

BLOCO 1 – ATIVIDADE 5

FUNÇÕES DE PROTEÍNAS: ATIVIDADE ENZIMÁTICA

PROTOCOLO DE ATIVIDADE PRÁTICA

Autoria:

Jaime Paba Martinez (Departamento de Bioquímica, UFPR)

Atividade da invertase

A invertase (beta-frutofuranosidase, EC 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a hidrólise da molécula de sacarose em α -D-glucopirranose e β -D-frutofuranose (figura 1).

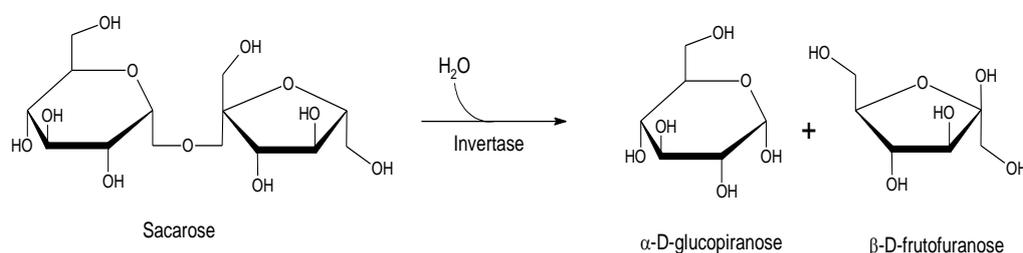


Figura 1. Hidrólise da sacarose catalisada pela enzima invertase.

Essas unidades de hexose resultantes, em meio fortemente alcalino e a quente, formam enedióis. Estes, por sua vez, podem ceder elétrons para reduzir o reagente 3,5-dinitrosalicilato (de cor amarelo forte) a 3-amino-5-nitrosalicilato (de cor laranja-marrom forte). Cada mol de açúcar redutor presente na solução formará 1 mol de 3-amino-5-nitrosalicilato (figura 2). Pela determinação da luz absorvida a 540 nm pelo 3-amino-5-nitrosalicilato, é possível determinar a concentração de açúcar redutor presente na solução. A sensibilidade da técnica de determinação de açúcar redutor pelo DNS é de 1-20 mmol de glucose.

Curva de calibração para dosagem de açúcar redutor – reação do 3,5-dinitrosalicilato (DNS)

