Aula de enzimologia

Tema

Purificação de proteínas

Dra. Adriane M. F. Milagres

adriane@debiq.eel.usp.br

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O processo de isolamento de uma proteína envolve diversas etapas que vão desde a produção até a obtenção de um extrato que finalmente será submetido à purificação

Dependendo do objetivo final do estudo, o processo de purificação pode ser parcial (semi-purificação) ou completo

PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS E SEU EFEITO NO DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO

1. Tamanho – Massa – Densidade
2. Carga elétrica
3. Solubilidade ou hidrofobicidade

Métodos baseados em afinidade biológica, que exploram a interação entre duas moléculas:

4. Cromatografia de afinidade (pressupõe que uma das moléculas do par que interage é um “reagente” de fácil obtenção,disponível comercialmente)

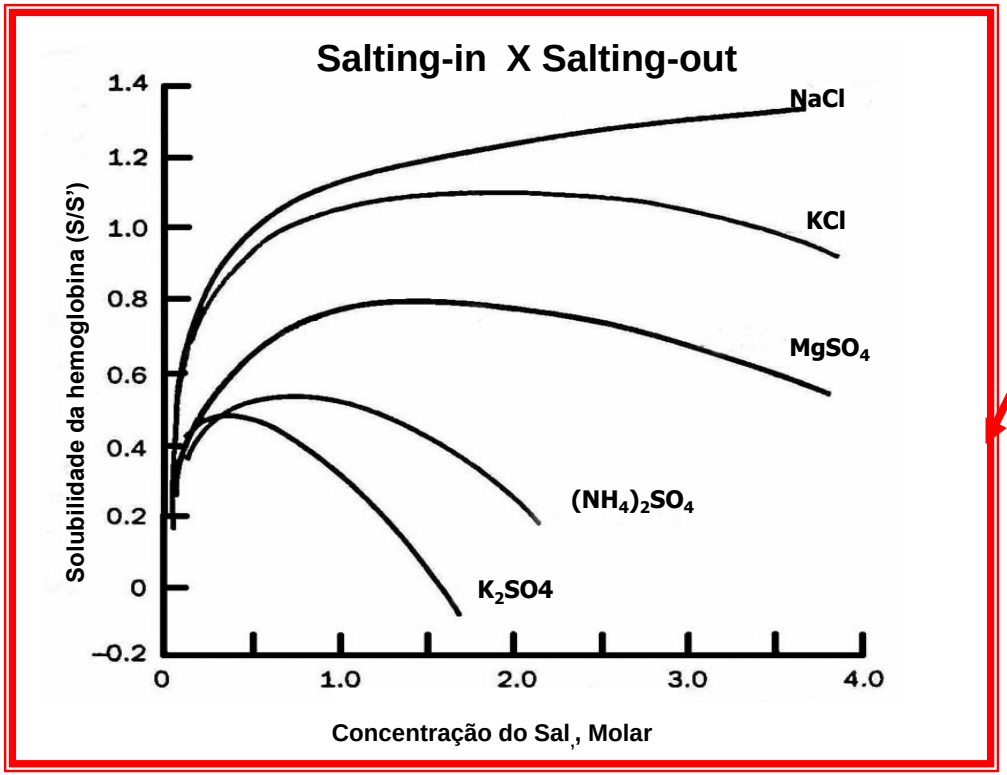
MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

MÉTODO	PRINCÍPIO	COMENTÁRIO
Precipitação por força iônica "salting out", com sais inorgânicas (Sulfato de amônio)	Diminuição da solubilidade das proteínas, alteração da solvatação	Inclui etapas sucessivas de precipitação e centrifugação (elevadas velocidades)
Precipitação por solventes orgânicos (Acetona, TCA)	Incremento nas forças de atração entre as proteínas	Rendimento pode ser baixo, caso nao sejam mantidas temperaturas muito baixas (-10^{o}C)
Liofilização	Congelamento seguido de sublimação a alto vácuo	Método muito utilizado com amostras biológicas que podem ser inativadas em altas T^{a}. Amostras devem ter baixos conteúdos de sáis
Ultrafiltração	Remoção de pequenas partículas sob pressão através de membranas de cortes específicos	Método rápido, que além de concentrar permite separar frações de diferente MM

PRECIPITAÇÃO

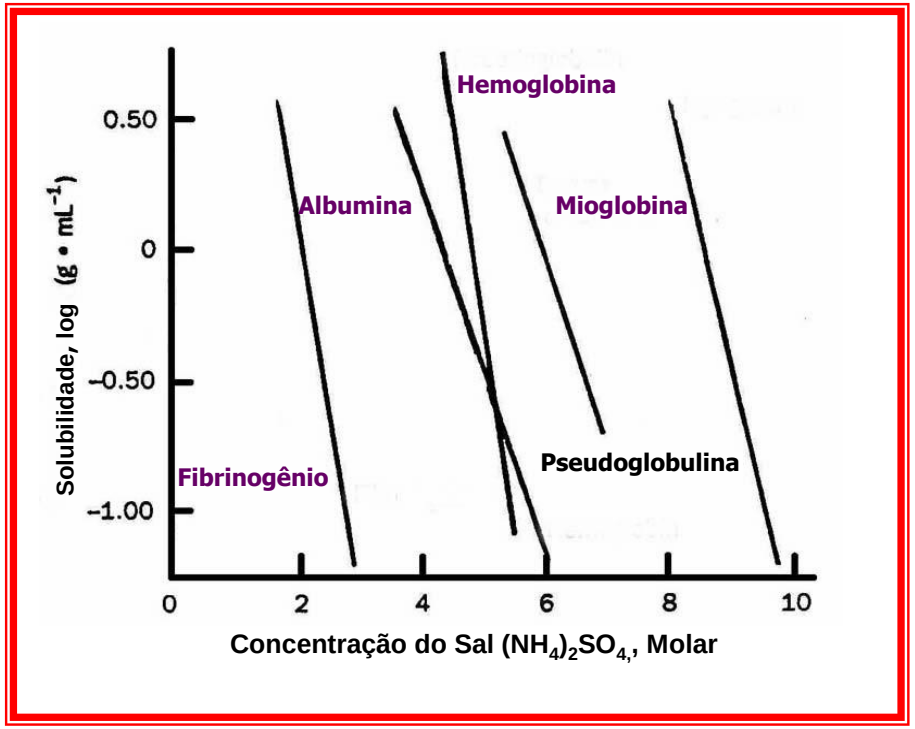
A precipitação de proteínas pode ser induzida por:

- adição de sais (Precipitação salina)
- adição de solventes
- variação de pH (Precipitação isoelétrica)



O gráfico ao lado ilustra o efeito de diferentes sais sobre a solubilidade da hemoglobina.

Sais se dissociam em solucão aquosa e competem com as proteínas pela água de solvatação.



Proteínas apresentam diferente sensibilidade para a precipitação salina.

solubilidade do sulfato de amônio a 0ºC é 706 g/1000 g água

- precipitam primeiro:
  - proteínas maiores
  - proteínas mais hidrofóbicas

possuem camadas de solvatação maiores ou menos organizadas, mais fáceis de pertubar.

Precipitação com solvente orgânico

Acetona, etanol, metanol, n-propanol, dioxano, etc.

•Tamanho da molécula
• pI

Solvente	Constante Dielétrica	Momento Dipolar
Água	78.5	1.85
Dimetilformamida	48.9	3.96
Metanol	32.6	1.66
Etanol	24.3	1.68
Acetona	20.7	2.72
Clorofórmio	4.8	1.15
Benzeno	2.3	0.00

Solventes miscíveis com a água diminuem a constante dielétrica do meio e desorganizam a camada de solvatação das proteínas.

enzima	microrganismo	solvente	Recuperação (%)	Fator de Purificação	Referencia
Alfa-amilase	*Bacillus subtillis*	Acetona	90	5,4	El-Hellow e El-Gazaerly, 1996
		Metanol	62	5,4	
		etanol	83	5,2	
xilanase	*Trichoderma harzianum* E-58	acetona	55	-	Tan et al, 1987
	Aspergillus terreus	acetona	17	3,7	Rogalsky et al. 1983

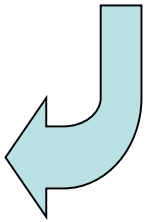
$$\% \text{ etanol} = \frac{V_{etanol} \times 100}{V_{tampao} + V_{amostra} + V_{etanol}} \ldots\ldots\ldots\ldots$$

Proteínas também podem ser precipitadas com adição de solventes ao meio ou quando colocadas em meio com pH próximo ao seu ponto isoelétrico.

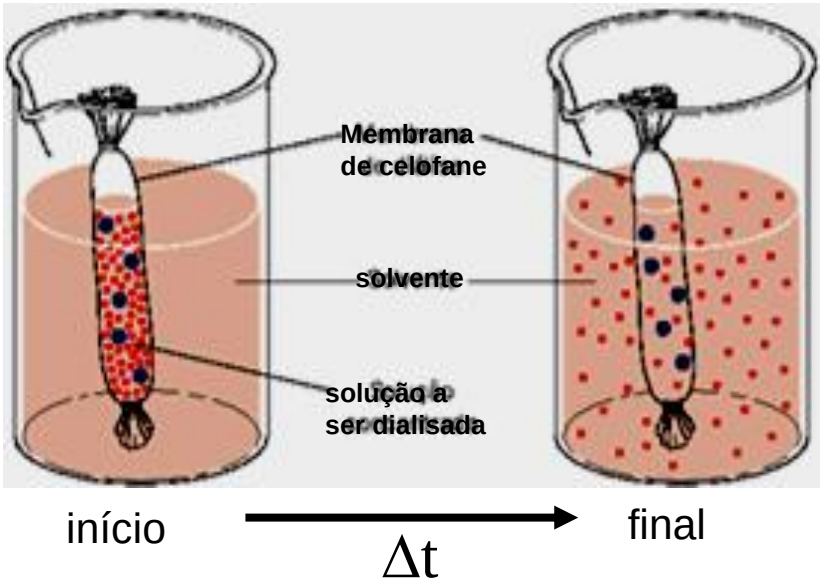
Proteína	P.I.
Pepsina	<1,0
Ovalbumina galinha	4,6
Albumina sérica humana	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina bovina	5,4
Fibrinogênio humano	5,8
Gama-globulina	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina equina	7,0
Hemoglobina humana	7,1
Ribonuclease A bovina	7,8
Citocromo C equino	10,6
Histona bovina	10,8
Lisozima, galinha	11,0
Salmina, salmão	12,1

Ponto Isoelétrico de algumas Proteínas

Proteínas colocadas em meio com pH igual ao seu PI tendem a precipitar, pois tendo carga neutra, apresentam a camada de solvatação menos organizada.



Para obter as proteínas precipitadas em solução novamente, é necessário reverter as condições que levaram à precipitação.



Aos precipitados obtidos com sal ou solvente, adiciona-se água.

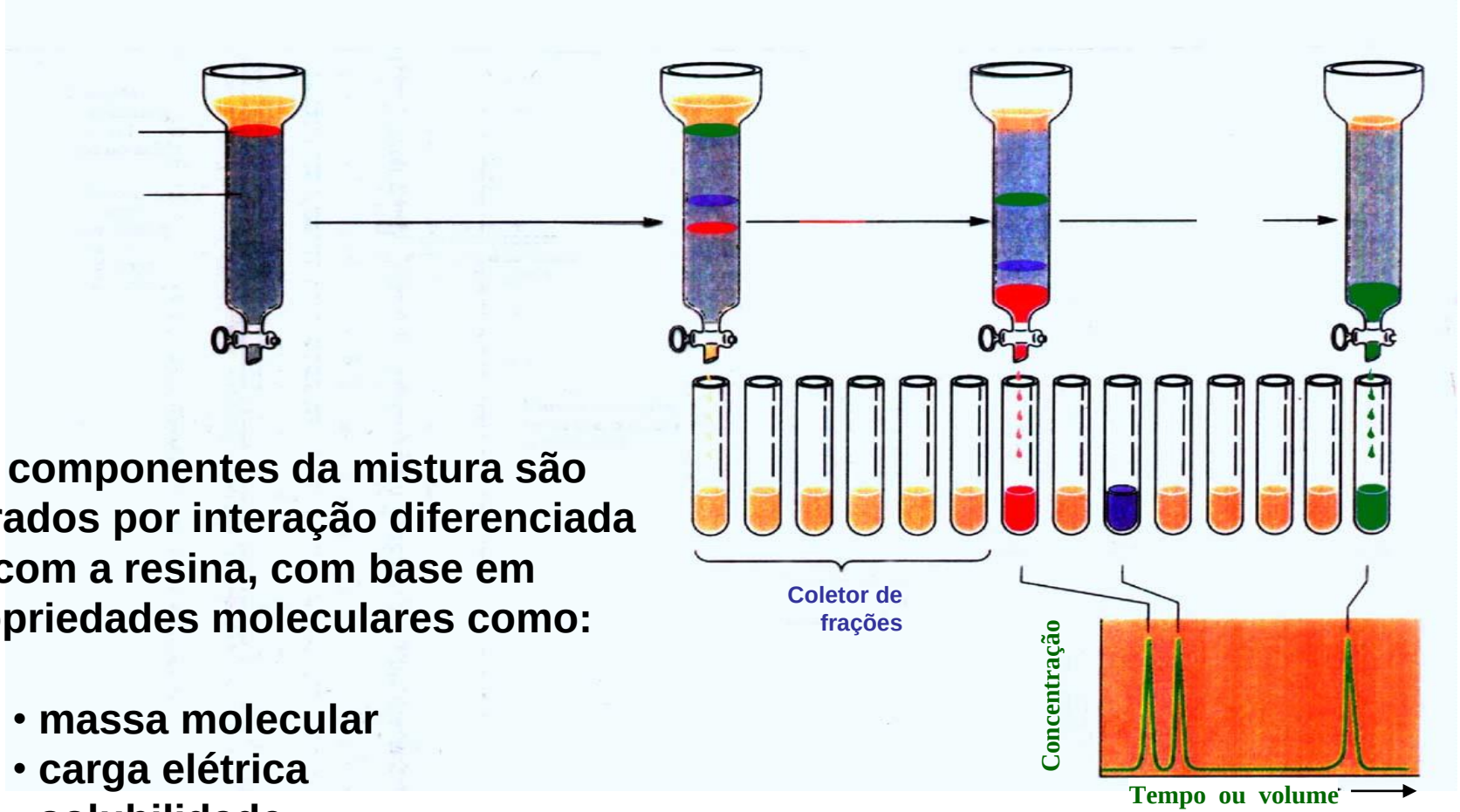
Ao precipitado obtido com variação de pH, retornar ao pH original.

