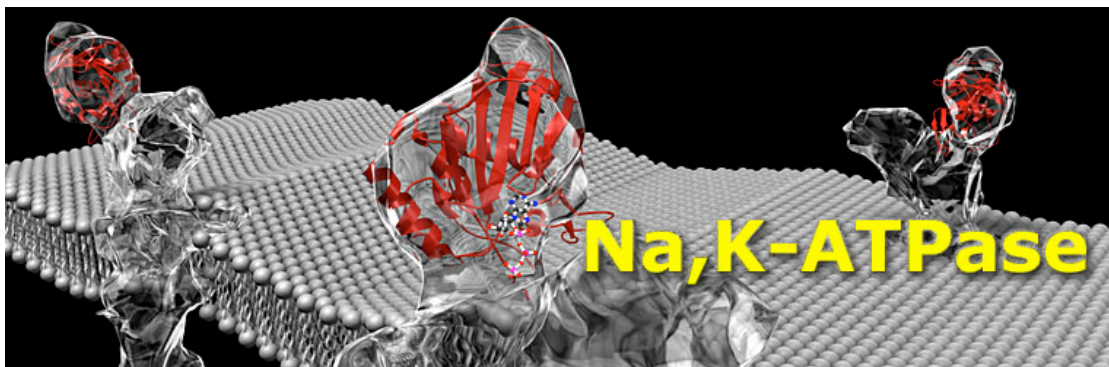




DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Biologia Celular e Molecular



2009-2010

Neste primeiro bloco de aulas práticas serão realizadas uma série de actividades que estão encadeadas, ou seja, o desenvolvimento de uma actividade depende do trabalho efectuado na aula anterior. Assim, serão efectuadas as seguintes actividades:

1. Preparação das soluções a utilizar durante as aulas
2. Fraccionamento celular
3. Determinação da concentração de proteína na amostra obtida
4. Determinação da actividade de uma enzima (Na^+/K^+ -ATPase)

Protocolos desenvolvidos e adaptados por:

Armando Cristóvão

Carlos Duarte

João Ramalho

Paulo Santos

Aula 1

Preparação de soluções

Nesta aula irá preparar algumas das soluções que irá utilizar nas próximas três aulas. Deve proceder com o máximo cuidado pois o trabalho futuro dependerá das soluções preparadas nesta aula.

Soluções a preparar:

1. Sacarose 0,32 M, HEPES 10 mM a pH 7,4 (aula do fraccionamento celular)

- a) PM sacarose=342,3
- b) volume a fazer por **grupo: 250 ml**
- c) concentração da solução stock de HEPES: 500 mM
- d) Dissolver os componentes e acertar o pH
- e) Ajustar o volume e guardar num frasco

Nota: Não necessita de fazer HEPES; NaOH 1M e HCl 1M para ajustar o pH

2. Reagente do Biureto (aula da determinação de proteína)

Nota: Fazer só **250 ml por turma** prática

- a) 0,38 gramas de CuSO_4
- b) 1,5 g tartarato de sódio potássio
- c) dissolver em aproximadamente 125 ml de água
- d) dissolver 0,25g de KI em aproximadamente 30 ml de água desionizada
- e) junte 75 ml de NaOH 10% aos dois primeiros compostos
- f) adicione o KI já dissolvido
- g) ajuste o volume para 250 ml e guarde num frasco

3. KCl 1M (aula de determinação da actividade da Na^+/K^+ -ATPases)

PM: KCl 74,5g

Volume: **100 ml por grupo**

4. NaCl 1M (aula de determinação da actividade da Na^+/K^+ -ATPases)

NaCl 58,44g

Volume: **100 ml por grupo**

5. Meio de reacção (aula de determinação da actividade da Na^+/K^+ -ATPases)

Em mM: 100 NaCl, 25 KCl, 5 MgCl_2 , 20 Tris, pH 7,4

Fazer 250 ml por grupo

Nota: Não necessita de fazer os stocks de MgCl_2 500 mM; Tris 1000 mM; e as soluções de NaOH 1M e HCl 1M para acertar o pH.