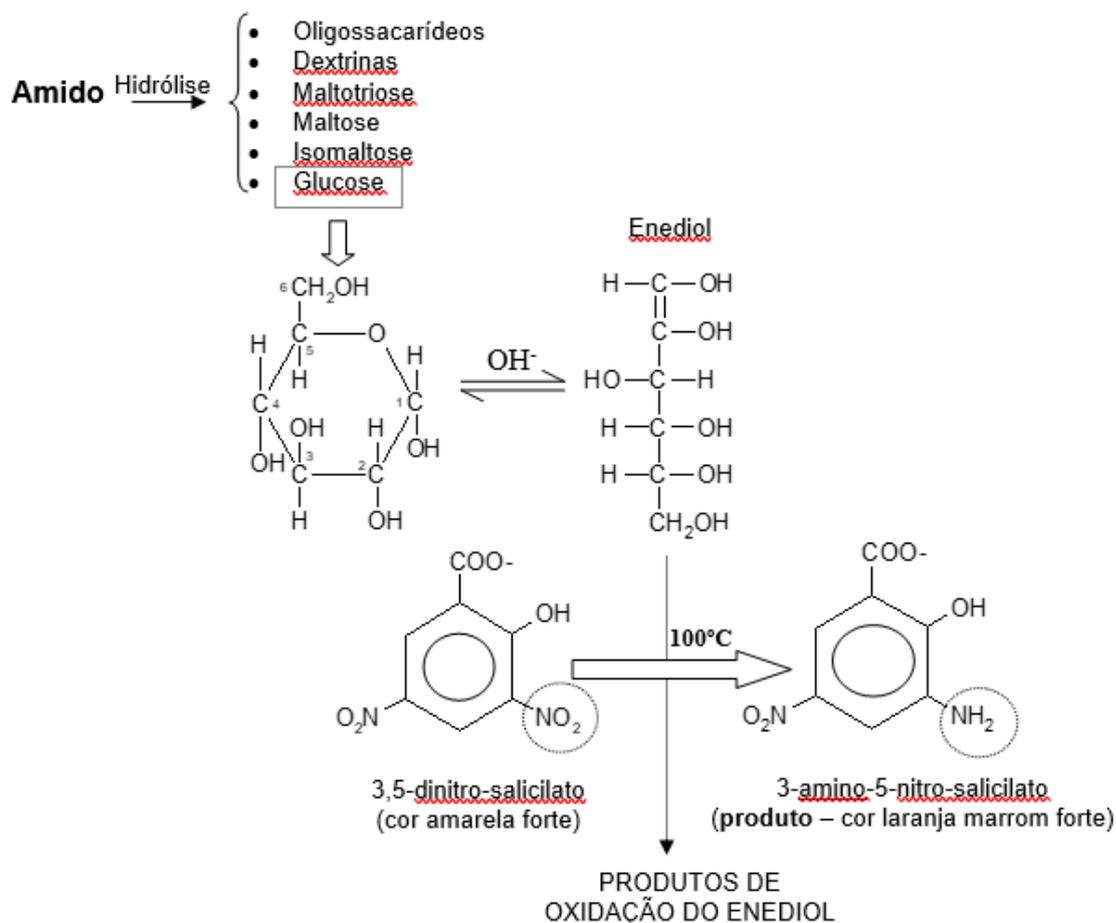


Figura 2. Reação do 3,5-di-nitro-salicilato (DNS) para evidenciar a presença de açúcares redutores.

Sensibilidade do Método: 1 a 20 μmol ou 0,2 mg a 2,0 mg.

1. Organizar uma bateria com seis tubos de ensaio;
2. Identificá-los com números de 1 a 6;
3. Adicionar os reagentes conforme a tabela:

TUBO	GLUCOSE 2 mg/mL	ÁGUA DESTILADA
1 (branco)	-	1,5 mL
2	0,1 mL (0,2 mg)	1,4 mL
3	0,2 mL (0,4 mg)	1,3 mL
4	0,4 mL (0,8 mg)	1,1 mL
5	0,8 mL (1,6 mg)	0,7 mL
6	1,0 mL (2,0 mg)	0,5 mL

4. Em cada tubo adicionar 1,0 mL do Reativo DNS;
5. Aquecer em banho-maria fervente por 5 minutos;

6. Resfriar os tubos e adicionar, a cada tubo, 7,5 mL de água destilada;
7. Ler a 540 nm e anotar as absorvâncias;
8. Traçar um gráfico colocando as concentrações na abscissa e as absorvâncias na ordenada;

* É sugerido que este ensaio seja feito antes, ou durante a aula (em paralelo) pelo próprio professor ou alguns alunos de modo a poupar tempo. Sabendo a absorvância do açúcar redutor presente podemos calcular velocidade da enzima, atividade específica por mg.

Obtenção da invertase

- Pesar 50g de levedura seca (fermento Fleischmann) e suspender em 250 mL de bicarbonato de sódio 0,15M.
- Deixar em banho maria 37°C durante 6h com agitação ocasional para induzir autólise.
- Centrifugar por 20 minutos a 3500 rpm, coletar o sobrenadante e desprezar o sedimento. O sobrenadante geralmente está de cor amarelo avermelhado
- Aliquotar e conservar em freezer. A enzima continuará ativa durante alguns meses.
- Realizando o teste (1) de concentração variável de enzima é possível determinar qual a diluição de trabalho nos outros experimentos.

Sugestão de ensaios para avaliar o efeito do pH, temperatura, tempo, concentração de substrato e concentração de enzima.

1. Efeito da variação da concentração da enzima

9. Organizar uma bateria com seis tubos de ensaio;
10. Identificá-los com números de 1 a 6;
11. Adicionar os reagentes conforme a tabela:

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6
REAGENTES (mL)	1	2	3	4	5	6
Tampão acetato (0,05 mol/L pH 4,7)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Água destilada	1,0	0,9	0,8	0,6	0,2	-
Sacarose (0,2 mol/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução de Enzima (0,05 mg/mL)	-	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0

Atenção: a enzima é sempre a última adição



12. Levar a bateria de tubos ao banho-maria a 25°C;
13. Incubar durante cinco minutos;
14. Adicionar 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato a cada um dos tubos;
15. Levar a bateria de tubos para aquecer em banho fervente durante cinco minutos;
16. Deixar resfriar por cinco minutos;
17. Adicionar 6,5 mL de água destilada a cada um dos tubos;
18. Calibrar o espectrofotômetro a 540 nm com o tubo 1;

19. Proceder a leitura das absorvâncias dos demais tubos;
20. Traçar o gráfico: Concentração de Proteína (mg/mL) (abscissa) X Absorvância (ordenada);
21. Interpretar o resultado.

