

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)

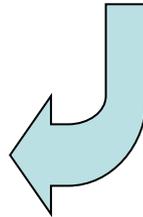
MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

MÉTODO	PRINCÍPIO	COMENTÁRIO
Precipitação por força iônica “salting out”, com sais inorgânicos (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 não sejam mantidas temperaturas muito baixas (-10°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 sais
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

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

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



Ponto Isoelétrico de algumas Proteínas

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 carregado
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

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)

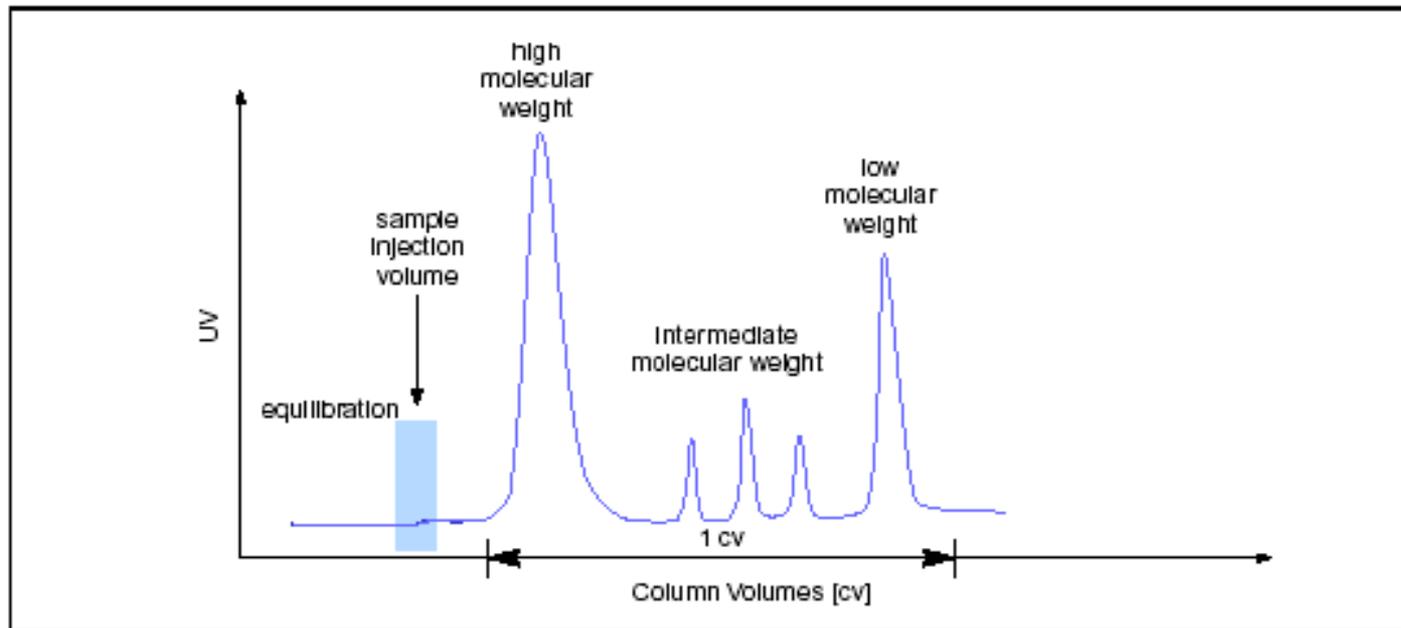


Fig. 41. Typical GF elution.