Aula 2

Fraccionamento Celular

1. Introdução

O tecido nervoso é composto por neurónios e por células da glia. Os neurónios possuem longos axónios e neurites, que interagem extensivamente entre eles e também com as células da glia. Estas células não sobrevivem durante o processo de homogeneização, os neurónios não permanecem intactos: os corpos celulares são dissociados dos prolongamentos, sendo ambos fragmentados em estruturas mais pequenas. Nas estruturas mais simples assim formadas as membranas plasmáticas conseguem resselar formando partículas osmoticamente activas. Algumas destas partículas formam-se a partir dos terminais nervosos, contendo os organelos existentes na região pré-sináptica; estas estruturas são designadas por sinaptossomas. Muitas vezes, estas estruturas podem também possuir pedaços da membrana pós-sináptica ainda associada. As preparações sinaptossomais incluem terminais nervosos axodendríticos e axossomáticos, que representam sinapses entre um axónio e uma dendrite, ou entre um axónio e um corpo celular, respectivamente.

A partir do córtex cerebral de pequenos roedores é possível obter uma preparação sinaptossomal relativamente homogénea uma vez que, no córtex cerebral existe um grande número de terminais axodendríticos uniformes, que se destacam facilmente do axónio que na célula viva é responsável pela comunicação com o corpo celular. Além disso, a contaminação por mielina pode ser facilmente eliminada através de diversas centrifugações.

O processo básico de isolamento das fracções sinaptossomais foi descrito pela primeira vez por Gray e Whittaker (1962) e por De Robertis (1962). O processo consistia na preparação de um homogeneizado de tecido, que era submetido sucessivamente a centrifugações diferenciais, seguido por uma centrifugação num gradiente preparado com soluções de sacarose com diferentes concentrações. Este processo permitia isolar os sinaptossomas, eliminando as mitocôndrias e a mielina.

2. Procedimento experimental

2.1. Preparação do tecido e homogeneização

Os sinaptossomas são isolados de córtex cerebral de ratos da estirpe Sprague-Dawley, com 8 semanas. Os cérebros são limpos, removendo as meninges, o cerebelo e o encéfalo médio. O córtex cerebral (com aproximadamente 1g/rato) é fragmentado em pequenas porções e homogeneizado numa quantidade suficiente de sacarose 0,32 M e HEPES-Na 10 mM a pH 7,4, de forma a obter um homogeneizado 10% (w/v). O homogeneizador (homogeneizador Thomas B,

com um espaço de aproximadamente 0,2 mm), deverá estar previamente refrigerado em gelo (0-4°C) e a homogeneização consiste em 10 movimentos suaves, para cima e para baixo, a uma velocidade de 500-800 rotações por minuto (rpm).

2.2. Preparação de fracções sinaptossomais

O homogeneizado de córtex cerebral de rato (H) é sujeito a sucessivas centrifugações diferenciais, de acordo com o esquema da Figura 1. O sedimento nuclear, contendo núcleos e alguns pedaços grosseiros de tecido, é obtido após uma centrifugação a 1500 x gmed numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, usando o rotor SS-34 ($r_{med}=6,98$ cm). O sobrenadante resultante (S1) é centrifugado durante 20 min a 9000 x gmed, obtendo-se no final a fracção microssomal no sobrenadante, encontrando-se no sedimento a fracção mitocondrial impura, P2. A fracção P2 é resuspensa em solução de sacarose 0,32 M, HEPES-Na 10 mM, a pH 7,4 (8 ml/2 ratos) previamente refrigerada (0-4°C) e é novamente homogeneizado num homogeneizador Thomas B. Amostras de 8 ml desta suspensão são transferidas muito cuidadosamente para um tubo transparente onde se adicionou previamente 30 ml de sacarose 0,8 M HEPES-Na 10 mM, a pH 7,4, formando um gradiente descontínuo. Estes tubos são centrifugados a 9000 x gmed, durante 30 min. Após esta centrifugação são isoladas três fracções principais: a banda A, localizada entre a solução de sacarose 0,32 M e 0,8 M, que contém predominantemente mielina e fragmentos de axónios mielinizados; a banda B é a fracção sinaptossomal que está dispersa na solução de sacarose 0,8M; o sedimento constituído essencialmente por mitocôndrias, contém também alguns sinaptossomas.

As mitocôndrias possuem uma matriz rica em proteínas e após uma exposição a soluções de sacarose mais concentradas (0,8 M), sofrem desidratação osmótica. Os sinaptossomas são estruturas seladas também sensíveis a variações osmóticas do meio, porém como são ricos em citoplasma, e contêm uma maior quantidade de água que as mitocôndrias, ficam em suspensão, enquanto que as mitocôndrias ficam no sedimento. Fragmentos de mielina, de dendrites de células da glia assim como axónios mielinizados, são leves e não resselam, motivo pelo qual permanecem em suspensão na fracção intermédia entre a sacarose 0,32 M e 0,8 M.