2. Efeito da variação do tempo de incubação

1. Organizar uma bateria com seis tubos de ensaio;
2. Identificá-los com números de 1 a 5;
3. Adicionar os reagentes conforme a tabela:

	TUBO	TUBO	TUBO	TUBO	TUBO
REAGENTES (mL)	1	2	3	4	5
Tampão acetato (0,05 mol/L pH 4,7)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Água destilada	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8
Sacarose (0,2 mol/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução de enzima	-	0,2	0,2	0,2	0,2

Atenção: a enzima é sempre a última adição



4. Levar os tubos 3; 4 e 5 ao banho-maria a 25°C;
5. Incubá-los durante 5 min (tubo3) ; 10 min (tubo 4) e 15 min (tubo 5);
6. Adicionar 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato aos tubos 1 e 2;
7. Imediatamente após a retirada do tubo do banho, adicionar 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato;
8. Ao término da incubação do tubo 5, levar a bateria de tubos para aquecer em banho fervente durante cinco minutos;
9. Deixar resfriar por cinco minutos;
10. Adicionar 6,5 mL de água destilada a cada um dos tubos;
11. Calibrar o espectrofotômetro a 540 nm com o tubo 1;
12. Proceder a leitura das absorvâncias dos demais tubos;
13. Traçar o gráfico Tempo (min.) (abscissa) X Absorvância (ordenada);
22. Interpretar o resultado.

3. Efeito da variação do pH do tampão sobre a atividade enzimática

1. Organizar uma bateria com oito tubos de ensaio;
2. Identificá-los com números de 1 a 9;
3. Adicionar os diferentes tampões e os demais reagentes conforme a tabela:

	TUBO								
REAGENTES (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tampão pH 2,0	1,0	1,0							
Tampão pH 3,0	---	---	1,0	---	---	---	---	---	---
Tampão pH 4,0	---	---	---	1,0	---	---	---	---	---
Tampão pH 5,0	---	---	---	---	1,0	---	---	---	---

Tampão pH 6,0	---	---	---	---	---	1,0	---	---	---
Tampão pH 7,0	---	---	---	---	---	---	1,0	---	---
Tampão pH 8,0	---	---	---	---	---	---	---	1,0	---
Tampão pH 9,0	---	---	---	---	---	---	---	---	1,0
Água destilada	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Sacarose (0,2 mol/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução de enzima (0,1 mg/mL)	---	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Atenção: a enzima é sempre a última adição



- Levar a bateria de tubos ao banho-maria a 25°C;
- Incubar durante cinco minutos;
- Adicionar 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato a cada um dos tubos;
- Levar a bateria de tubos para aquecer em banho fervente por cinco minutos;
- Deixar resfriar por cinco minutos;
- Adicionar 6,5 mL de água destilada a cada um dos tubos;
- Calibrar o espectrofotômetro a 540 nm com o tubo 1;
- Proceder a leitura das absorvâncias dos demais tubos;
- Traçar o gráfico Variação do pH (abcissa) X Absorbância (ordenada);
- Interpretar o resultado.

4. Efeito da variação da concentração do substrato

- Organizar uma bateria com seis tubos de ensaio;
- Identificá-los com números de 1 a 8;
- Fazer diluições da solução de sacarose 0,2 mol/L para obter as concentrações especificadas na tabela;
- Adicionar os reagentes, variando a concentração de sacarose, conforme a tabela:

	TUBO							
REAGENTES (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampão acetato (0,05 mol/L pH 4,7)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Água destilada	1,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Sacarose 0,01 mol/L	---	1,0	---	---	---	---	---	---
Sacarose 0,02 mol/L	---	---	1,0	---	---	---	---	---
Sacarose 0,05 mol/L	---	---	---	1,0	---	---	---	---
Sacarose 0,1 mol/L	---	---	---	---	1,0	---	---	---
Sacarose 0,2 mol/L	---	---	---	---	---	1,0	---	---
Sacarose 0,3 mol/L	---	---	---	---	---	---	1,0	---
Sacarose 0,4 mol/L	---	---	---	---	---	---	---	1,0
Solução de enzima (0,1 mg/mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Atenção: a enzima é sempre a última adição



- Levar a bateria de tubos ao banho-maria a 25°C;
- Incubar durante cinco minutos;

7. Adicionar 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato a cada um dos tubos;
8. Levar a bateria de tubos para aquecer em banho fervente por cinco minutos;
9. Deixar resfriar por cinco minutos;
10. Adicionar 6,5 mL de água destilada a cada um dos tubos;
11. Calibrar o espectrofotômetro a 540 nm com o tubo 1;
12. Proceder a leitura das absorvâncias dos demais tubos;
13. Calcular a concentração final da sacarose em cada tubo;
14. Traçar o gráfico: concentração final de substrato (mmol/L) X absorvância;
15. Interpretar os resultados.

Reagentes

Reativo de 3,5 dinitrosalicilato (DNS)

Dissolver, com aquecimento, 5 g de ácido 3-5-di-nitro-salicílico em 100 mL de NaOH 2 mol/L. Separadamente, dissolver também com aquecimento 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL de água destilada. Misturar as duas soluções e completar o volume para 500 mL com água destilada.