Para remover o excesso de sal ou do solvente no precipitado, utiliza-se a diálise.

PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

TIPO	PRINCIPIO
EXCLUSÃO MOLECULAR OU FILTRAÇÃO EM GEL	Separação física das proteínas em função do **tamanho** molecular Técnica permite determinar Massa Molar das proteínas estudadas
TROCA IÔNICA	Separação das proteínas em função da sua **carga**. Através de interações eletrostáticas as proteínas se ligam em forma reversível a um suporte cargado
INTERAÇÃO HIDROFÓBICA	Separação de proteínas em função da interação entre **aminoácidos apolares** de uma proteína e uma matriz de carácter hidrofóbico
AFINIDADE	Separação de proteínas em função das propriedades de **afinidade** da proteína de interesse por um ligante específico unido à fase estacionária da coluna

FUNCIONAMENTO BÁSICO DE UMA COLUNA CROMATOGRÁFICA



Os componentes da mistura são separados por interação diferenciada com a resina, com base em propriedades moleculares como:

- **massa molecular**
- **carga elétrica**
- **solubilidade**
- **afinidade**

CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL

PROPRIEDADES IMPORTANTES

Limite de Exclusão

Moléculas pequenas não podem difundir no interior do gel

Moléculas > ao limite eluiram rapidamente do gel

Ex: *Sephadex G-50*

Limite de exclusao = 30.000

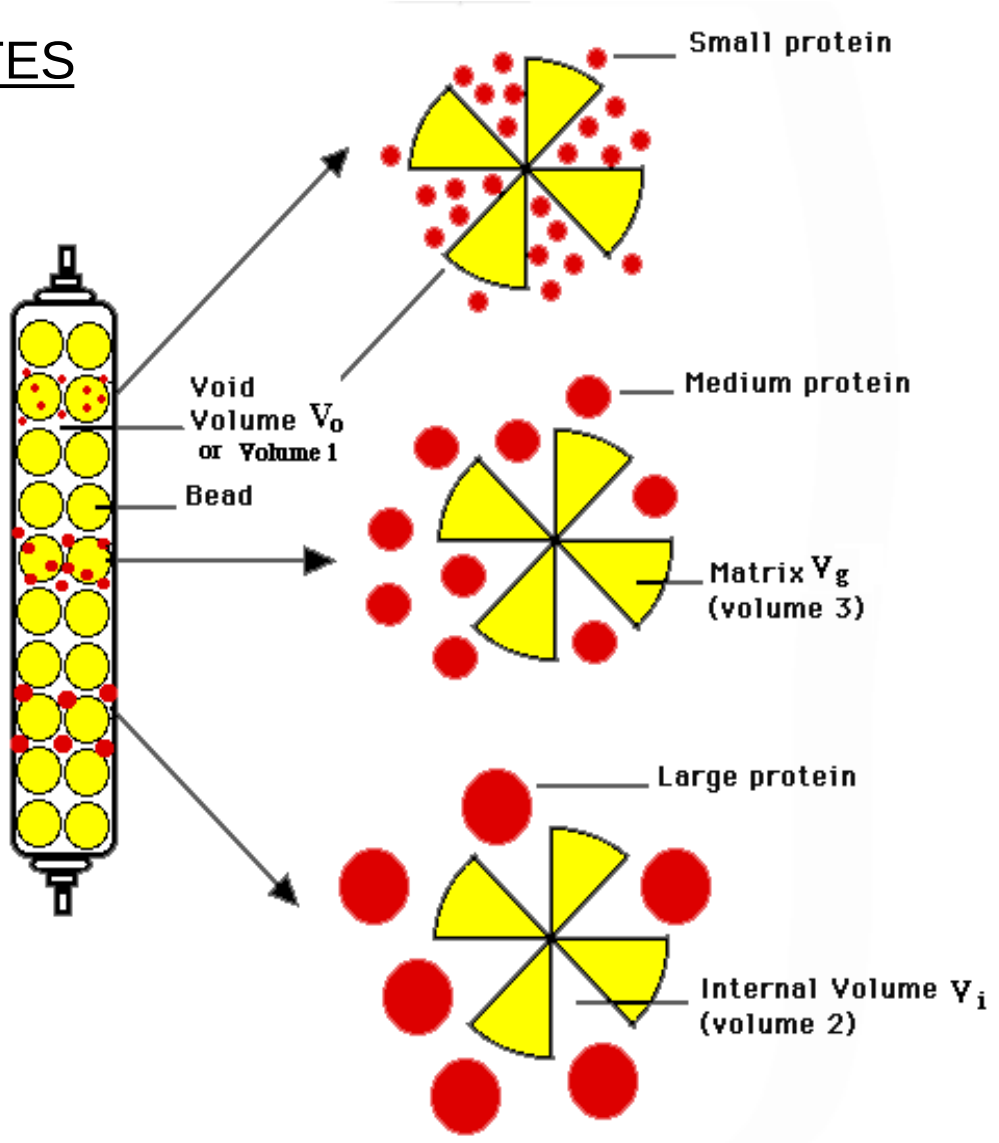
Moléculas com MM > 30.000 eluiram diretamente sem entrar nas partículas do gel

Faixa de Separação

Sephadex G-50

faixa de : 1.500-30.000

Moléculas dentro dessa faixa serão separadas neste gel



Volume de Vazio

Espaço total que rodeia as partículas do gel na coluna empacotada que é determinado através do volume de solvente requerido para eluir um soluto que é completamente excluído da Coluna

Ex.: Blue Dextran (MM= 2.000.000)

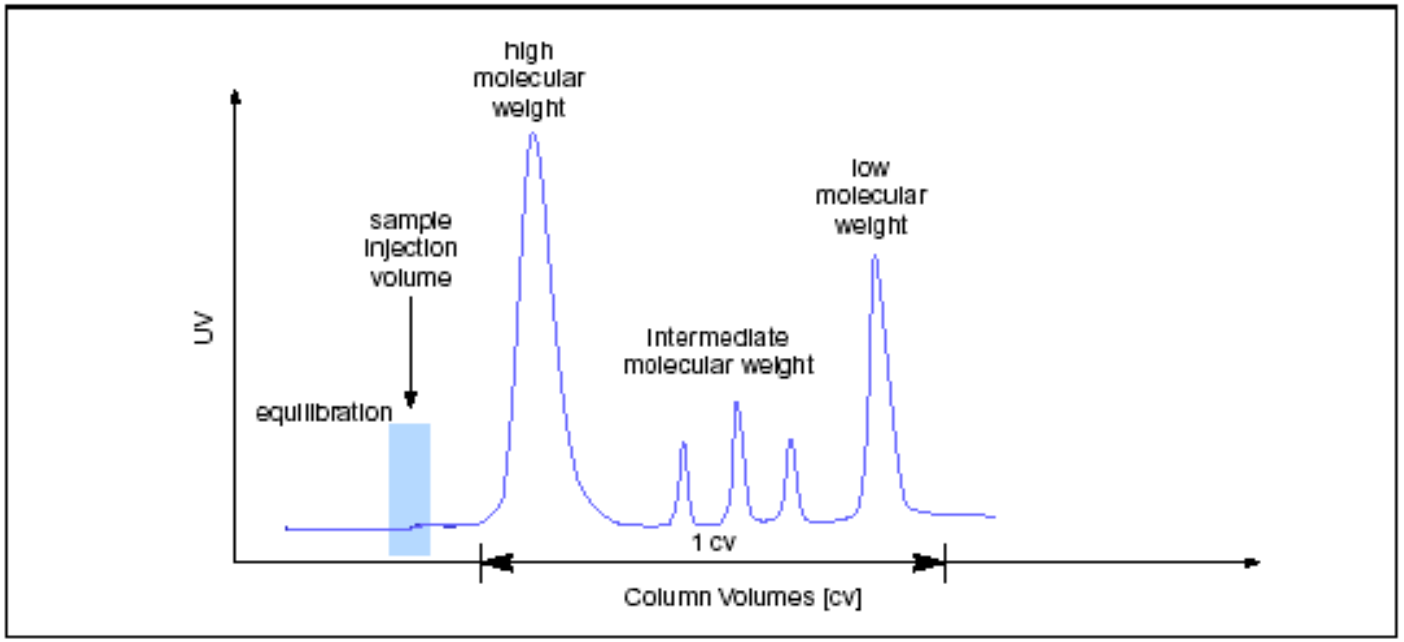
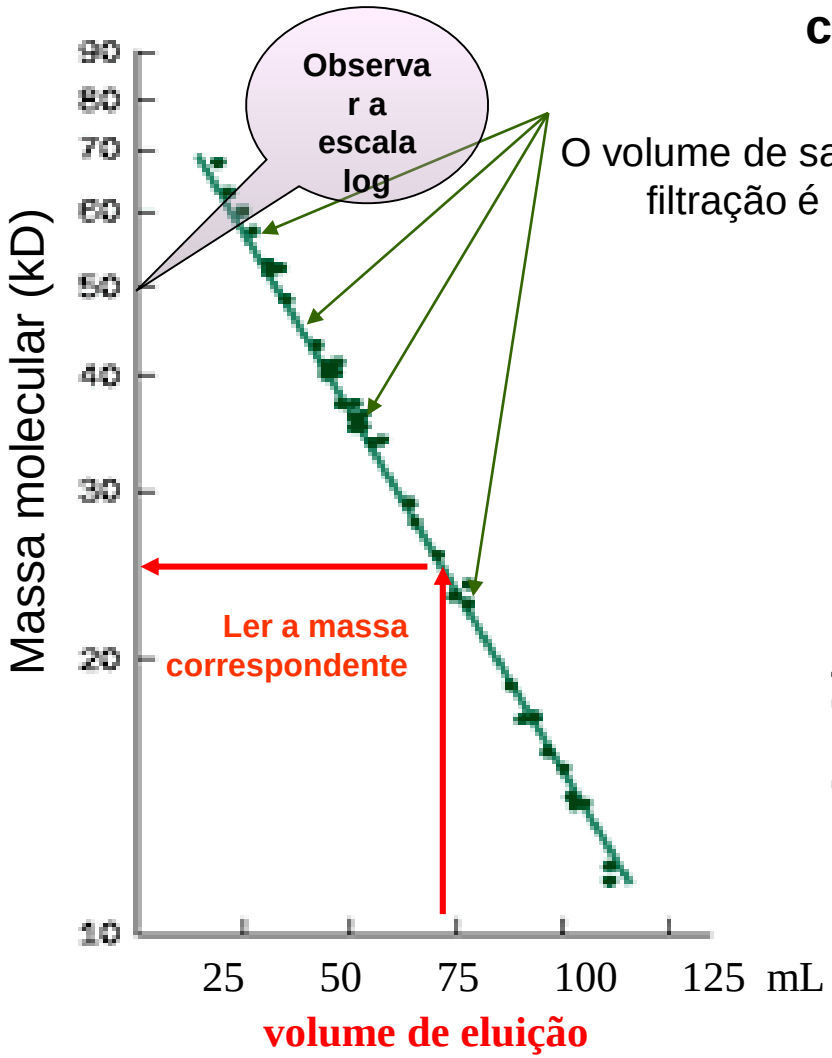


Fig. 41. Typical GF elution.