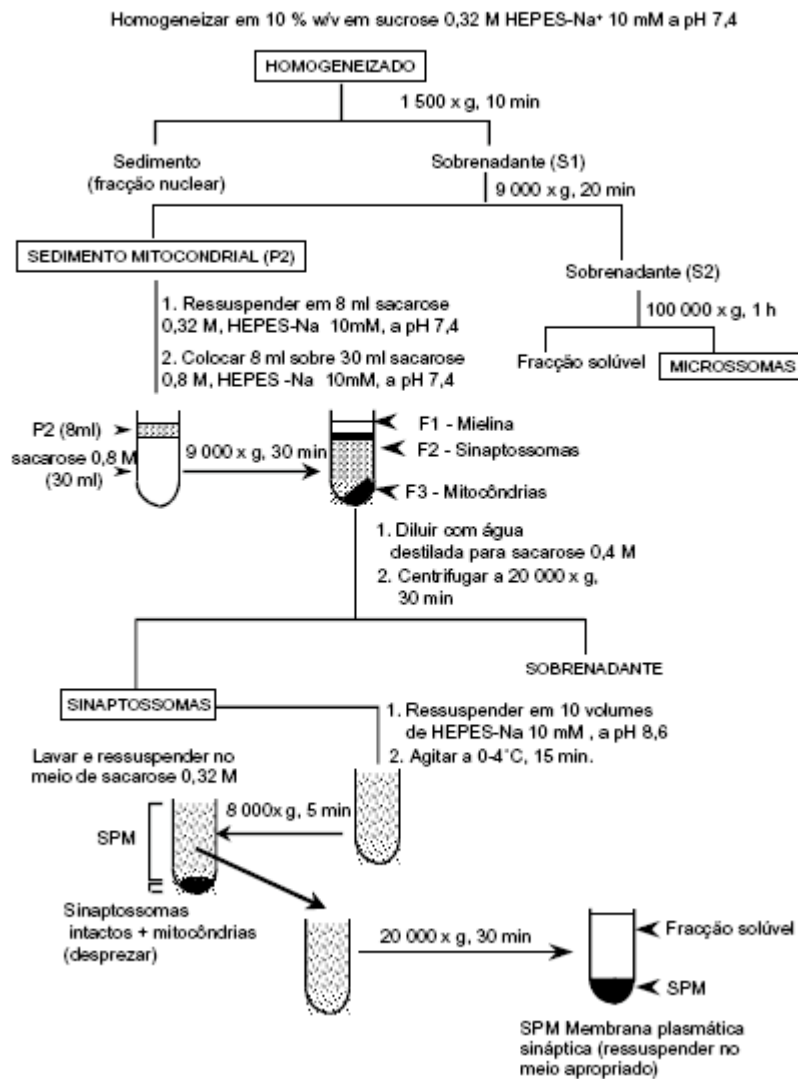


Figura 1. Representação esquemática dum procedimento para isolamento de sinaptossomas, microsomas e vesículas de membranas plasmáticas sinápticas, de cérebro de rato (Hajós, 1975).

A camada de mielina do gradiente de sacarose deve ser removida e em seguida, retiram a fracção sinaptossomal correspondente à camada de sacarose 0,8 M. depois de medir o volume correspondente à fracção sinaptossomal. Transfiram a suspensão para um copo com agitação constante e refrigerado, e a 0-4°C, dilua lentamente a suspensão com o mesmo volume de água desionizada, previamente refrigerada (0-4°C). Coloque esta fracção em tubos apropriados e centrifugue a 20000 x g med, durante 30 min. Ressuspenda o sedimento sinaptossomal em aproximadamente 1 ml de sacarose 0,32 M HEPES-Na 10 mM, a pH 7,4, usando um homogeneizador Thomas B.