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

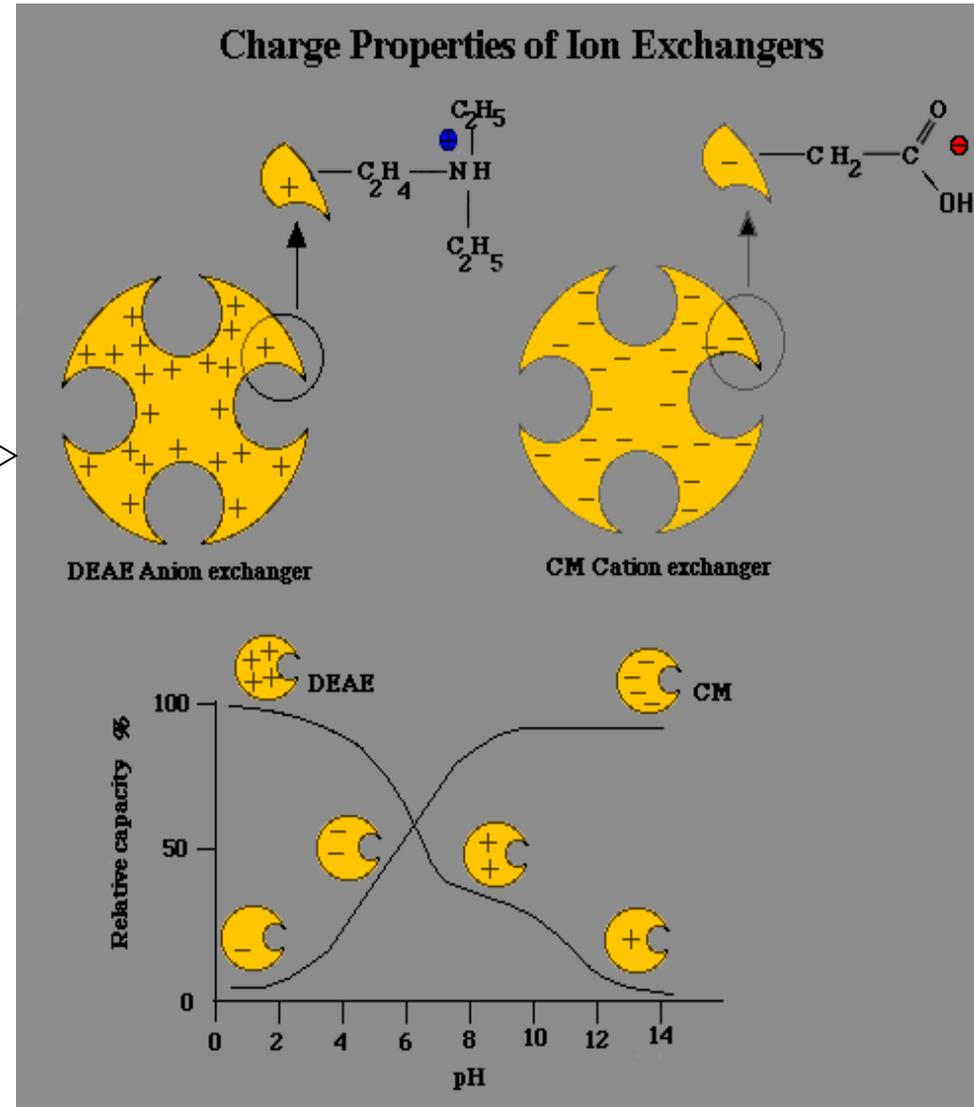
CM-Celulose : carboximetil

- Resina aniônica (+) : troca anions

- Resina cationica (-) : troca cátions

- Resinas trocadoras podem ser fortes ou fracas

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



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: PO_4^{2-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^- > I^- > SCN^-
Cátions: NH_4^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}