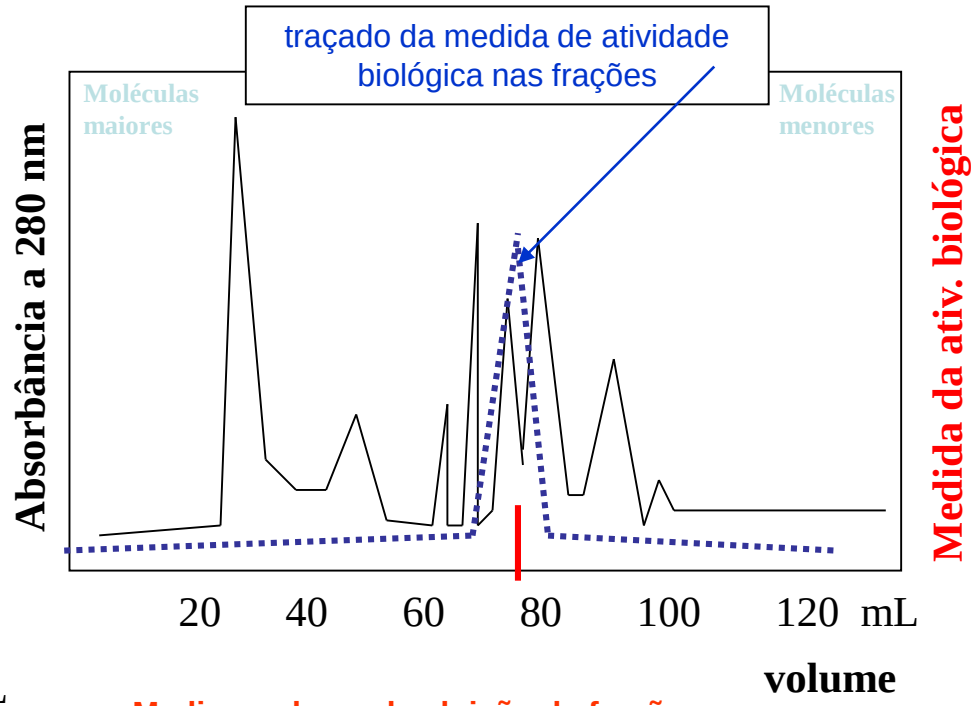
A cromatografia de gel-filtração possibilita estimar a massa molecular de uma proteína em seu estado nativo

Para isso, é necessário "calibrar" a coluna com proteínas de massa molecular conhecida, construindo-se uma curva de calibração.

Curva de calibração



O volume de saída (eluição) de uma proteína numa coluna de gel-filtração é proporcional ao logaritmo de sua massa molecular.



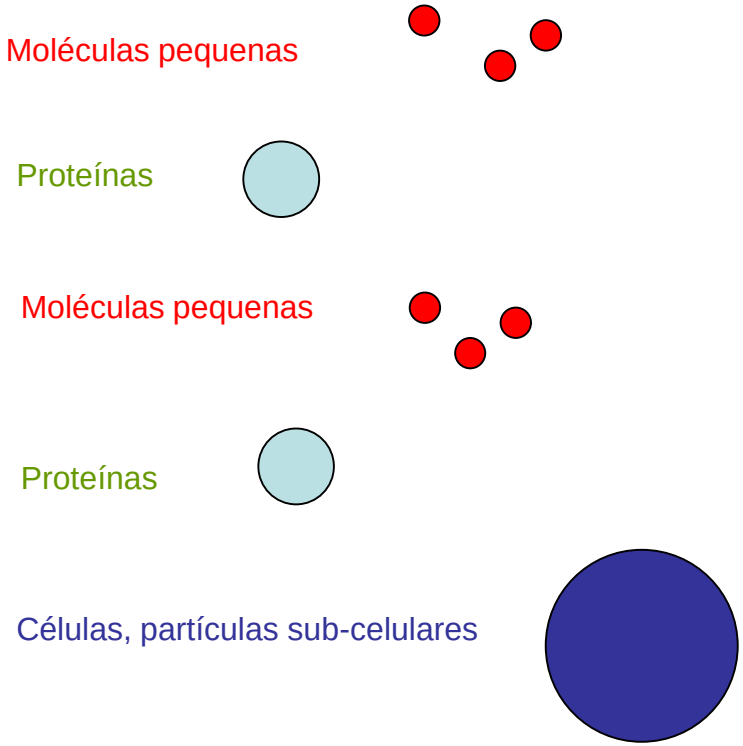
Medir o volume de eluição da fração mais ativa. Transportar para a curva de calibraçao.

Existem diferentes tipos de resinas para gel-filtração, conforme o tipo de moléculas ou partículas a serem separadas

Resinas para Gel-Filtração

NOME	TIPO	FAIXA DE RESOLUÇÃO (kD)
Sephadex G-10	Dextrana	0.05 - 0.70
Sephadex G-25	Dextrana	1 - 5
Sephadex G-50	Dextrana	1 - 30
Sephadex G-100	Dextrana	4 - 150
Sephadex G-200	Dextrana	5 - 600
Bio-Gel P- 2	Policrilamida	0.1 - 1.8
Bio-Gel P- 6	Policrilamida	1 - 6
Bio-Gel P- 10	Policrilamida	1.5 - 20
Bio-Gel P- 30	Policrilamida	2.4 - 40
Bio-Gel P-100	Policrilamida	5 - 100
Bio-Gel P-300	Policrilamida	60 - 400
Sepharose 6B	Agarose	10 - 4.000
Sepharose 4B	Agarose	60 - 20.000
Sepharose 2B	Agarose	70 - 40.000

indica quais os tamanhos das partículas que podem entrar nos poros da resina e serem fracionados. Acima ou abaixo da faixa, não há separação.



*Sephadex e Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech; Bio -Gel: Bio-Rad Laboratories

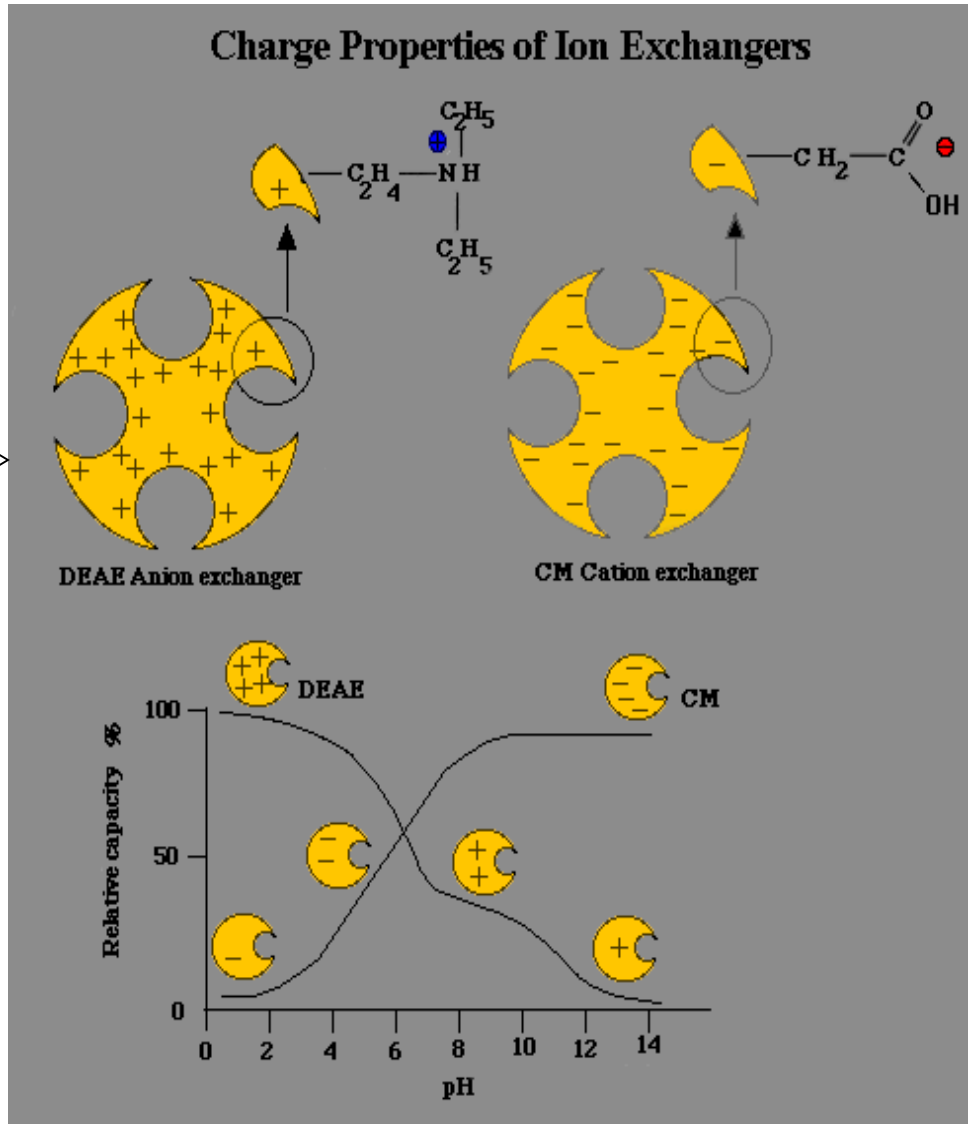
CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

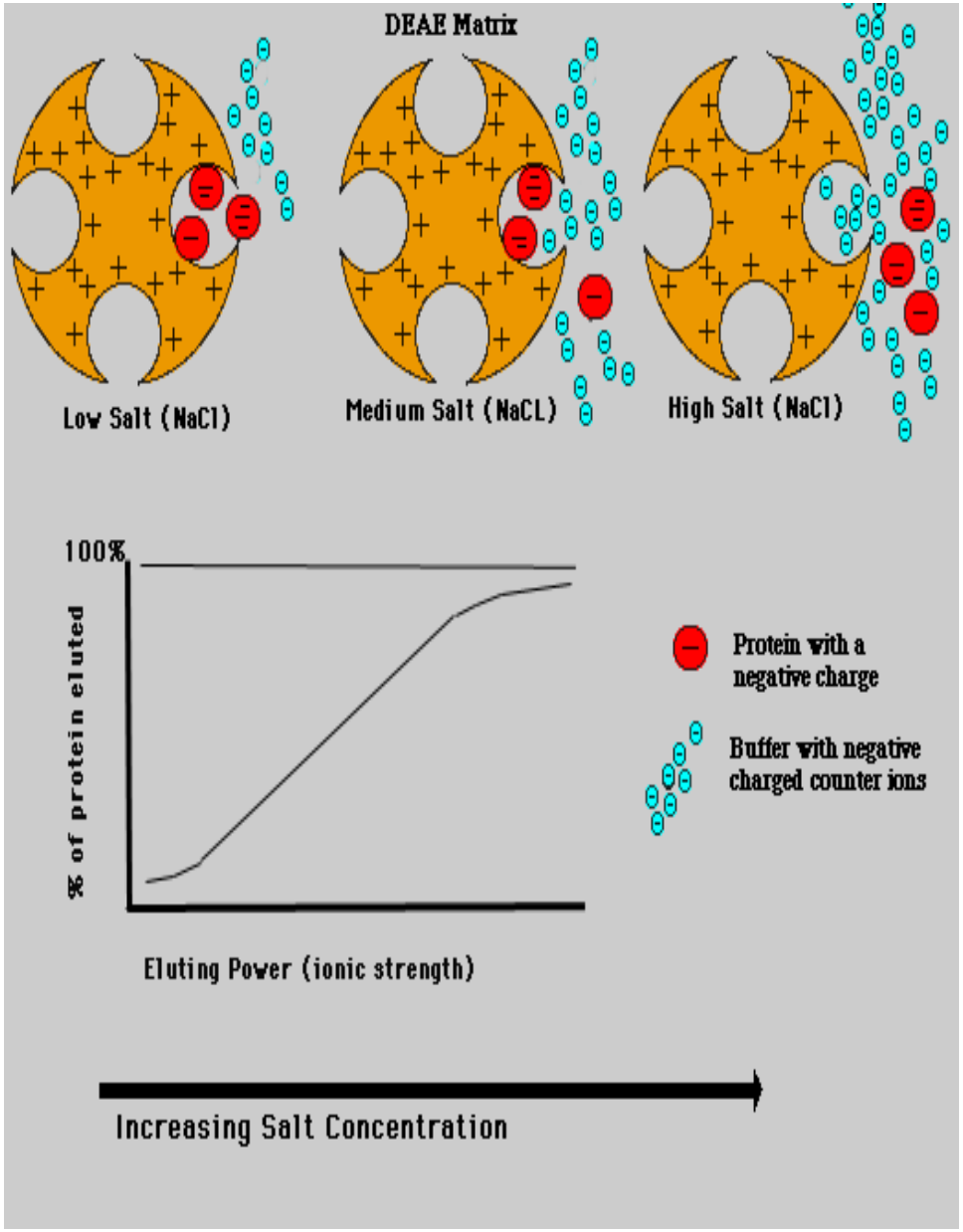
PROPRIEDADES

- As colunas de troca iônica podem apresentar carga (+) ou (-) segundo o grupo funcional ligado à matriz da coluna
DEAE-Celulose : dietilaminoetil
CM-Celulose : carboximetil

- Resina aniônica (+) : troca anions
- Resina cationica (-) : troca cátions
- Resinas trocadoras podem ser fortes ou fracas

