

ESTRUTURA PRIMÁRIA DE PROTEÍNAS: SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS

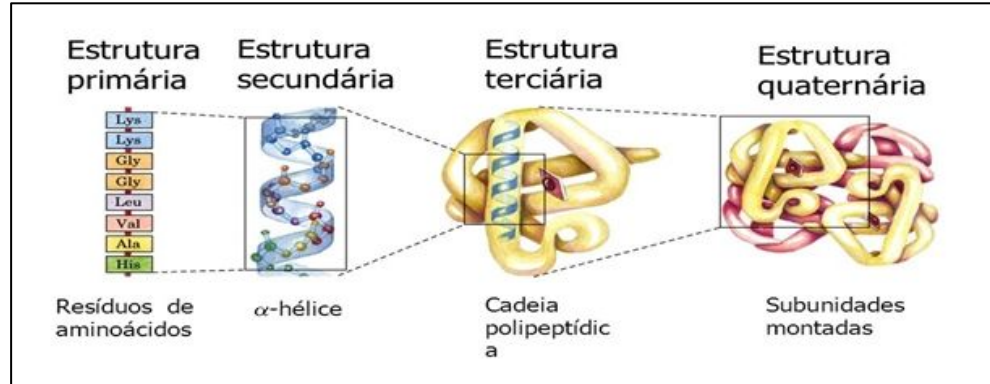
BRUNA DA ROCHA MARTINS 9327776

SAMIRA ALVES ABOU ARABI 9041847

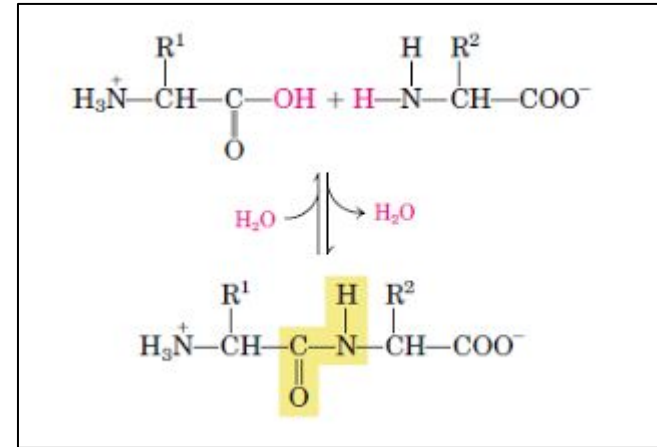


Introdução - Proteína

- macromolécula composta por 1 ou + cadeias polipeptídicas



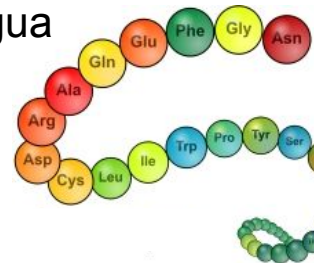
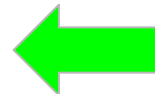
Estruturas da proteína



Ligação peptídica

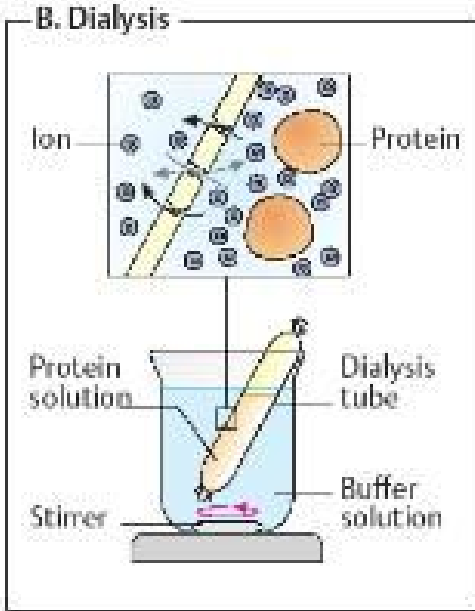
Ligação peptídica: reação entre grupo alfa-carboxila e alfa-amino, liberando água