matriz hidrofóbica



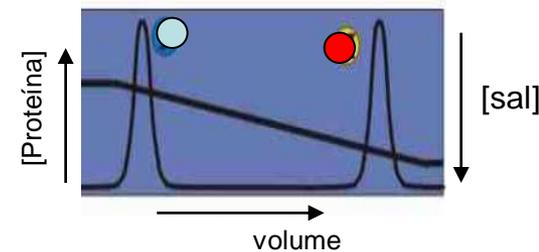
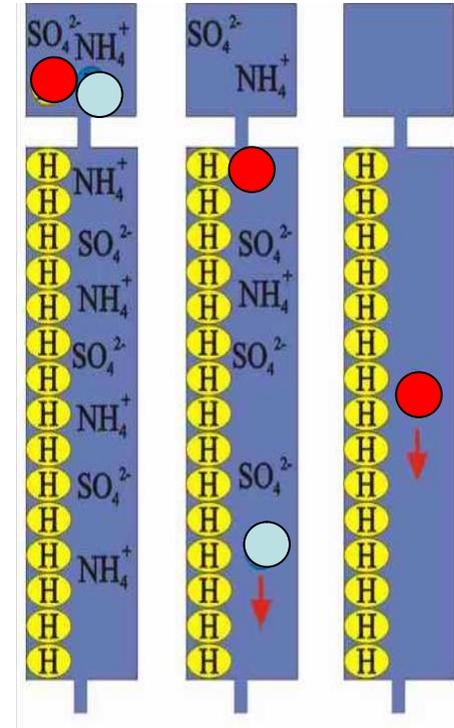
Proteína altamente hidrofílica