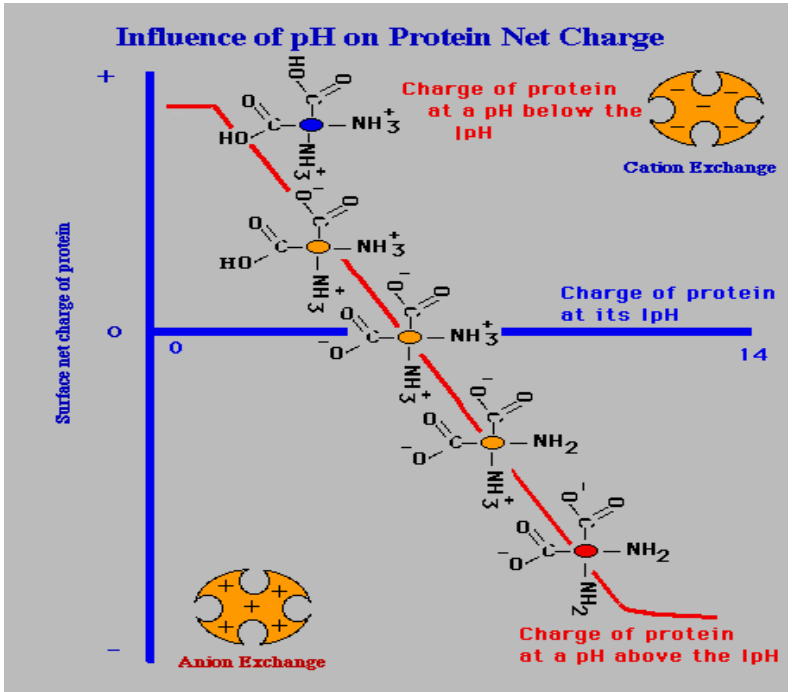
- Proteína ligada reversivelmente na resina pode ser eluida da coluna por aumento da força ionica ou mudanças no pH





- Método de eluição mais utilizado é o gradiente de NaCl
Logo da eluição a proteína de interesse encontra-se purificada e concentrada

- Para escolher o tipo de resina, anionica ou cationica, deve se considerar o pI da proteína de interesse



- Para proteínas com um pI inferior a 7 ou desconhecido recomenda-se a utilizaçao de um trocador aniônico forte

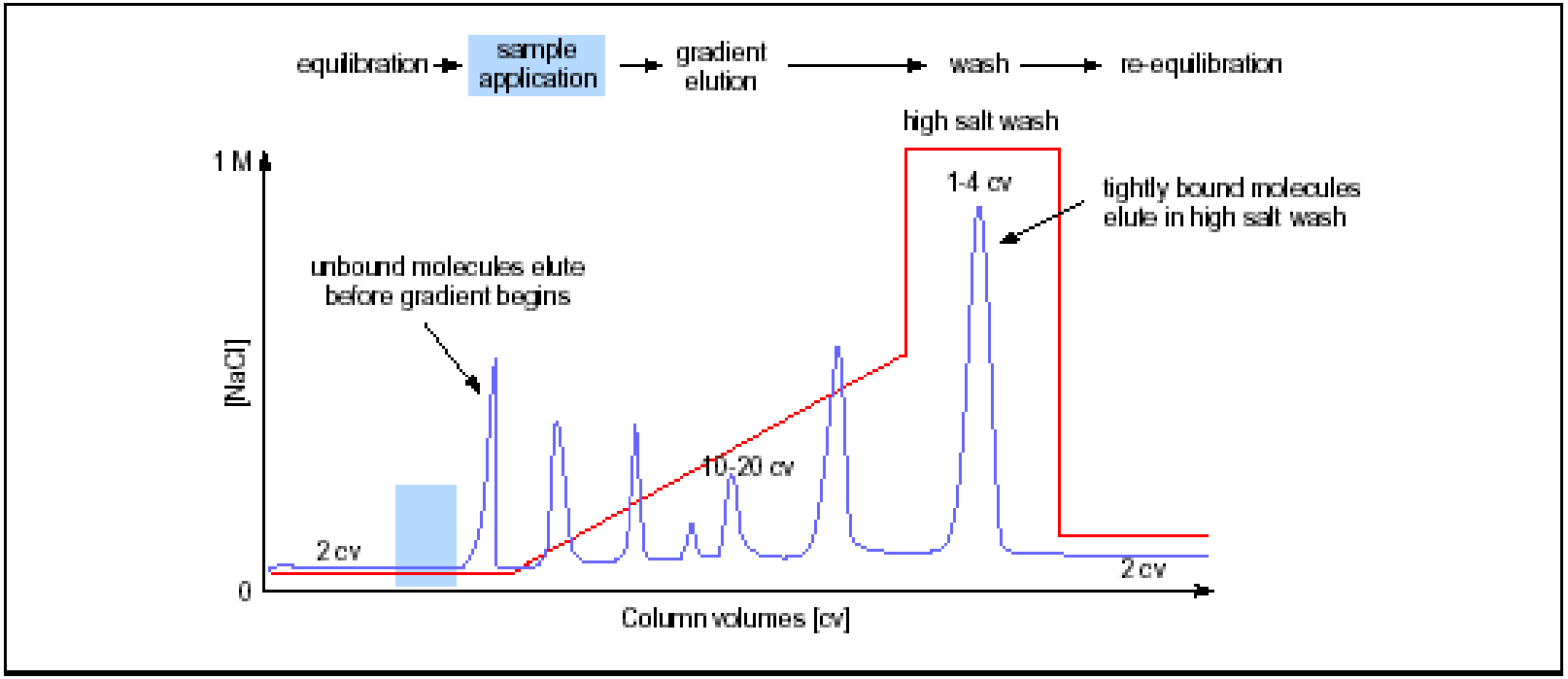


Fig. 31. Typical IEX gradient elution.

Tipos de Resina de troca Iônica

NOME	TIPO	GRUPO IONIZÁVEL	OBSERVAÇÕES
Dowex 1	Fortemente básica resina de polistireno	Ø - $CH_2N^+(CH_3)_3$	Troca aniônica
Dowex 50	Fortemente básica resina de polistireno	Ø - SO_3^-H	Troca Catiônica
DEAE-celulose	Básica	Dietilaminoetil - $CH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2$	Fracionamento de proteínas ácidas e neutras
CM-celulose	Ácida	Carboximetil - CH_2COOH	Fracionamento de proteínas básicas e neutras
DEAE -Sephadex	Gel de dextrano básico	Dietilaminoetil - $CH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2$	Combinação de gel filtração e troca iônica de proteínas ácidas e neutras
CM - Sephadex	Gel de dextrano ácido	Carboximetil - CH_2COOH	Combinação de gel filtração e troca iônica de proteínas básicas e neutras

* Dowex: Dow Chemical Co.; Sephadex: Amersham Pharmacia Biotech; Bio Gel: Bio Rad Laboratories

Existem vários tipos de resinas de troca iônica disponíveis no mercado.

Cromatografia de interação hidrofóbica

É um processo de partição que explora a interação entre **aminoácidos apolares** de uma proteína e uma matriz de carácter hidrofóbico.

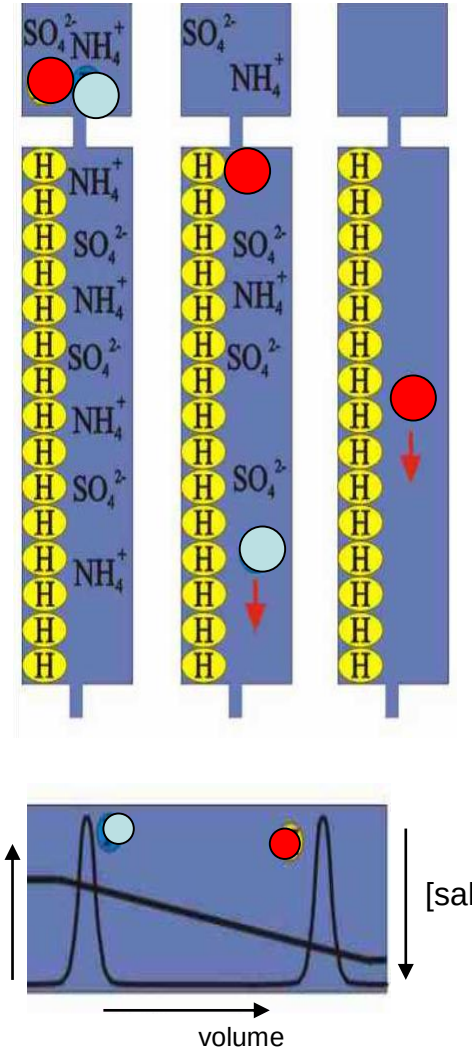
Proteínas em solução salina concentrada "perdem" parte da camada de solvatação para os sais, expondo na superfície regiões ricas em aminoácidos apolares, que interagem com uma matriz hidrofóbica

Três estratégias para eluição:

1. diminuir a concentração de sal
2. diminuir a polaridade da fase móvel
3. adicionar detergente

Força da interação hidrofóbica aumenta com o tamanho da cadeia de C na resina:

Fenil (C6-OH) > Butil (C4) > Octil (C8)

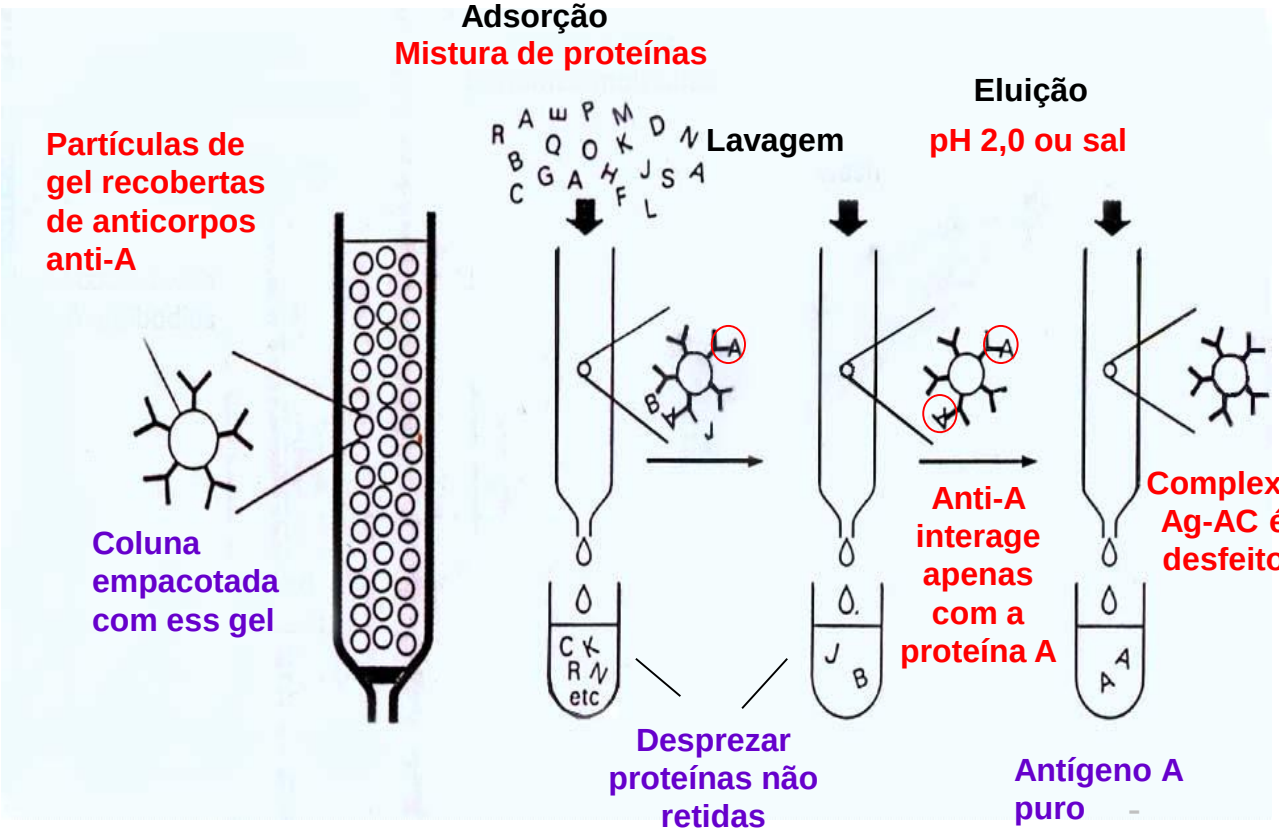


Eficiência dos sais em provocar "salting-out" varia com a série de Hofmeister:

Ânions: $PO4^{-2}$> $SO4^{-3}$>$CH3COO^-$>Cl^->Br^->$NO3^-$>$ClO4^-$>I^->SCN^-
Cátions:$NH4^+$>Rb^+>K^+>Na^+>Cs^+>Li^+>Mg^+>Ca^+>Ba^+

Cromatografia de afinidade:

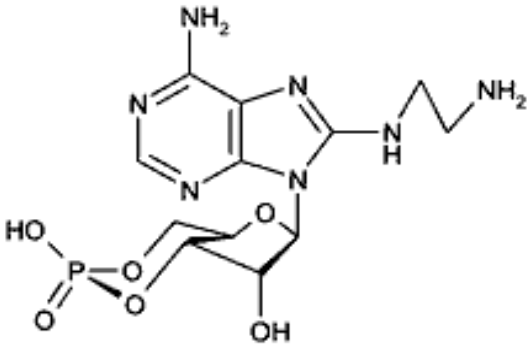
Ex: cromatografia de imunoafinidade



Eluição: condições que interferem na ligação da proteína ao ligante, como mudanças no pH e/ou força iônica, ou por competição com o ligante livre

