotecnologia
ACH5545 Engenharia Genética
Atividade Aula 06/11/2025

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. Imunodeteção de Proteínas: Transferência à membrana:

1. Após a separação das proteínas (Antígeno) presentes em gel de poliacrilamida/SDS (vide protocolo de SDS-PAGE), realizar a transferência para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente elétrica e no tempo descrito pelo fabricante do equipamento, utilizando tampão de transferência (g/L: glicina 2,9/Trizma base 5,8/metanol 20%)

(https://www.youtube.com/watch?v=7SVHqK_mFtQ).

2. Após o período, verificar pelo marcador de peso se a transferência foi efetiva na membrana e, então, corar a membrana com corante Ponceau S 0,2%, por 5 minutos, agitar a temperatura ambiente.

3. Ao visualizar a presença das bandas (proteínas) na membrana, remover o corante e lavar com água Milli-Q. Utilizar as referências do marcador para identificara massa molecular das bandas transferidas.