Proteína menos hidrofílica

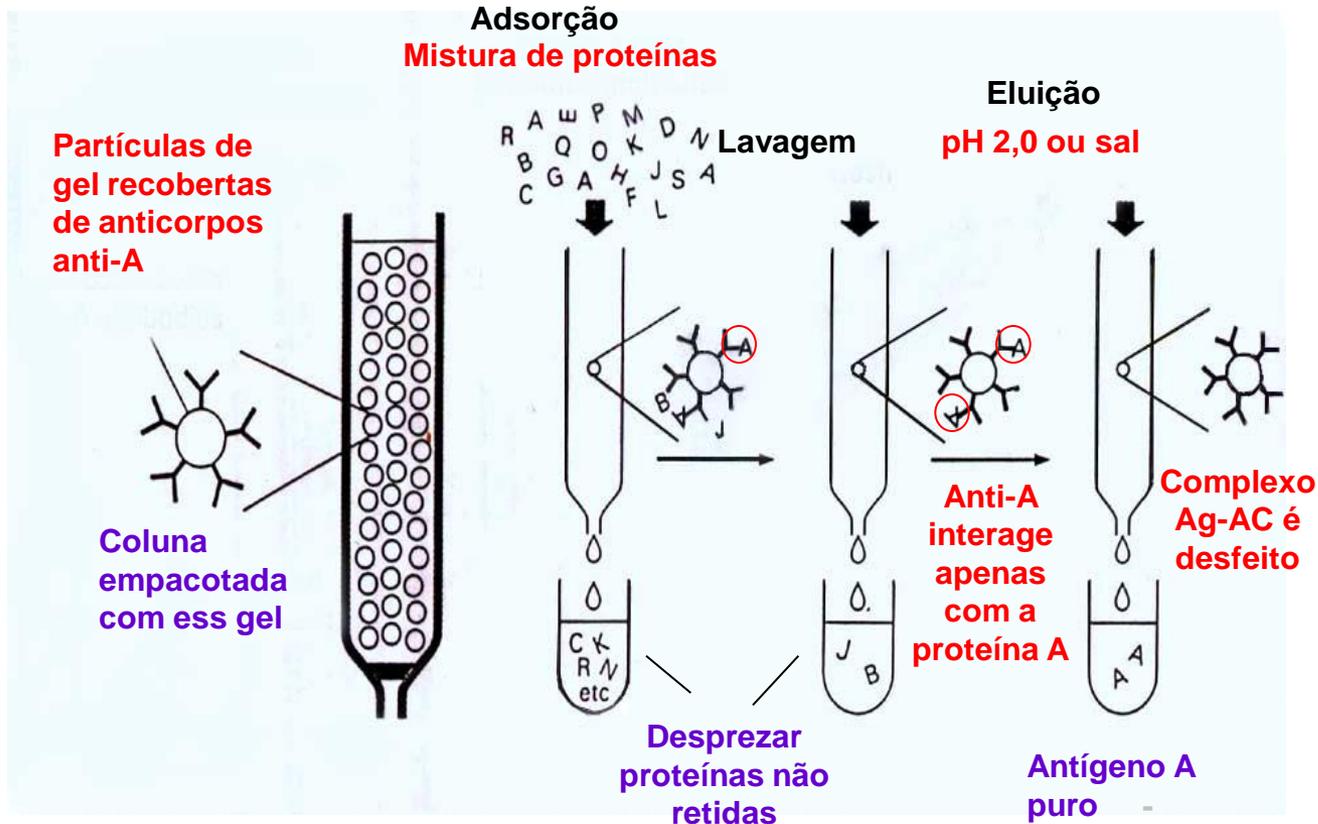


camada de H_2O solvatação



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

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.

TABELA DE PURIFICAÇÃO

ETAPA	ATIVIDADE (UI)	PROTEÍNA (mg)	A.E. (U/mg)	RENDIM. (%)	PURIFICAÇÃO (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

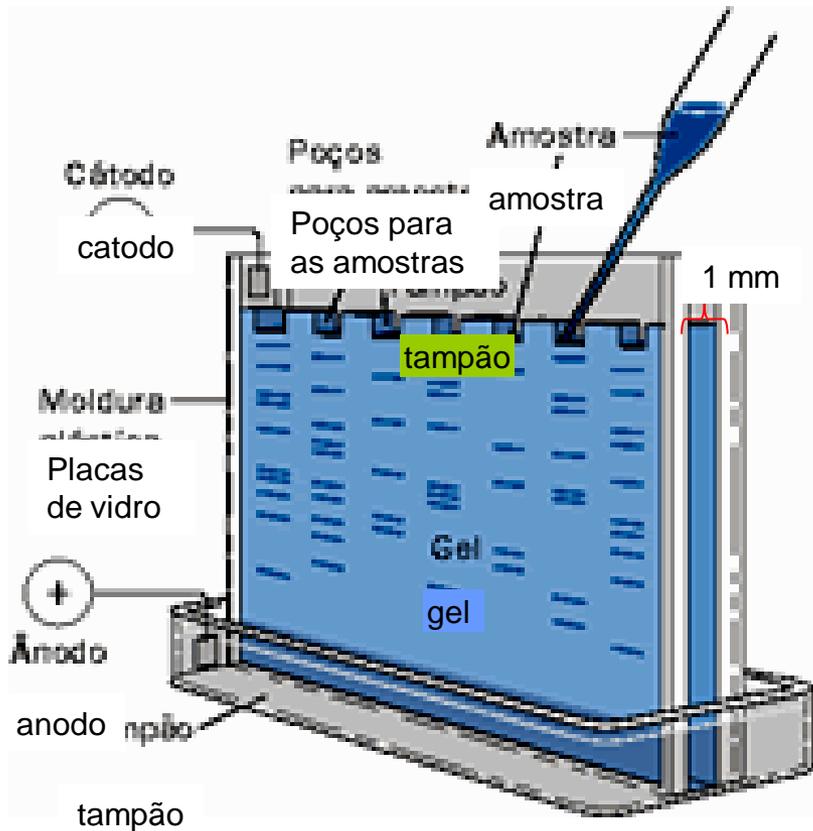
TÉCNICA UTILIZADA COMO CRITÉRIO DE PUREZA

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

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.