Tipo de ligantes em cromatografia de afinidade

1. Mono-específicos - ligação específica da molécula-alvo
   - análogos de substratos ou inibidores de enzimas
   - agonistas ou antagonistas de receptores
   - haptenos ou determinantes antigênicos de anticorpos
   - ligantes com “tag” ou “marcação”
     - glutationa-S-transferase
     - poli-Histidina

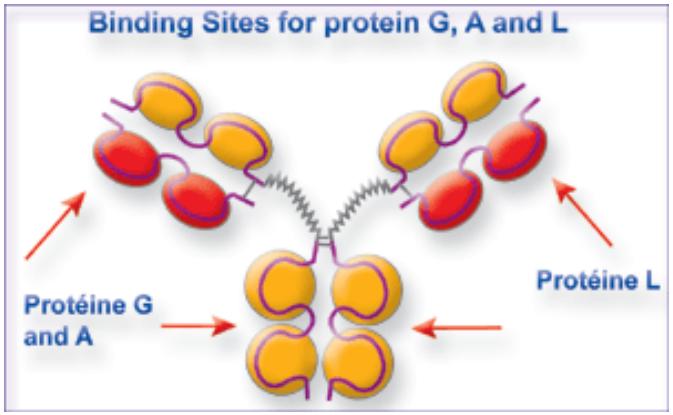


8-AEA-cAMP

8-(2-aminoethyl)aminoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate
(ligante para proteínas com afinidade por cAMP ou cGMP)

2. Grupo-específico: ligantes para separação de grupos:

Ligante grupo-específico	**Especificidade**
Concanavalina A	Grupos glicosil- ou manosil-
Cibacron Blue	Várias enzimas, albumina
lisina	Plasminogênio, RNA ribossomal
arginina	proteinases tipo tripsina
benzamidina	proteinases tipo tripsina
calmodulina	Proteínas reguladas por calmodulina
heparina	Fatores de coagulação, lipases, hormônios, receptores estoróides, etc
Metais de transição	Proteínas e peptídeos com resíduos de His expostos



Sítios de ligação das proteínas A, G e L à imunoglobulina, que permitem a purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade

Como se avalia se o processo de purificação de uma proteína foi eficiente ?

Três parâmetros permitem avaliar a eficiência do processo de purificação de uma proteína:

Atividade específica (AE): é a razão entre a quantidade da proteína de interesse, medida através de sua atividade biológica, e a quantidade total de proteínas presentes em cada etapa de purificação. Esse índice aumenta ao longo da purificação.

- **Índice de purificação**: indica quantas vezes em relação ao material de partida a proteína de interesse foi "concentrada". Calcula-se como a razão entre as atividades específicas inicial (material de partida) e final (proteína pura).

- **Rendimento**: indica quanto (em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperado ao final da purificação. Um certo grau de perda é inerente do processo de purificação (em cada etapa só devem ser processadas as frações mais ricas em atividade biológica, desprezando-se aquelas que apresentam pouca atividade).

Também podem ocorrer perdas por desnaturação das proteínas devido às diferentes condições (pH, sais, etc) a que são submetidas nas diferentes etapas de purificação. Espera-se recuperar o máximo possível da proteína de interesse.

CARATERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ELUIDAS DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

- Quantificação de proteínas nos volumes eluídos das colunas por espectrofotometria

  Leitura da Abs em 280 nm (UV), rápido e simples

- Determinação das atividades enzimáticas

  Nas frações que apresentam proteína (Abs_{280nm}) são determinadas as atividades enzimáticas de interesse

- Algumas proteínas apresentam propriedades espectrais características que permitem seu seguimento durante a cromatografia

  Peroxidases : Banda Soret (Abs em 406-409 nm)

  Lacases : Abs em 600 nm (cor azul)

TABELA DE PURIFICAÇÃO

ETAPA	ATIVIDADE (UI)	PROTEÍNA (mg)	A.E. (U/mg)	RENDIM. (%)	PURIFICAÇÂO (Vezes)
Extrato Inicial	5.300	295	18	100	1
Precipitação (Acetona)	5.215	183	29	99	1.6
DEAE-Sepharose	3.281	55	59	62	3.3
Sephacryl S-200 HR	3.021	45	67	57	3.7
Mono S	1.708	6.6	259	32	14.5

TÉCNICA UTILIZADA COMO CRITÉRIO DE PUREZA

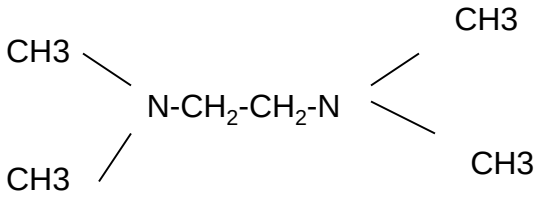
ELETROFORESE

A eletroforese é uma técnica relativamente simples e rápida e de alto valor informativo, que consiste na migração de molécula ionizadas de acordo com suas cargas elétricas e massa molar, submetidas a um campo elétrico

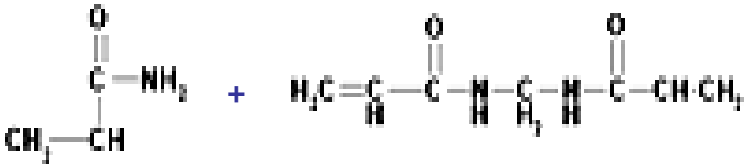
- O suporte mais utilizado para conduzir a eletroforese é o gel de poliacrilamida, em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE)

- Sistema SDS-PAGE serve para a determinação da massa molar das proteínas presentes em uma amostra

Reagentes para o preparo do gel de poliacrilamida



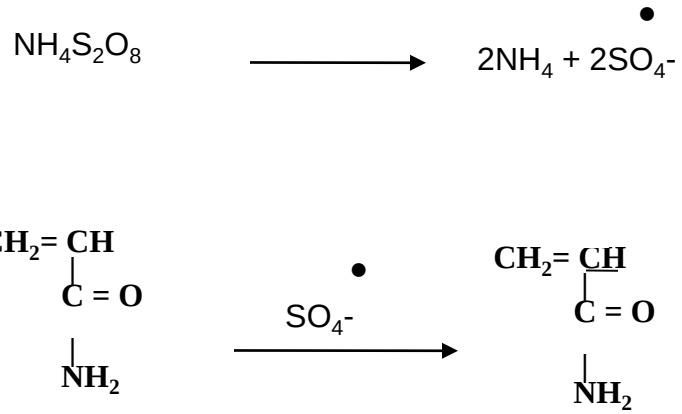
TEMED - tetrametiletilenodiamina

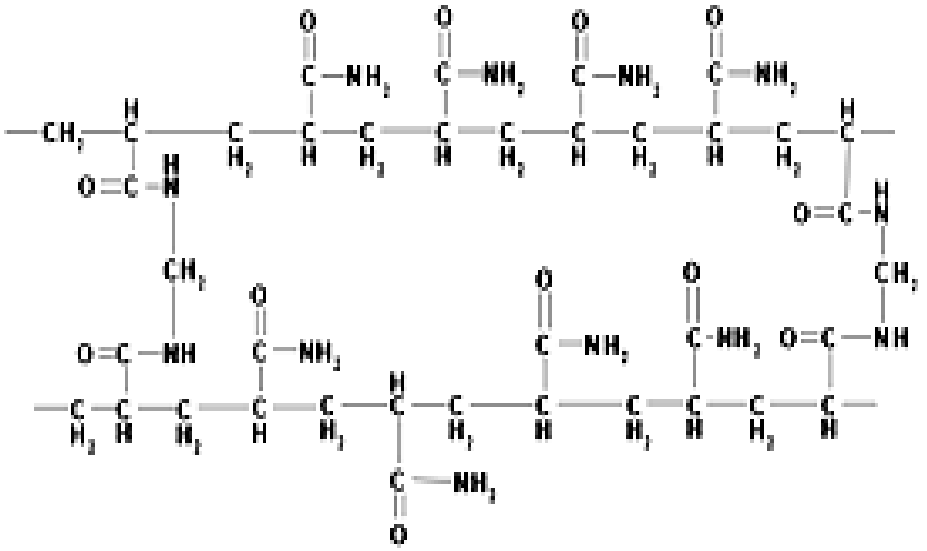


acrilamida

N,N´-metilenobisacrilamidaacrilamida

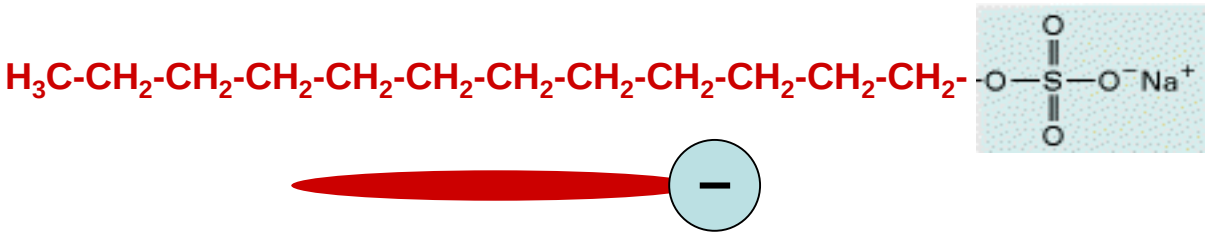
Catalisador (persulfato de amônio)





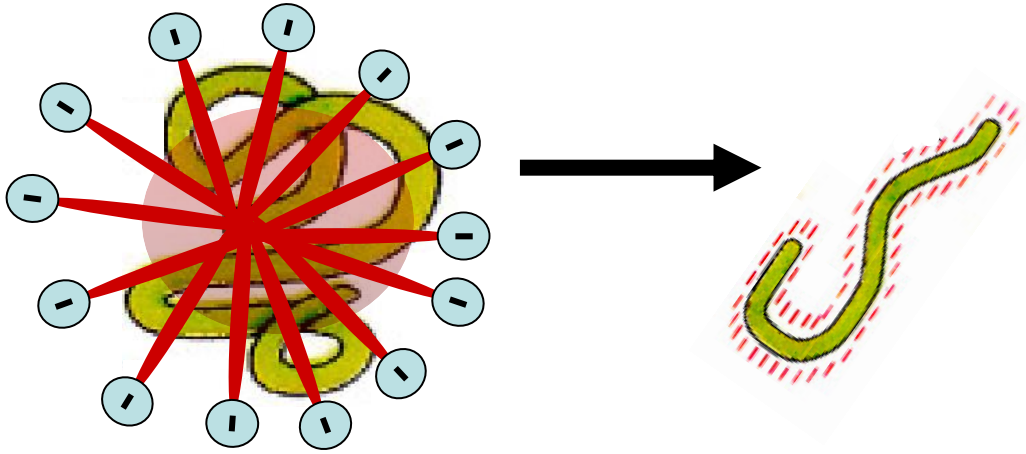
poliacrilamida

Desnaturação de proteínas por SDS

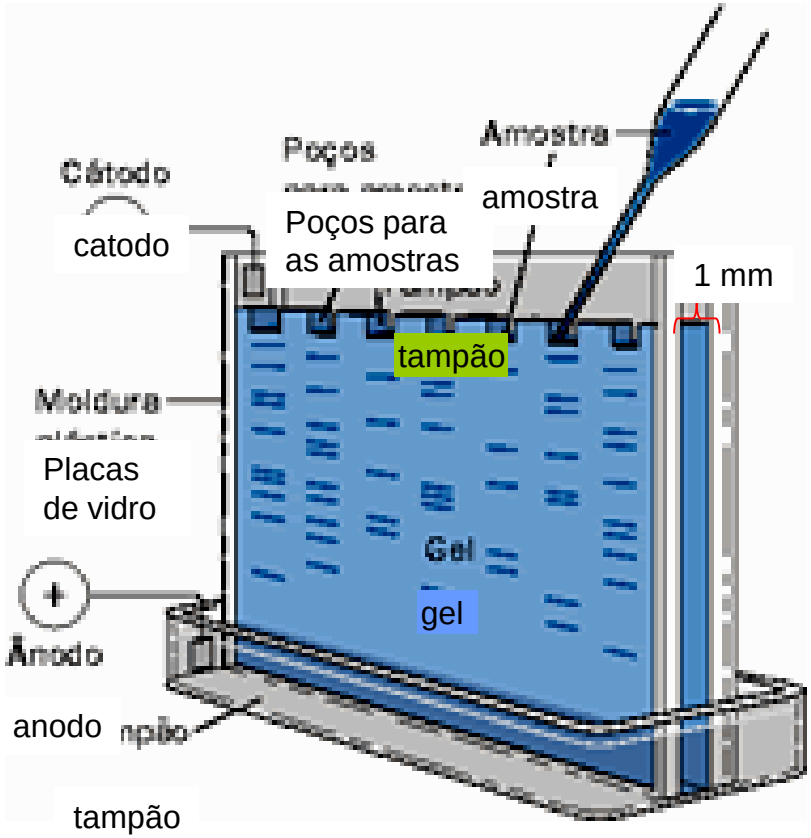


Sódio dodecil sulfato

A porção hidrocarboneto do detergente interage com as regiões hidrofóbicas da proteína, dispondo o grupo sulfato carregado na superfície, em contacto com o meio aquoso. A repulsão entre os grupos fosfato desestabiliza os laços não covalentes que mantém a estrutura 3D da proteína, desnaturando-a.



Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)



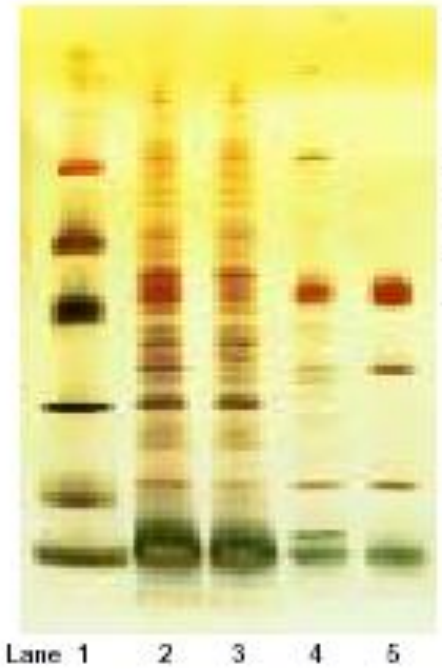
cuba vertical para mini-gel (10 X 8 cm)

O desenho ao lado mostra o tipo mais comum de cuba para PAGE.
Na cuba, o gel é polimerizado entre duas placas de vidro ou plástico, afastadas 1 mm uma da outra.

- O SISTEMA PAGE É USADO PARA A ANÁLISE DO PADRÃO DE PROTEÍNAS NATIVAS PRESENTES NUMA AMOSTRA

A quantidade de bandas que aparecem no gel é um indicativo da pureza de uma amostra

Analytical assay



Lane 1: Low Molecular Weight Calibration kit (LMW) 14 400, 20 100, 30 000, 43 000, 67 000, 94 000
Lane 2: Detergent extract of *Escherichia coli* membranes
Lane 3: Flow-through material
Lane 4: Fraction 1 from HiTrap Chelating 1 ml
Lane 5: Fraction 2 from HiTrap Chelating 1 ml

SDS electrophoresis on PhastSystem using PhastGel 8–25%, silver staining.

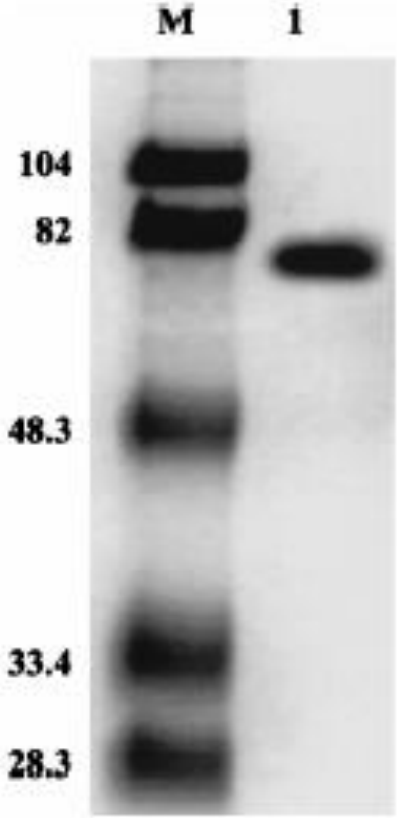
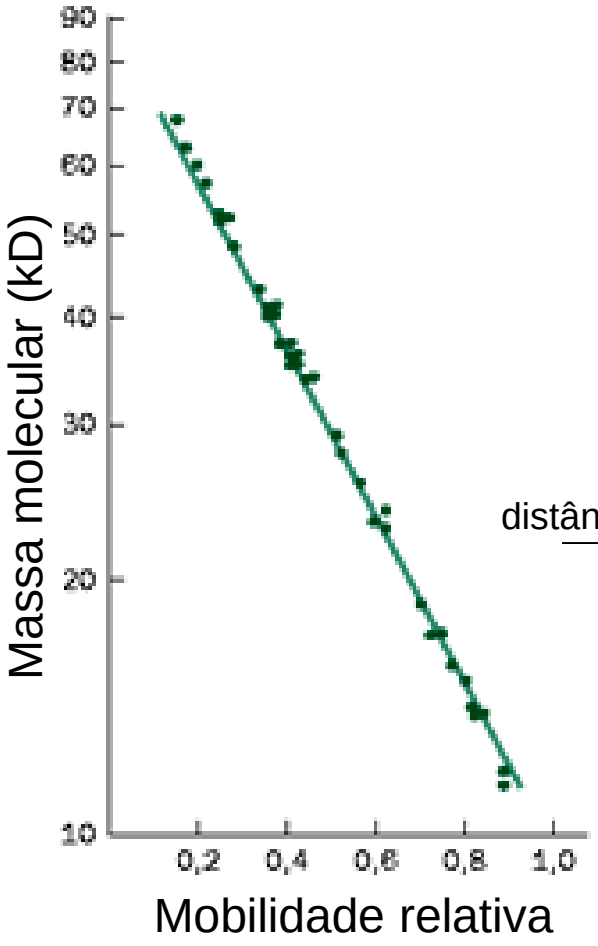


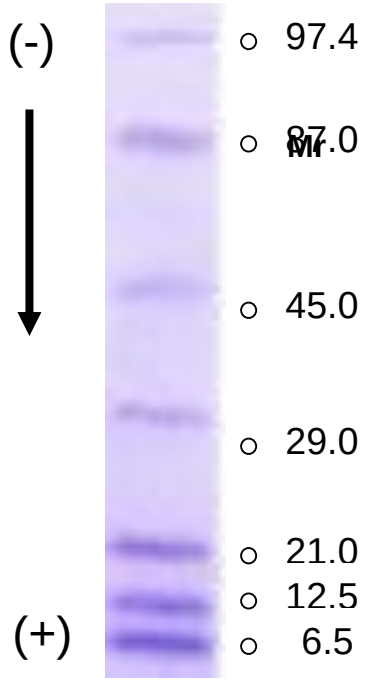
FIG. 1. Coomassie blue-stained PAGE gel containing purified *C. thermophilum* laccase. Lane M contained standard molecular mass protein markers, including phosphorylase *b* (molecular mass, 104 kDa), bovine serum albumin, (82 kDa), ovalbumin (48.3 kDa), carbonic anhydrase (33.4 kDa), and soybean trypsin inhibitor (28.3 kDa). Lane 1 contained 10 μg of purified *C. thermophilum* laccase.

SDS-PAGE- permite determinar a massa molecular de proteínas



Mobilidade relativa =

distância percorrida pela banda X
distância percorrida pelo marcador da corrida



Curva de calibração de SDS-PAGE

Proteínas padrões em um SDS-PAGE

Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)

- 1975 - surge a 2D-PAGE . Trabalhos de O´Farrel; Klose ; MacGillivray et al.

2D-PAGE: etapas principais

- Preparação da amostra
- Focalização Isoelétrica →
- SDS-PAGE
- Detecção
- Digitalização e análise de imagem

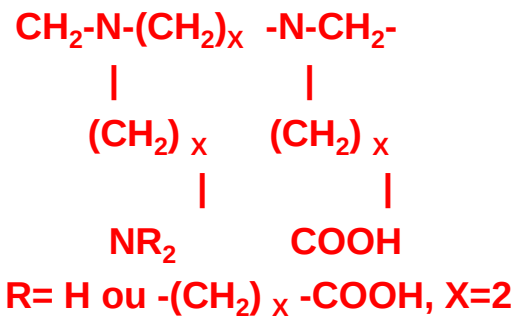
- As moléculas migram sob a ação de um campo elétrico em um gel contendo um gradiente de pH. A migração se interrompe ao atingirem seu ponto isoelétrico

- Aplicada a moléculas que possam ser tanto positivamente ou negativamente carregadas (anfotéricas)

Gradientes de pH

•A focalização isoelétrica é realizada em géis de poliacrilamida contendo um gradiente de pH que pode ser de dois tipos:

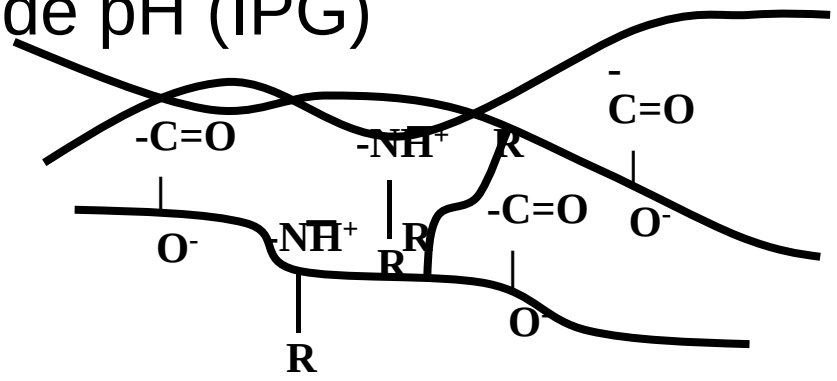
•Tampões anfotéricos (“free carrier ampholytes”)



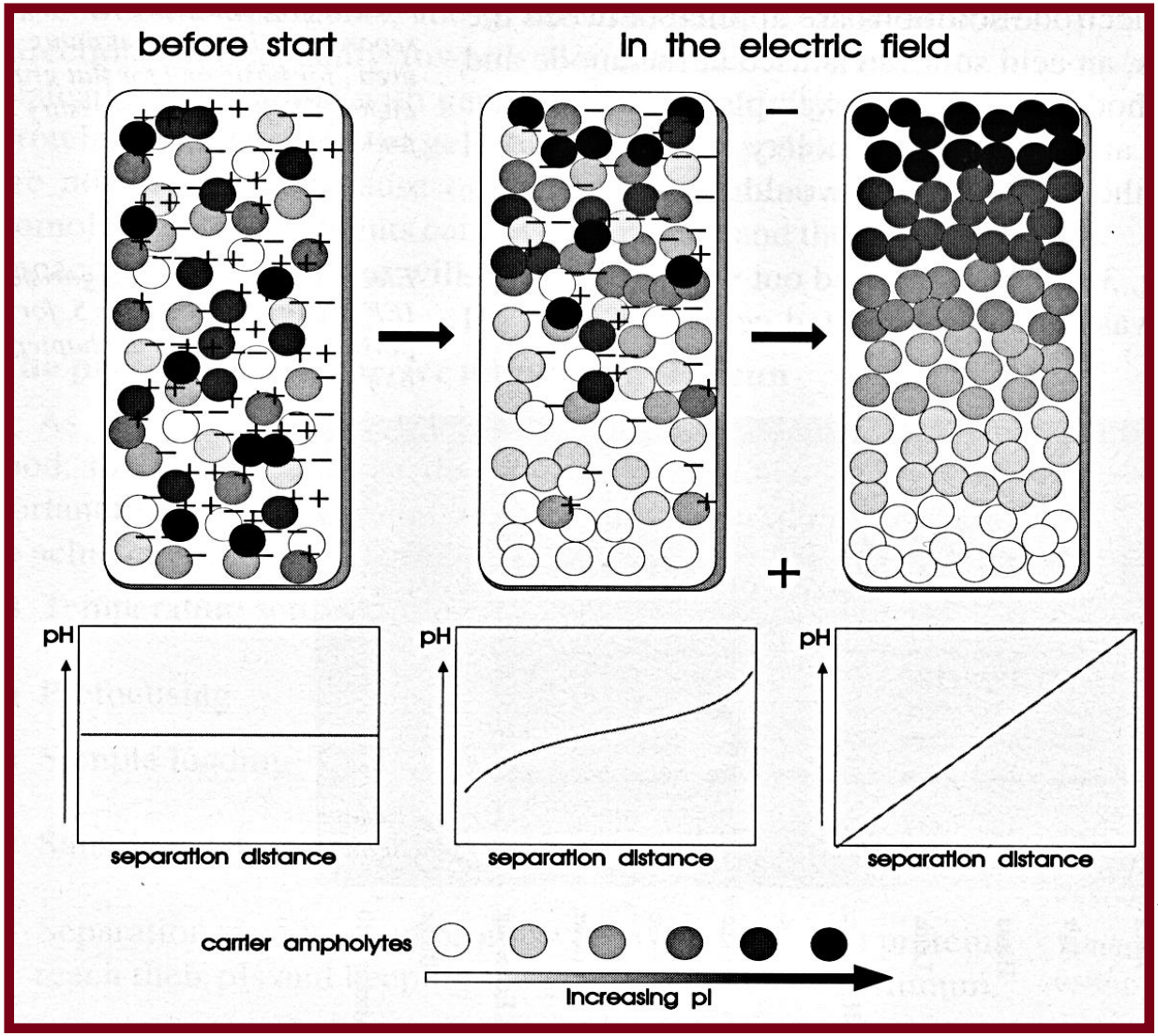
Propriedades: boa condutividade e solubilidade no pI, alta capacidade tamponante, baixa interação com a amostra

•Gradientes imobilizados de pH (IPG)

Gradiente formado com derivados de acrilamida contendo grupos tamponantes (“Immobilines”)



Gradiente de pH com anfolitos



- Com o uso dos “anfolitos” o gradiente de pH é formado sob ação de um campo elétrico
- Desvantagens: resultado depende do tempo de focalização, temperatura e efeitos endosmóticos