Aula 3

Determinação da Concentração de Proteína Numa Amostra: O MÉTODO DO BIURETO

1. Introdução

A reacção do biureto é uma reacção muito usada para a determinação da concentração de proteína em materiais biológicos. Foi um dos primeiros ensaios colorimétricos a ser desenvolvido. A natureza do complexo colorido não é conhecida em detalhe, no entanto pensa-se que está envolvida a formação de um complexo de cobre em soluções muito alcalinas com uma ligação peptídica das proteínas e também com alguns resíduos de tirosina, formando um complexo de cor violeta. Das substâncias presentes em sistemas biológicos, as proteínas são geralmente as únicas que dão uma reacção positiva, embora existam várias substâncias que interferem com a reacção. O Cu^{2+} também é susceptível de ser reduzido. Isto pode ser detectado na prática pelo aparecimento de um precipitado vermelho na mistura de reacção.

2. Procedimento experimental

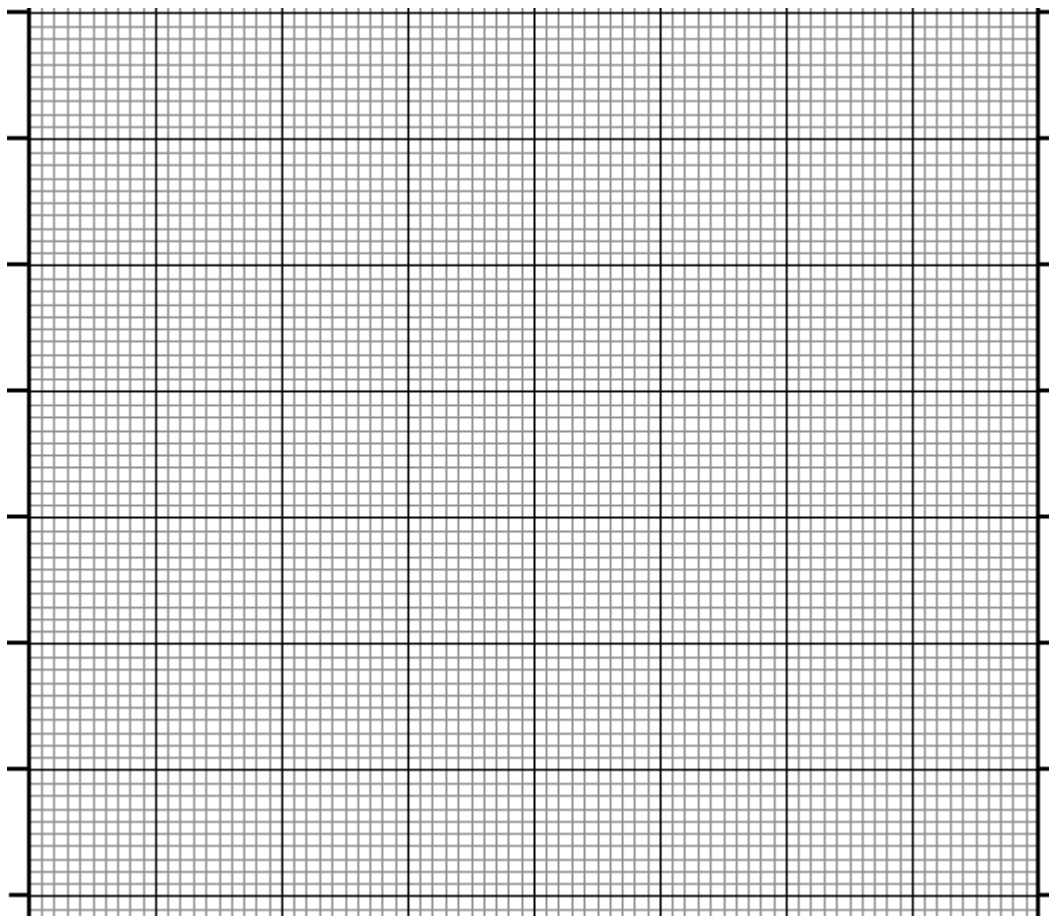
1. Ligue o espectrofotómetro de forma a ele aquecer, de acordo com o fabricante.
2. Para preparar a curva padrão numere 4 tubos de 1 a 4. Em cada um adicione os volumes de uma solução de albumina 0,4%, de acordo com a Tabela I.
3. Ajuste o volume com água de forma a perfazer 1ml de volume final.
4. Adicione o volume de detergente (SDS 10% ou DOC 10%) e de tampão, indicado na tabela I.
5. Prepare 3 tubos (fica assim com os resultados em triplicado) marcados de 5-7 para determinar a concentração da proteína na amostra (Tabela II), e adicione 50 μl da sua amostra de sinaptossomas.
6. Ajuste o volume com água de forma a perfazer 1ml de volume final.
7. Adicione o volume de detergente (SDS 10% ou DOC 10%), indicado na tabela II.
8. Adicione 4 ml de reagente de Biureto aos tubos marcados de 1-7.
9. Misturar bem os tubos (1-7) tapados com parafilme (ou no vórtex) e deixe reagir durante 10 minutos
10. Determine a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm. Isto deverá ser feito num intervalo de 1-2horas, pois a partir desta altura a absorvância decresce.
11. Faça um gráfico de Absorvância vs. mg proteína (tubos 2-5). Use a curva construída para determinar a quantidade de proteína existente na sua amostra (tubo 5-7) e faça a média.