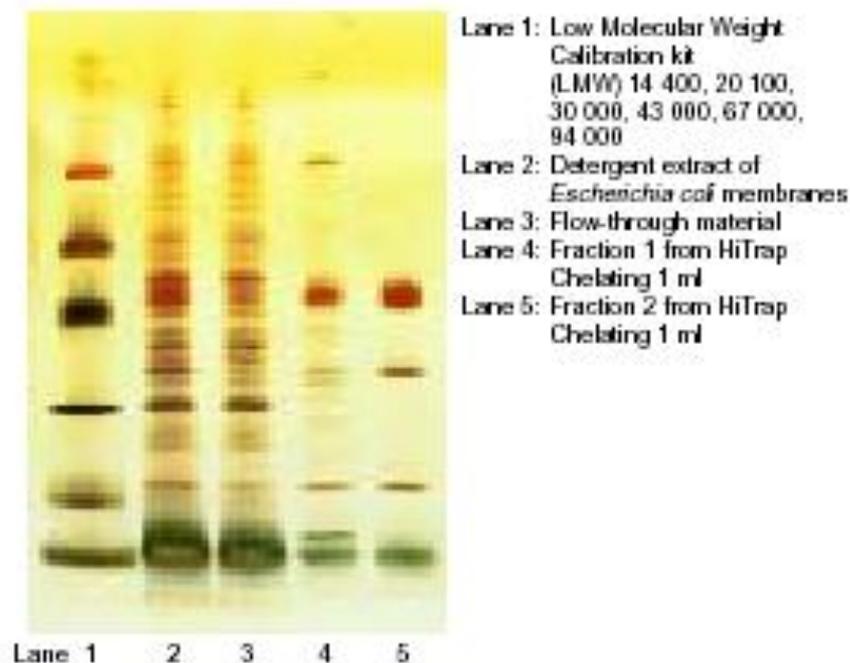
Na cuba, o gel é polimerizado entre duas placas de vidro ou plástico, afastadas 1 mm uma da outra.



- 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



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

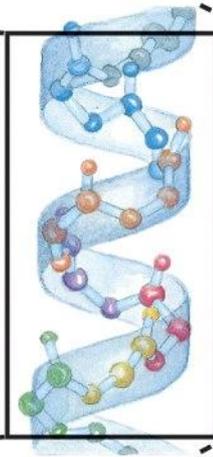
Sequenciamento de proteínas

Primary structure



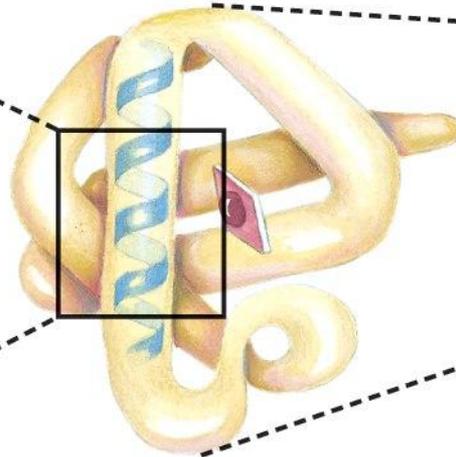
Amino acid residues

Secondary structure



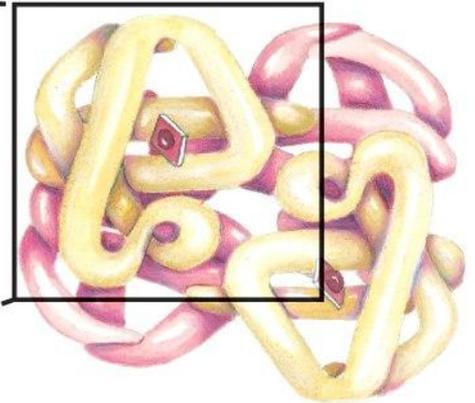
α Helix

Tertiary structure



Polypeptide chain

Quaternary structure

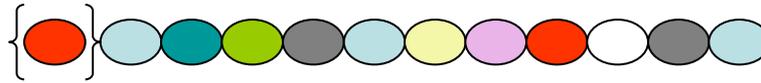
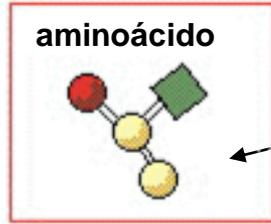