Sequenciamento de aminoácido: determinação da estrutura primária

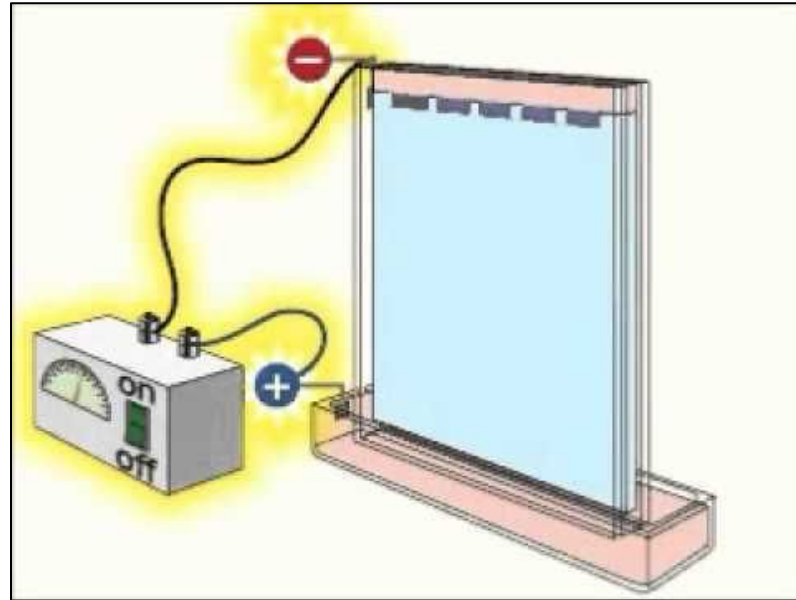


1ª etapa: Purificação do peptídeo

↪ Tamanho, solubilidade em determinado solvente e carga do peptídeo.



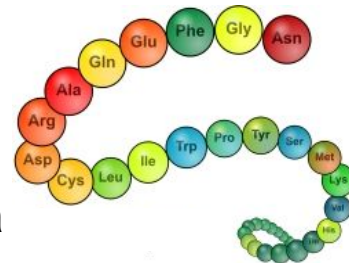
Diálise



Eletroforese



Cromatografia de troca iônica



2ª etapa: Definição dos aminoácidos

Hidrólise das ligações de amida → degradação da cadeia → aminoácidos livres.

 *Analizador automático de aminoácidos.*

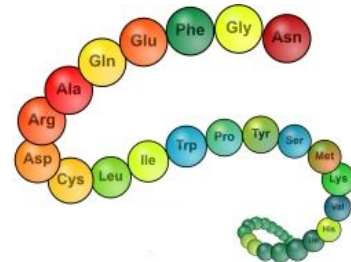


- Coluna com carga negativa → íons carboxilato ou sulfonato
- Mistura acidificada para protonar aminoácidos

 grau de protonação depende da estrutura

 diferentes graus de retenção

 eluição dos ácidos mais rapidamente



2ª etapa: Definição dos aminoácidos

- Resultado é registrado com um cromatograma
- A área sob cada pico é proporcional à quantidade de um aminoácido na mistura.

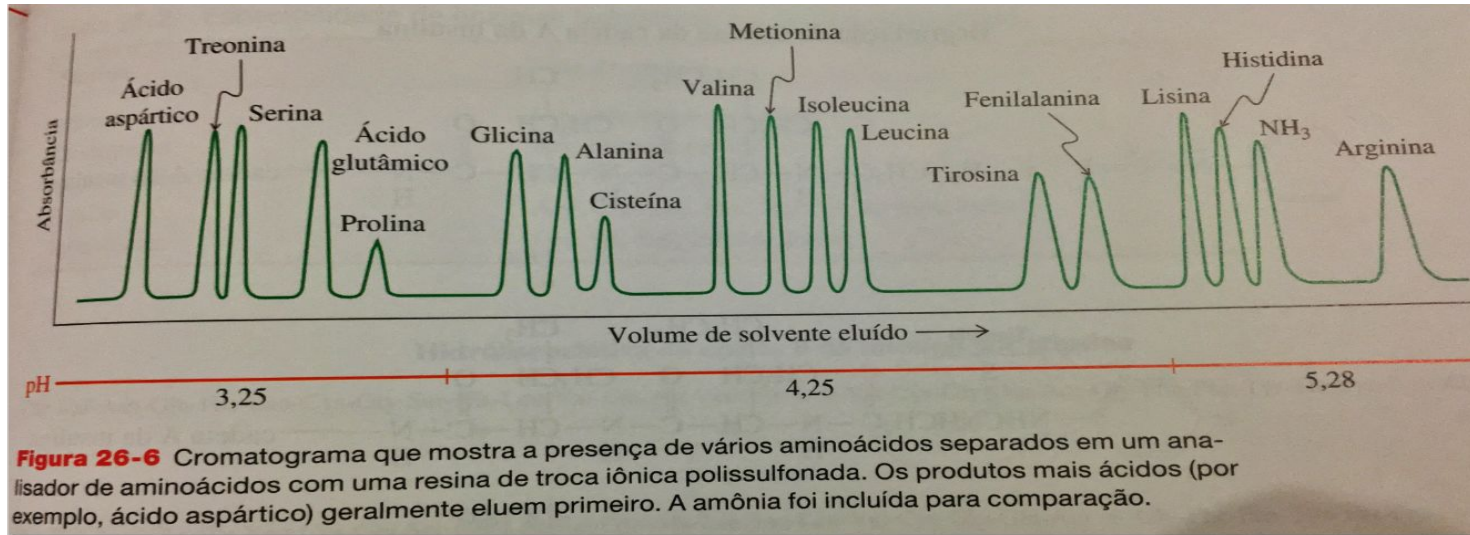
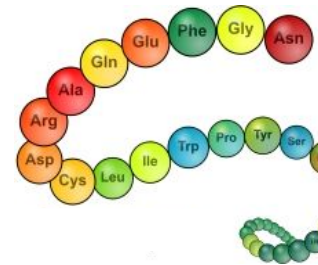