TABELA I - Volumes de reagentes a colocar nos tubos para fazer a curva padrão.

Tubo nº	Albumina 0,4% (ml)	Água (ml)	Detergente a 10% (μ l)	Tampão da amostra (μ l)	Reagente Biureto (ml)	ABS	mg de proteína
1	0	1	50	50	4		0
2	0,25	0,75	50	50	4		
3	0,5	0,5	50	50	4		
4	1	0	50	50	4		

TABELA II - Volumes de reagentes a colocar nos tubos que contêm as amostras com uma concentração de proteína desconhecida.

Tubo nº	Amostra (μ l)	Água (ml)	Detergente a 10% (μ l)	Tampão da amostra (μ l)	Reagente Biureto (ml)	ABS	mg de proteína
5	50	0,95	50	0	4		
6	50	0,95	50	0	4		
7	50	0,95	50	0	4		



Aula 4

Determinação da actividade da Na^+/K^+ ATPase por espectrofotometria

1. Introdução

A maioria das células animais mantêm altas concentrações de potássio e baixas concentrações de sódio no seu interior, relativamente ao exterior. Esta diferença de concentrações é mantida através dum transporte activo efectuado pela Na^+/K^+ ATPase, utilizando para o efeito a energia proveniente da hidrólise do ATP para transportar Na^+ para o exterior e K^+ para o interior de acordo com o seguinte esquema:

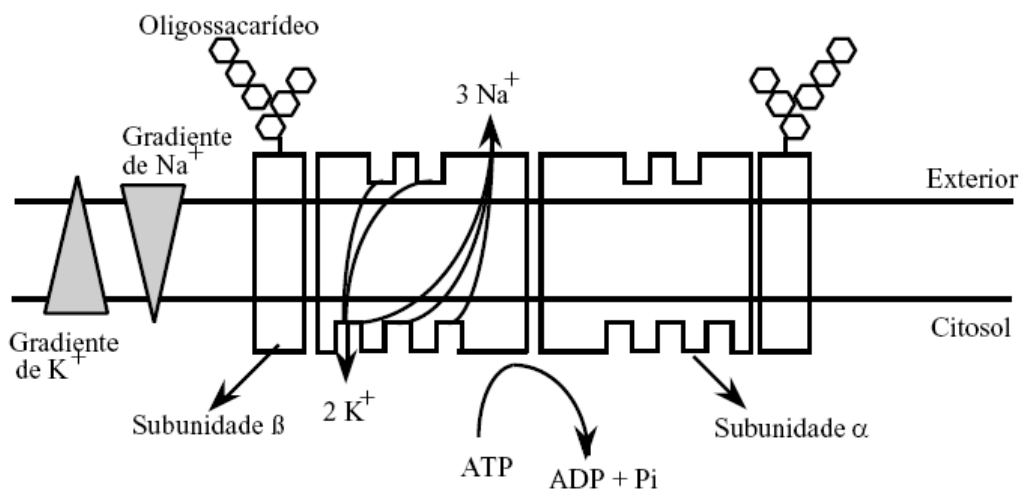


Figura 2. Representação esquemática do funcionamento da Na^+/K^+ ATPase

A Na^+/K^+ ATPase é electrogénica, uma vez que transporta 3 Na^+ para o exterior e 2 K^+ para o interior produzindo deste modo um gradiente eléctrico, em parte responsável pelo potencial de membrana, para além do gradiente químico.

Nesta aula iremos detectar a actividade da Na^+/K^+ ATPase de sinaptossomas e em membranas plasmáticas de córtex de carneiro. A actividade da enzima será observada através da análise do fosfato inorgânico resultante da hidrólise do ATP. Na presença de molibdato de amónio o P_i libertado forma um complexo de fosfomolibdato, que depois de reduzido pela acção de sulfato ferroso apresenta uma cor azul e pode ser detectada e quantificada espectrofotometricamente a 660 nm.