Assembled subunits

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

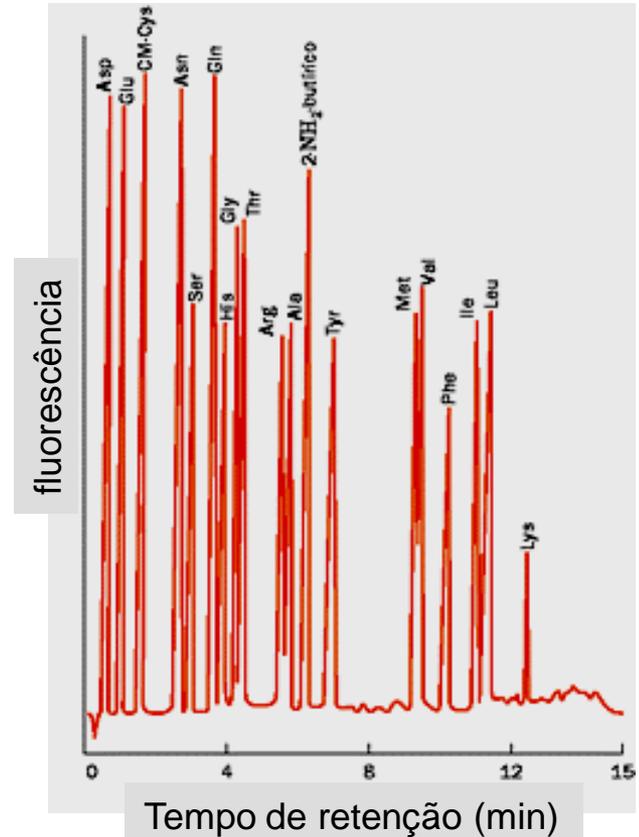
Estrutura primária: é a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica.