Figura 26-6 Cromatograma que mostra a presença de vários aminoácidos separados em um analisador de aminoácidos com uma resina de troca iônica polissulfonada. Os produtos mais ácidos (por exemplo, ácido aspártico) geralmente eluem primeiro. A amônia foi incluída para comparação.



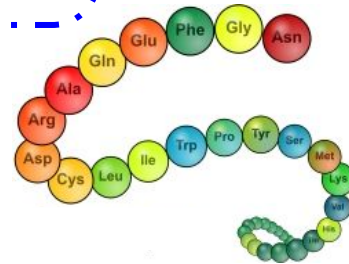
Sequenciamento do peptídeo

DEGRADAÇÃO DE EDMAN → para sequências até 50 aminoácidos

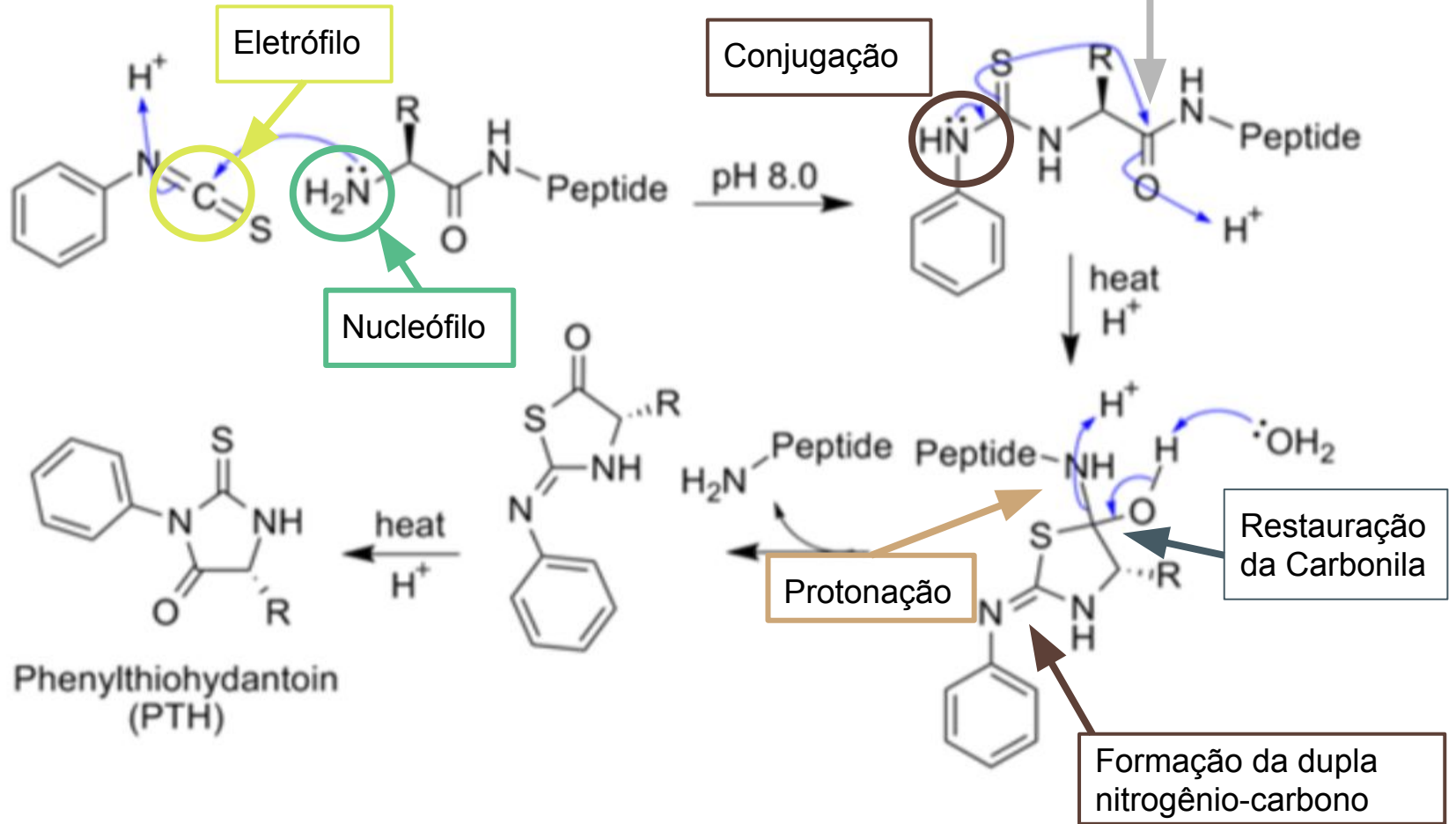
↳ Reagente: Isotiocianato de fenila

Grupo N-terminal liberado adiciona-se ao isotiocianato → Derivado da tiouréia

Ácidos fracos transformam o aminoácido livre em uma feniltio-hidantoína, isso deixa o resto do polipeptídeo inalterado. A nova cadeia terá uma nova terminação que vai sofrer nova degradação.



Mecanismo - Degradação de Edman



Fracionamento de cadeias longas

Peptídeos com mais de 50 aminoácidos → **enzimas hidrolíticas** → fragmentos menores de maneira seletiva e previsível

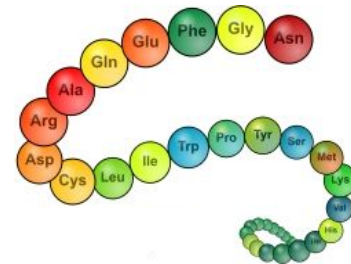
Identifica os aminoácidos mas não a sequência

Sequenciamento requer 2ª hidrólise com enzima diferente

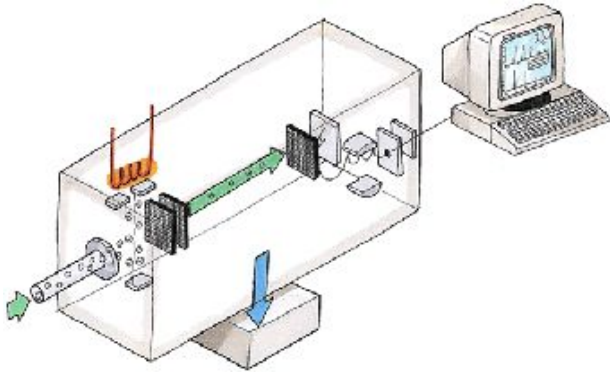
Superposição de peptídeos

Tabela 26.2 Especificidade de enzimas hidrolíticas na quebra de peptídeos

Enzima	Sítio de quebra
Tripsina	Lys, Arg, término carbóxi
Clostripaína	Arg, término carbóxi