2. Procedimento experimental

1. Prepare os tubos indicados na tabela III. Adicione o meio de reacção, a ubaína e os sinaptossomas ou as membranas plasmáticas. No fim adicione o ATP, que iniciará a reacção.

TABELA III - Volumes de reagentes a colocar nos tubos para determinação da actividade da Na^+/K^+ ATPase

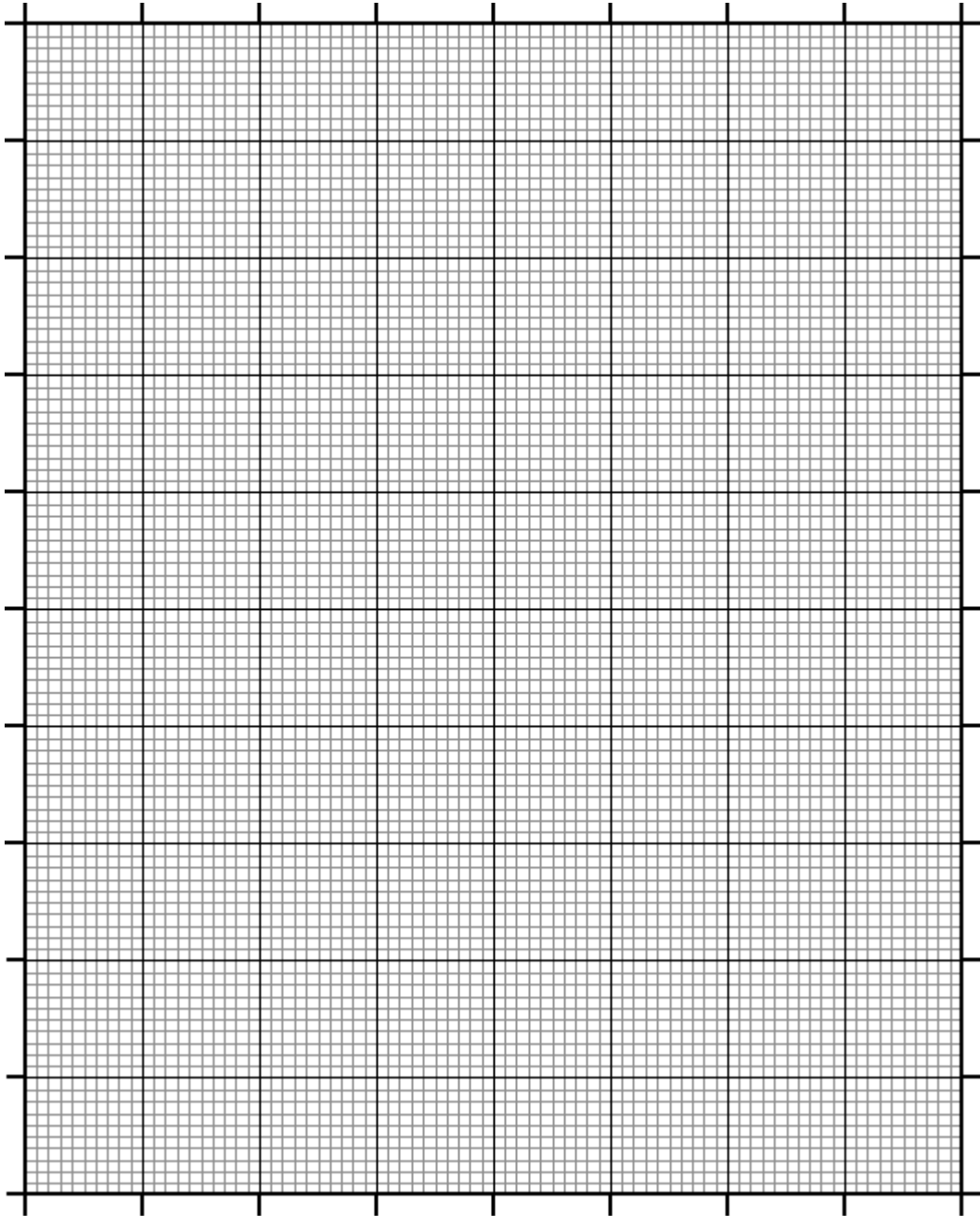
Tubo nº	Meio de reacção (ml)	Proteína (mg)	ATP (μl)	Ubaína (mM)	ABS
1	2	0,25	50	0	
2	2	0,25	50	0,5	
3	2	0,25	0	0	
4	2	0	50	0	
5	2	0,25	50	0	