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

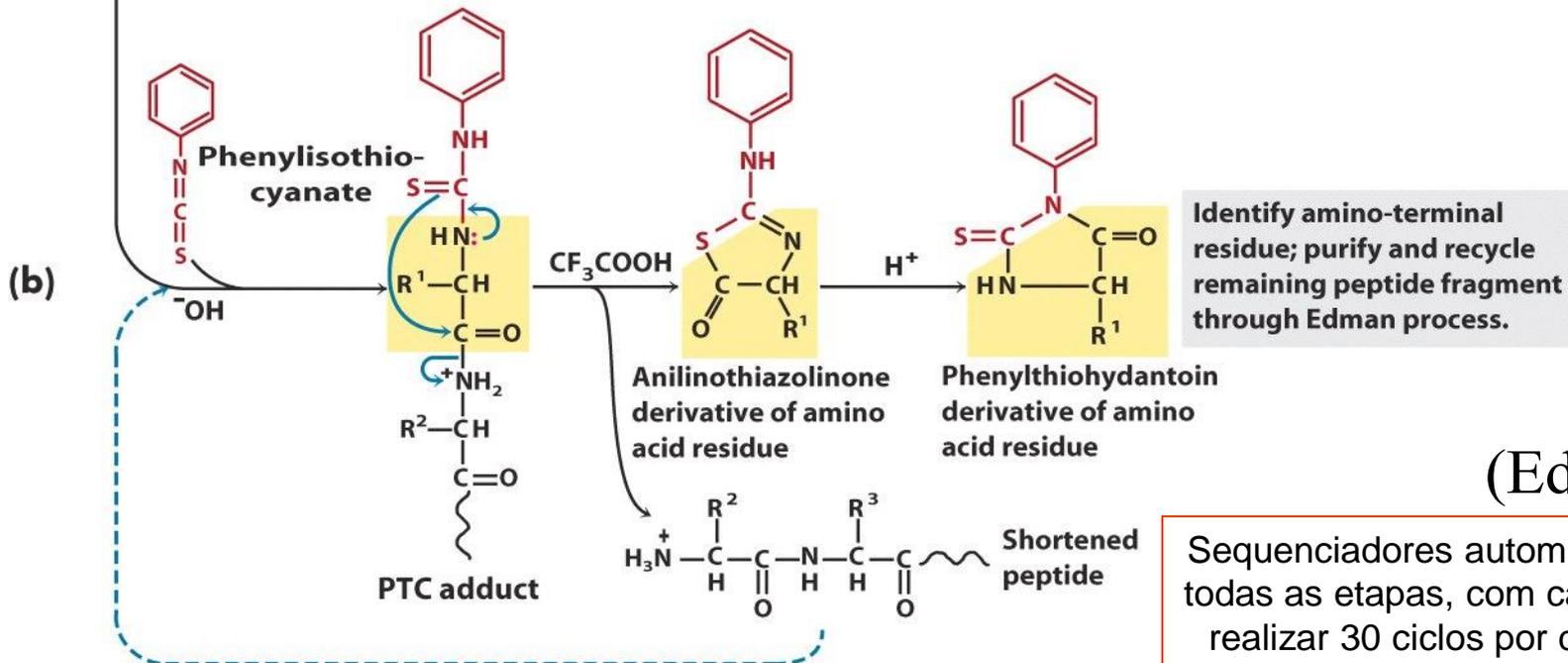
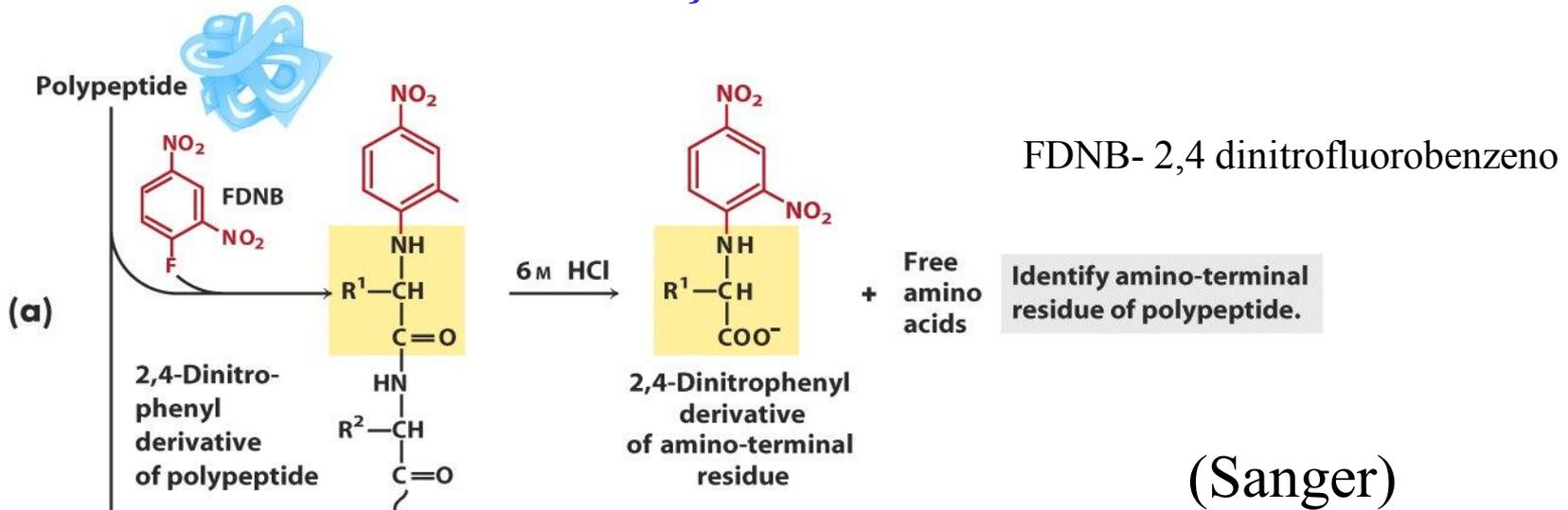
A mistura resultante é submetida a métodos cromatográficos (fase reversa, troca iônica) para separar os diferentes aminoácidos.



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



Identificação do N-terminal



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

Hidrólise parcial das cadeias polipeptídicas

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

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