Westermeier, R. Electrophoresis in Practice, WCH

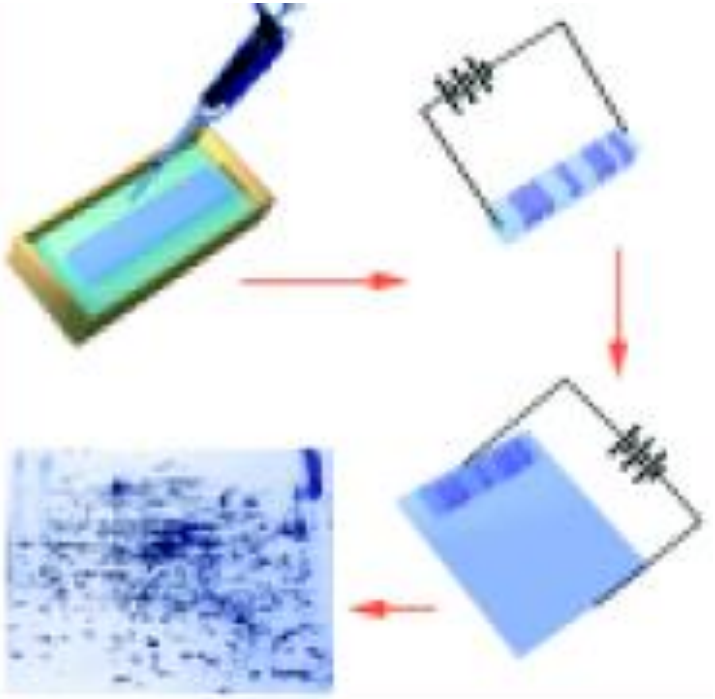
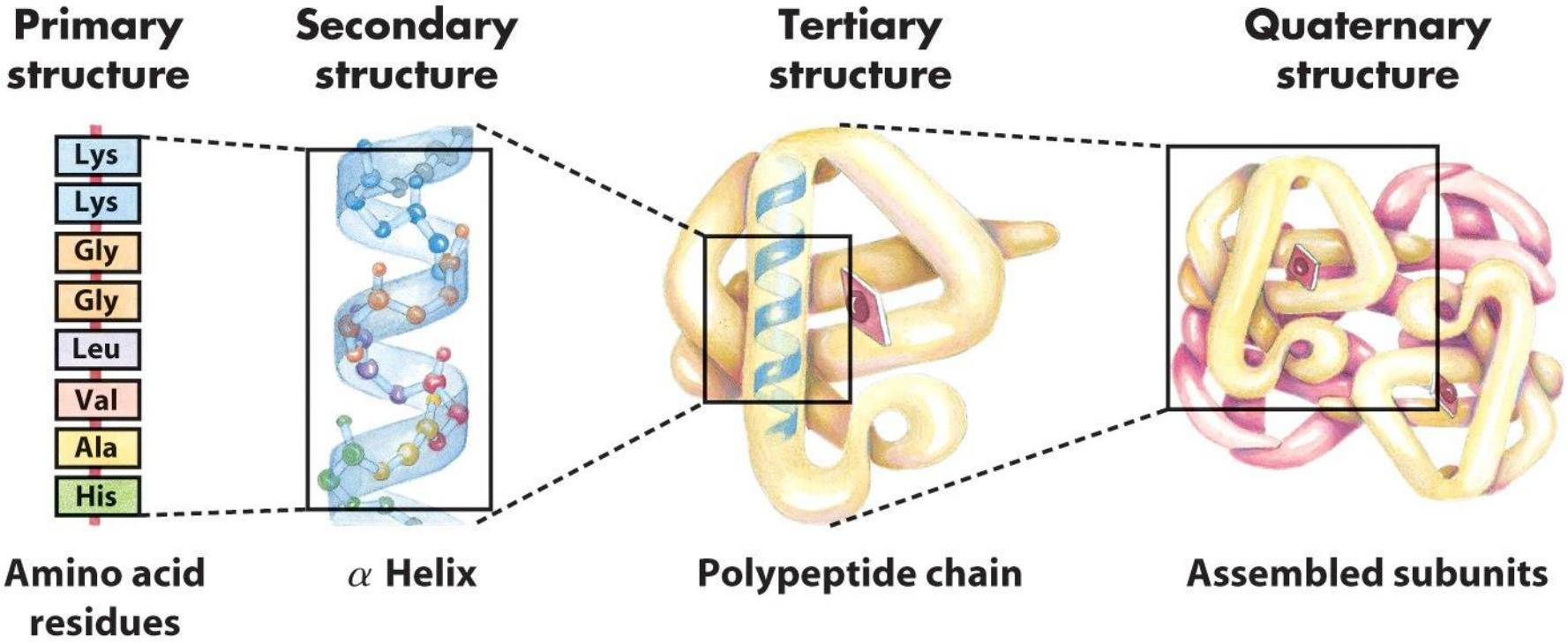


Figura 1-Eletroforese bidimensional. O gel de IPG é incubado com a solução contendo a amostra e, posteriormente, submetido a um campo elétrico para a focalização isoelétrica ou primeira dimensão. As proteínas focalizadas são, então, submetidas a uma segunda dimensão, que as separará de acordo com suas massas moleculares. Após coloração, o perfil bidimensional pode ser visualizado.

Figura 4-Identificação de proteínas por espectrometria de massa. Uma mancha protéica de um gel bidimensional (1) é cortada e transferida para um tubo onde sofre digestão proteolítica (2). Os peptídios resultantes são separados de sais e outras micromoléculas (3) e aplicados no espectrômetro de massa (4). As massas dos peptídios são usadas para fazer buscas em bancos de dados por métodos computacionais, resultando na identificação da proteína (5).

Sequenciamento de proteínas



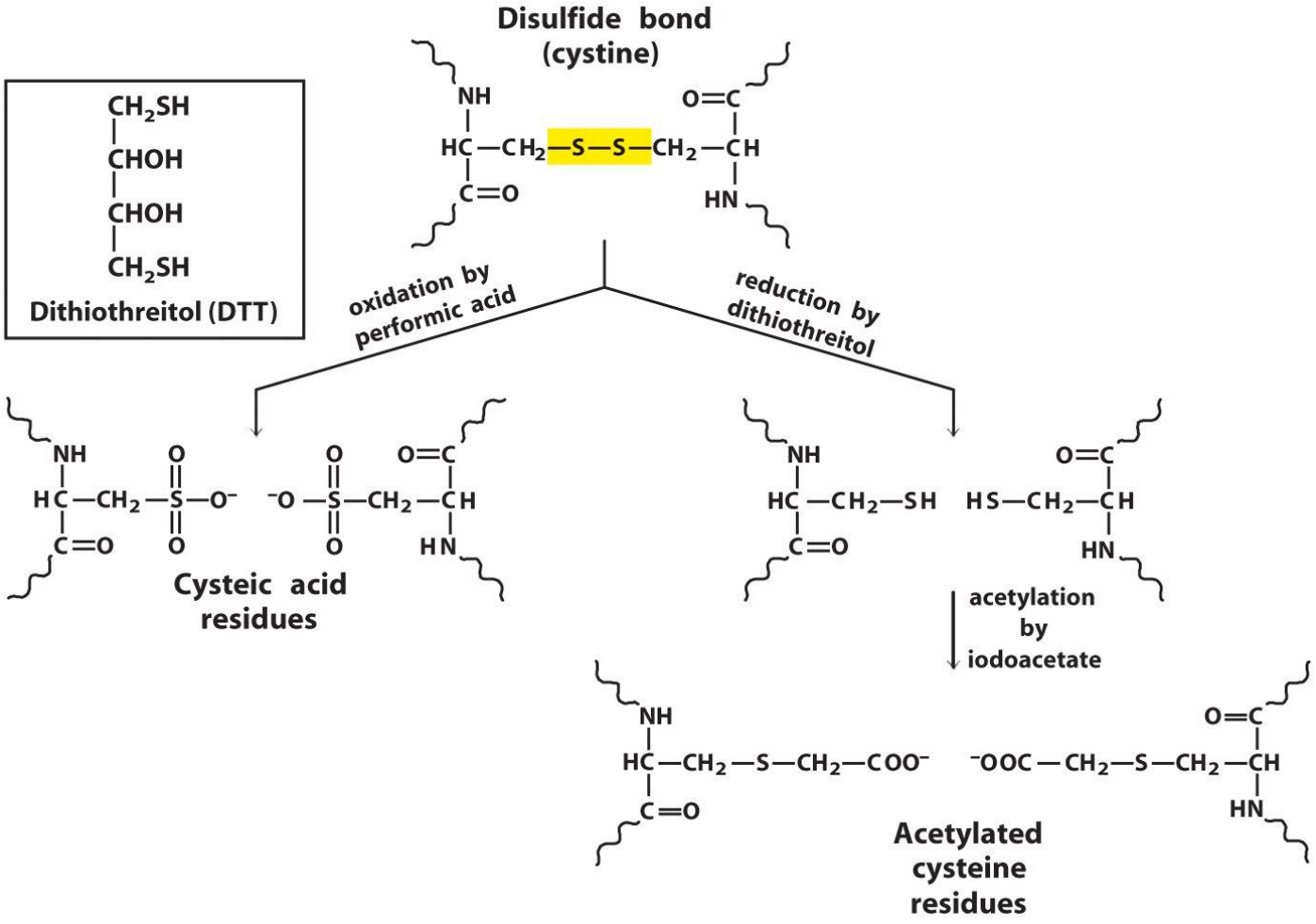
Etapas:

- 1) separar as cadeias
- 2) reduzir os grupamentos dissulfeto
- 3) hidrólise total

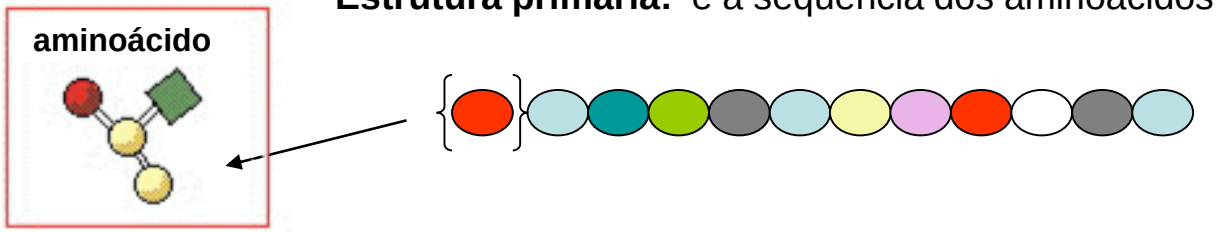
4) determinar os resíduos N- terminal
5) Hidrólise enzimática da cadeia
6) Determinar a sequência

Desdobramento da ligação dissulfeto e separação das cadeias polipeptídicas

Usar agentes desnaturantes e romper as ligações dissulfeto



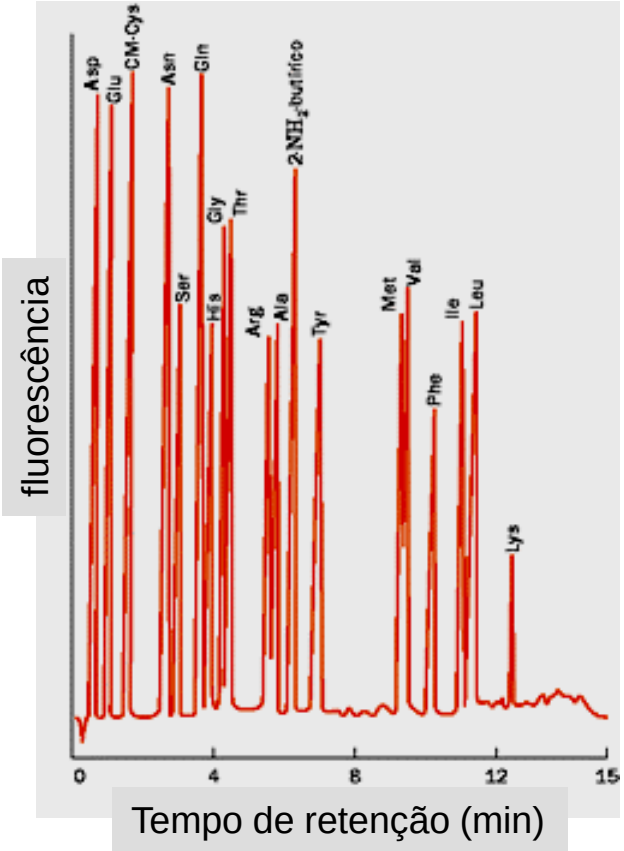
Estrutura primária: é a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica.



Para determinar a estrutura primária de uma proteína, é necessário primeiro conhecer a composição (número e tipos) de seus aminoácidos.

A proteína pura é tratada com HCl 6N fervente para quebrar (hidrólise) as ligações peptídicas. Triptofano é destruído

A mistura resultante é submetida a métodos cromatográficos (fase reversa, troca iônica) para separar os diferentes aminoácidos.