- Coloque os tubos 1-4 no banho a 37°C e o tubo 5 a 4°C (no gelo).
- Deixe a reacção a decorrer 10 min.
- Enquanto espera pelo fim do período de reacção, inicie a preparação da tabela IV, pipetando a solução de KH_2PO_4 e a água. **Atenção: não pipete ainda o reagente de molibdato.**
- No final dos 10 min. de incubação adicione a cada tubo 0,5 ml de ácido tricloroacético a 40%, tape com parafilme, agite no vórtex e coloque em gelo, de modo a parar a reacção.
- Centrifugue a 3000 rpm durante 5 min. Recolha 1 ml do sobrenadante de cada um dos tubos que centrifugou para outro tubo de ensaio, marcado com o número correspondente, e adicione 1 ml de água.
- Adicione 2 ml de reagente de molibdato aos tubos que acabou de preparar e também aos tubos da tabela IV (9 tubos no total).
- Deixe reagir durante 5-10 min. e leia a absorvância a 660 nm.
- Calcule o número de nmoles de PO_4 que tem nos tubos 6-9 e construa uma curva com quantidades que relaciona a absorvância com a quantidade de Pi.

TABELA IV - Volumes de reagentes a colocar nos tubos utilizados na construção da curva padrão.

Tubo nº	KH_2PO_4 (ml)	Água (ml)	Reagente Molibdato (ml)	nmoles PO_4	ABS
6	0	2	2	0	0
7	0,25	1,75	2		
8	0,5	1,5	2		
9	1	1	2		

Calcule o Pi libertado durante a reacção, tendo em atenção as diluições efectuadas. Determine a actividade da Na^+/K^+ ATPase em nmol Pi/mg proteína/hora. Compare o resultado obtido com as diferentes preparações.



Stocks:

ATP 100 mM

Ubaína 20mM

KH_2PO_4 0,5 mM

Apêndice

A centrifugação é baseada no facto de um objecto num movimento circular, a uma velocidade angular estabilizada, ser sujeito a uma força direccionada ao exterior do eixo do movimento, **F**. A magnitude desta força depende da velocidade angular e do raio de rotação, **r**, em centímetros. **F** é frequentemente expresso relativamente à força gravitacional da Terra, e referida como força centrífuga relativa, **RCF**, ou, numa outra forma mais comum, pelo número de *g*. No entanto, para ser usada numa forma prática, esta relação deve ser expressa em termos de revoluções por minuto ou rotações por minuto, **rpm**. A forma mais comum para expressar a velocidade de operação de uma centrífuga é expressa por:

$$RCF = 11.17 \times r_{med} \frac{(r.p.m.)^2}{(1000)^2}$$

O cálculo da RCF que é exercida sobre uma amostra, a rodar num rotor numa centrífuga, localizada a uma distância fixa, *r*, do centro de rotação. Dependendo do tipo de rotor utilizado, o valor de *r* pode variar do cimo para o fundo, bastando para isso haver uma inclinação nos suportes das amostras. Assim, a força centrífuga exercida nos tubos que contêm as amostras pode variar do cimo para o fundo. Tendo em conta este aspecto, os valores de RCF são normalmente expressos como valores médios (RCF_{med}), calculados a partir da distância entre o eixo do rotor e o meio do tubo onde se encontra a amostra (r_{med}).

Referências

- Atkins, P and Jones, Loretta (1997). Chemistry: Molecules, matter and change, 3rd ed, ed W.H. Freeman New York
- Cooper T. (1977) The Tools of Biochemistry. John Wiley & Sons, New York
- Cooper, Terrance G. (1977). The tools of Biochemistry ed John Wiley and Sons, New York
- De Robertis E., De Iraldi A.P., Arnaiz G.R. and Salganicoff L. (1962) Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 9, 23-35.
- Gray E.G. and Whittaker V.P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron microscopic study of cell fragments derived from homogenization and centrifugation. *J. Anay. (Lond.)* 96, 79-88.
- Hajós F. (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.
- Layne E. (1957). *Methods in Enzymology* (Colowick S.P. and Kaplan N. O., Eds). Academic Press, New York, **Vol. 3**, 447-441