Quimotripsina	Phe, Trp, Tyr, término carbóxi
Pepsina	Asp, Glu, Leu, Phe, Trp, Tyr, término carbóxi
Termolisina	Leu, Ile, Val, término amino



Espectrometria de Massas



Atualmente é o método de escolha

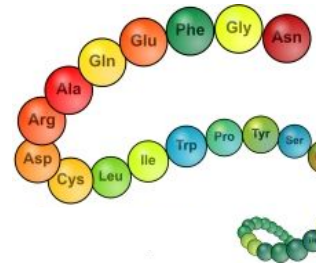


Produz íons (amostra) → separa por massa/carga
→ gera espectro de suas abundâncias.



As proteínas são fragmentadas predominantemente na ligação peptídica.

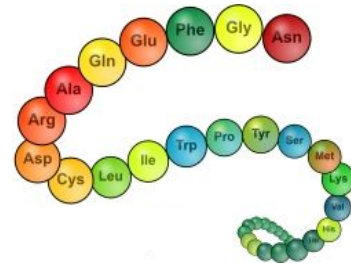
Fragmentos de peptídeos gerados diferem sequencialmente da massa de um resíduo de aminoácido e, deste modo, a sua sequência pode ser deduzida.



Sequenciamento e a tecnologia do DNA recombinante

- ➔ Tecnologia do DNA recombinante
- ➔ Sequências de bases no DNA diretamente relacionadas à sequência de aminoácidos das proteínas
- ➔ Automação da análise do DNA ➔ conhecimento obtido pode ser traduzido **imediatamente** em um estrutura primária de proteína.

Esta técnica permitiu o sequenciamento de milhares de proteínas em poucos anos.



Referências Bibliográficas

1. Vollhardt, K.P.C.; Schore, N.E. “Química Orgânica - Estrutura e Função” 6ª Edição, 2013.
2. Wilson & Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. Página 328. Disponível em:
http://www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/DEG_6_Determinacao_de_strutura_de_proteinas.pdf