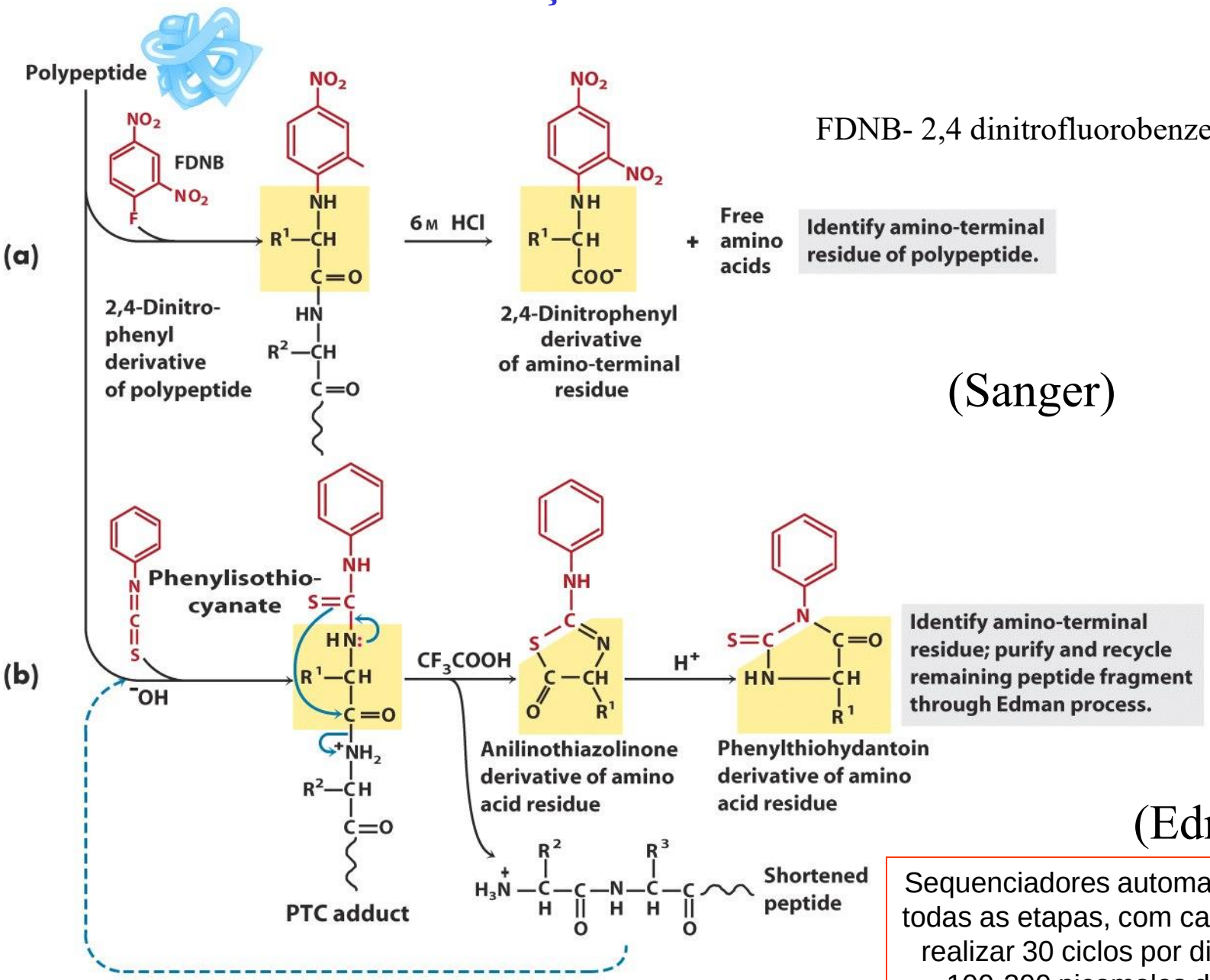
A posição do pico no cromatograma identifica o aminoácido.
A área do pico quantifica o aminoácido.

Existem vários métodos para se determinar a sequência de aminoácidos de uma proteína. Aqui veremos como funcionam os dois métodos atualmente mais utilizados:

a) Método de Edman: reação do aminoácido N-terminal da proteína com fenil-isotiocianato . A proteína modificada é submetida a hidrólise ácida liberando o aminoácido N-terminal modificado, e este é identificado por cromatografia. Segue-se novo ciclo de reação com o próximo aminoácido na proteína, que se tornou o novo N-terminal.

b) Espectrometria de massa: determinação das massas de fragmentos correspondendo a aminoácidos, retirados sequencialmente da proteína. Veremos mais sobre esse método na aula sobre eletroforese e proteômica.

Identificação do N-terminal



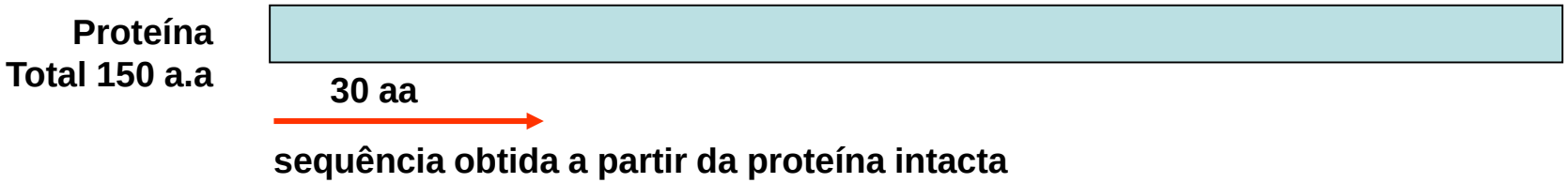
FDNB- 2,4 dinitrofluorobenzeno

(Sanger)

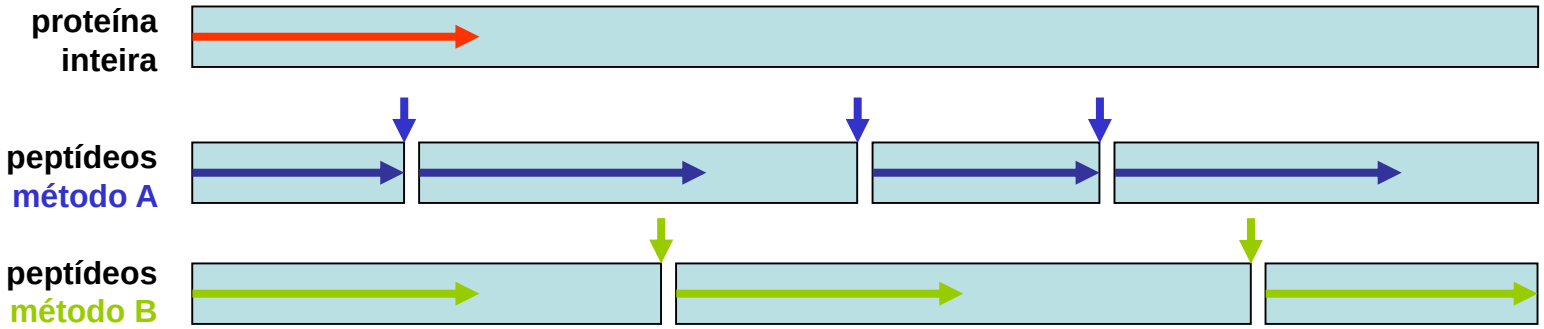
(Edman)

Sequenciadores automatizados fazem todas as etapas, com capacidade para realizar 30 ciclos por dia, a partir de 100-200 picomoles de proteína.

Quando uma proteína possui mais de 20-30 resíduos de aminoácidos, não é possível sequenciá-la diretamente pelo método de Edman.



Para obter a sequência completa de uma proteína, é necessário sequenciar vários peptídeos da mesma proteína, obtidos por diferentes tipos de quebra da cadeia, até haver sobreposição de suas sequências.



Diferentes métodos são utilizados para obter-se diferentes peptídeos da proteína: A) enzimas proteolíticas, como tripsina (quebra em resíduos de Lys ou Arg) e quimotripsina (quebra em resíduos de Phe); B) tratamento com brometo de cianogênio (quebra em Met); e outros.

Hidrólise parcial das cadeias polipeptídicas

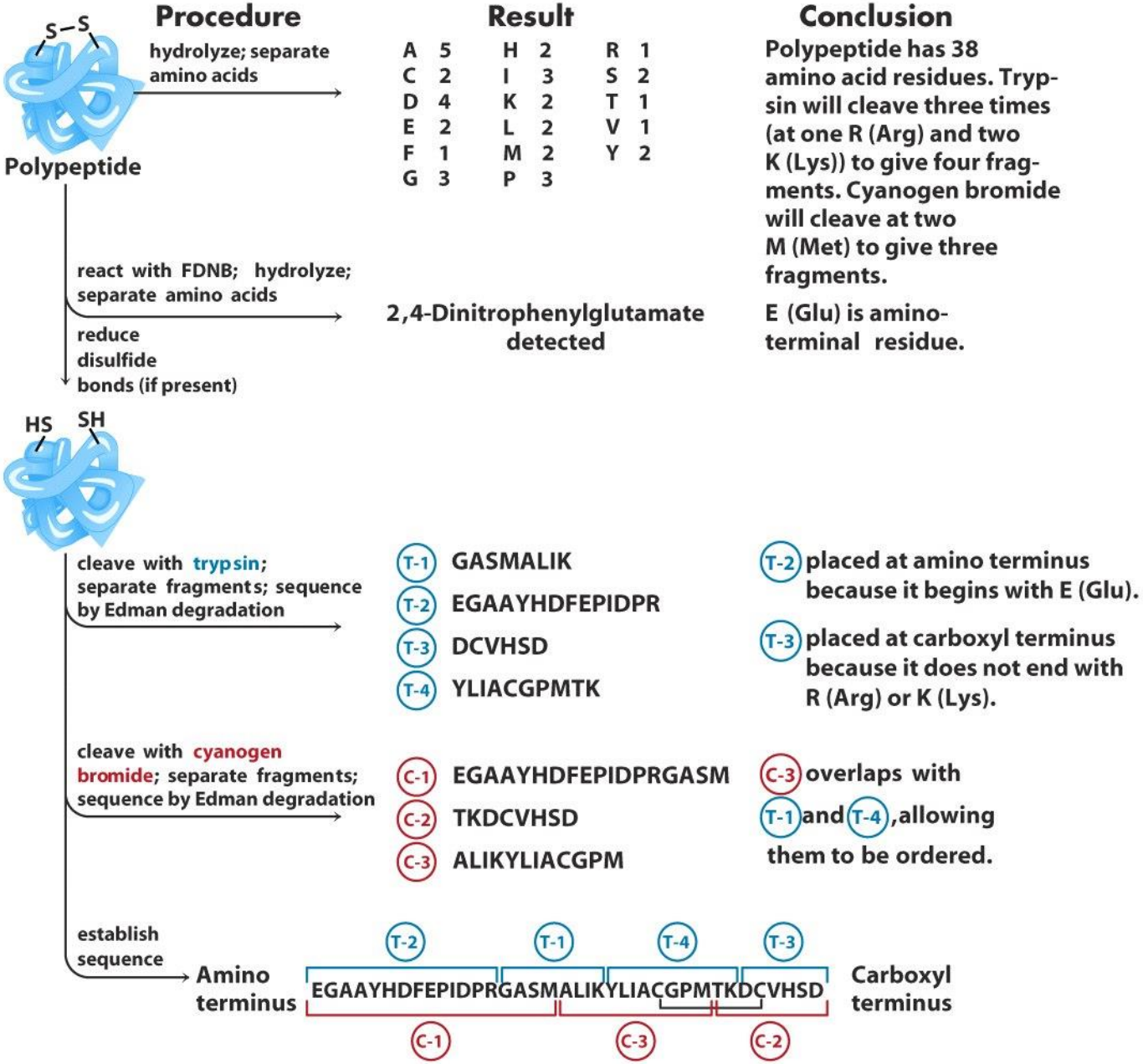
TABLE 3–7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

*Reagent (biological source)**	*Cleavage points*†
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
Submaxillarus protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
Staphylococcus aureus V8 protease (bacterium *S. aureus*)	Asp, Glu (C)
Asp-*N*-protease (bacterium *Pseudomonas fragi*)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium *Lysobacter enzymogenes*)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Separação e análise dos peptídeos



O tratamento de um polipeptídeo com 2-mercaptoetanol produz dois Polipeptideos:

1. Ala-Val-Cys-Arg-Thr-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Leu
2. Tyr-Lys-Cys-Phe-Arg-His-Thr-Lys-Cys-Ser

3. O tratametno do peptideo intacto com tripsina produz fragmentos com a Seguinte composiçao de aminoácidos:

3. (Ala, Arg,Cys, Ser, Val)
4. (Arg, Cys, Gly, Lys, Thr, Phe)
5. (Ans, Leu, Phe)
6. (Lys, Tyr)

Indique a posição da ponte dissulfeto no polipeptideo intacto.

PROTEOMA

conjunto de PROTEínas expressas por um genOMA.

- O genoma de um organismo, como por exemplo o de um ser humano, é praticamente constante, independente de qual das diferentes células (excetuando-se óvulos e espermatozóides) está sendo analisada ou de variações no meio ambiente.

- o proteoma é bastante diferente entre células e até o mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes proteomas em resposta a estímulos externos

- - a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é o método mais eficiente de separação simultânea de centenas ou milhares de proteínas

A sequência parcial de aminoácidos proveniente de uma mancha da eletroforese bidimensional pode ser usada para fazer uma busca nos bancos de dados e identificar a proteína.

-- Uma abordagem ainda mais moderna e sensível faz uso da espectrometria de massa de proteínas